

ОАО «ИЗДАТЕЛЬСТВО
"МЕДИЦИНА"»

ОБЩЕРОССИЙСКАЯ
ОБЩЕСТВЕННАЯ
ОРГАНИЗАЦИЯ «НАУЧНО-
ПРАКТИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО
СПЕЦИАЛИСТОВ
ЛАБОРАТОРНОЙ МЕДИЦИНЫ»

Журнал зарегистрирован
Федеральной службой по надзору
в сфере связи, информационных
технологий и массовых коммуникаций.

Д КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Том 64
9 • 2019

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

Е Ж Е М Е С Я Ч Н Ы Й Н А У Ч Н О - П Р А К Т И Ч Е С К И Й Ж У Р Н А Л

СЕНТЯБРЬ

Журнал основан в январе 1955 г.

Почтовый адрес
ОАО «Издательство "Медицина"»
115088, Москва, Новоостاپовская ул.,
д. 5, строение 14

Телефон редакции:
8-495-430-03-63,
E-mail: clin.lab@yandex.ru

Зав. редакцией Л. А. Шанкина

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ

Тел. 8-903-724-40-29

Ответственность за достоверность
информации, содержащейся в рекламных
материалах, несут рекламодатели

Художественный редактор
Е.М. Архипова

Сдано в набор 03.07.2019.
Подписано в печать 20.07.2019.
Формат 60 × 88¹/₈.
Печать офсетная.
Печ. л. 8,00
Уч.-изд. л. 9,67.

E-mail: oao-meditsina@mail.ru
WWW страница: www.medlit.ru

ЛР N 010215 от 29.04.97 г.

Все права защищены. Ни одна часть этого из-
дания не может быть занесена в память компью-
тера либо воспроизведена любым способом
без предварительного письменного разреше-
ния издателя.

Журнал представлен в базе данных Российско-
го индекса научного цитирования (РИНЦ) и в
следующих международных информационно-
справочных изданиях: Abstracts of Microbiology, Adis
International Ltd Reactions Weekly, Chemical Ab-
stracts (Print), Chemical Titles, EBCOhost Biological
Abstracts (Online), Elsevier BV EMBASE, Elsevier
BV Scopus, Excerpta Medica, Abstract Journals,
Index Medicus, Index to Dental Literature, National
Library of Medicine PubMed, OCLC Article First,
OCLC MEDLINE, Reactions Weekly (Print), Thom-
son Reuters Biological Abstracts (Online), Thomson
Reuters BIOSIS Previews, VINITI RAN Referativnyi
Zhurnal, Ulrich's International Periodicals Directory.

Отпечатано в ООО "ПОЛИ ПРИНТ
СЕРВИС", 119049, г. Москва,
Калужская пл., д. 1, корп. 2

Индекс 71442 — для подписчиков
Подписка через Интернет: www.akc.ru,
www-prensa-ru
Подписка на электронную версию:
elibrary.ru

ISSN 0869-2084. Клин. лаб. диагностика.
2019. № 9. 513–584.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор А.Ю. МИРОНОВ

А.Б. ДОБРОВОЛЬСКИЙ, В.В. ДОЛГОВ, Г. Н. ЗУБРИХИ-
НА, А.А. ИВАНОВ, С.А. ЛУГОВСКАЯ, В.Т. МОРОЗОВА,
Л.М. ПИМЕНОВА (ответственный секретарь), Л.М. СКУ-
ИНЬ, А.А. ТОТОЛЯН, И.П. ШАБАЛОВА

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

А.Н. АРИПОВ (Ташкент), Т.В. ВАВИЛОВА (Санкт-
Петербург), I. WATSON (Великобритания, Ливерпуль),
А.Ж. ГИЛЬМАНОВ (Уфа), Д.А. ГРИЩЕНКО (Красно-
ярск), В.С. ГУДУМАК (Кишинёв), Н.Г. ДАШКОВА (Москва),
В.А. ДЕЕВ (Киев), Т.И. ДОЛГИХ (Омск), С.А. ЕЛЬЧАНИНО-
ВА (Барнаул), А.В. ИНДУТНЫЙ (Омск), А. KALLNER (Шве-
ция, Стокгольм), А.И. КАРПИЩЕНКО (Санкт-Петербург),
К.П. КАШКИН (Москва), Г.И. КОЗИНЕЦ (Москва),
А.В. КОЗЛОВ (Санкт-Петербург), В.Г. КОЛБ (Минск),
Г.В. КОРШУНОВ (Саратов), Г.М. КОСТИН (Минск),
А.Г. КОЧЕТОВ (Москва), Н.Е. КУШЛИНСКИЙ (Москва),
Г.Г. ЛУНЕВА (Киев), А.Р. МАВЗЮТОВ (Уфа), В.Н. МАЛАХОВ
(Москва), Д.Д. МЕНЬШИКОВ (Москва), Е.Н. ОВАНЕСОВ
(Москва), Ю.В. ПЕРВУШИН (Ставрополь), И.В. ПИКАЛОВ
(Новосибирск), Ю.П. РЕЗНИКОВ (Москва), Д.Б. САПРЫ-
ГИН (Москва), С.Н. СУПЛОТОВ (Тюмень), О.А. ТАРАСЕН-
КО (Москва), И.С. ТАРТАКОВСКИЙ (Москва), А.Б. УТЕ-
ШЕВ (Алматы), Л.А. ХОРОВСКАЯ (Санкт-Петербург),
С.В. ЦВИРЕНКО (Екатеринбург), А.Н. ШИБАНОВ (Моск-
ва), В.Л. ЭМАНУЭЛЬ (Санкт-Петербург), Г.А. ЯРОВАЯ
(Москва)



«Издательство "МЕДИЦИНА"»

ОАО ИЗДАТЕЛЬСТВО
"МЕДИЦИНА"

THE ALL-RUSSIAN
ORGANIZATION
"THEORETICAL AND
PRACTICAL SOCIETY
OF SPECIALISTS
OF LABORATORY
MEDICINE"

Д КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ Диагностика

Volume 64
9 • 2019

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

SEPTEMBER

The Journal is founded in 1955.

Mailing address:
Izdatelstvo "MEDITSINA"

115088, Moscow
Novoostapovskaya str., 5, building 14

Editorial office phone:

8-495-430-03-63,

E-mail: clin.lab@yandex.ru

Managing editor L.A. Shankina

ADVERTISING DEPARTMENT

Phone: 8-495-678-64-84

The responsibility for credibility of
information contained in advertising materials
is accounted for advertisers

Art editor E.M. Arkhipova

E-mail: oao-meditsina@mail.ru

WWW page: www.medlit.ru

LR № 010215 of 29.04.1997

All rights reserved. Any part of this edition can not
be entered computer memory nor be reproduced
with any other mode without preliminary permission
of editor in written form.

The Journal is presented in data base of the
Russian index of scientific quotation (RiNZ) and
in following I&R editions: Abstracts of Microbiology,
Adis International Ltd Reactions Weekly, Chemical
Abstracts (print), Chemical Titles, EBCOhost
Biological Abstracts (Online), Elsevier BV EM-
BASE, Elsevier BV Scopus, Excerpta Medica,
Abstract Journals, Index Medicus, Index to Dental
Literature, National Library of Medicine PubMed,
OCLC Article First, OCLC MEDLINE, Reactions
Weekly (Print), Thomson Reuters Biological Ab-
stracts (Online), Thomson Reuters BIOSIS Pre-
views, VINITI RAN Referativnyi Zhurnal, Ulrich's
International Periodicals Directory.

ISSN 0869-2084.

EDITOR BOARD:

Editor-in-Chief A.Yu MIRONOV

A.B. DOBROVOLSKYI, V.V. DOLGOV, G.N. ZUBRICHINA,
A.A. IVANOV, S.A. LUGOVSKAYA, V.T. MOROZOVA,
L.M. PIMENOVA (executive editor), L.M. SKUIN',
A.A. TOTOLYAN, I.P. SHABALOVA

EDITORIAL COUNCIL:

A.N. ARIPOV (*Tashkent*), T.V. VAVILOVA (*Sankt-Peterburg*),
I. WATSON (*Great Britain, Liverpool*), A.Zh. GIL'MANOV
(*Ufa*), D.A. GRITCHENKO (*Krasnoyarsk*), V.S. GUDUMAK
(*Kishinev*), N.G. DASHKOVA (*Moscow*), V.A. DEEV (*Kiev*),
T.I. DOLGIKH (*Omsk*), S.A. ELCHANINOVA (*Barnaul*),
A.V. INDUTNY (*Omsk*), V.A. KALLNER (*Sweden, Stockholm*),
A.I. KARPITCHENKO (*Sankt-Peterburg*), K.P. KASHKIN
(*Moscow*), G.I. KOZINEC (*Moscow*), A.V. KOZLOV (*Sankt-
Peterburg*), V.G. KOLB (*Minsk*), G.V. KORSHUNOV (*Sara-
tov*), G.M. KOSTIN (*Minsk*), A.G. KOCHETOV (*Moscow*),
N.E. KUSHLINSKII (*Moscow*), G.G. LUNEVA (*Kiev*), A.R. MA-
VZYTOV (*Ufa*), V.N. MALACHOV (*Moscow*), D.D. MEN'SHIKOV
(*Moscow*), E.N. OVANESOV (*Moscow*), Yu.V. PERVUCHIN
(*Stavropol'*), I.V. PICALOV (*Novosibirsk*), Yu.P. REZNICOV
(*Moscow*), D.B. SAPRIGIN (*Moscow*), S.N. SUPLOTOV (*Tyu-
men'*), O.A. TARASENKO (*Moscow*), I.S. TARTAKOVSKIY
(*Moscow*), A.B. UTESHEV (*Almati*), L.A. KHOROVSKAYA
(*Sankt-Peterburg*), S.V. TSVIRENKO (*Ekaterinburg*),
A.N. SHIBANOV (*Moscow*), V.L. EMANUEL' (*Sankt-Peter-
burg*), G.A. YAROVAYA (*Moscow*)



ИЗДАТЕЛЬСТВО "МЕДИЦИНА"

БИОХИМИЯ

- Жлоба А.А., Субботина Т.Ф., Молчан Н.С., Полушин Ю.С. Уровень гомоаргинина и баланс метионин-гомоцистеин у пациентов с ишемической болезнью сердца. 516
- Гусакова А.М., Суслова Т.Е., Рябов В.В., Керчева М.А. Использование мультиплексного анализа на платформе Luminex в комплексной оценке динамики сердечно-сосудистых биомаркеров у пациентов с острым инфарктом миокарда. 525

ИММУНОЛОГИЯ

- Марданлы С.Г., Арсеньева В.А., Авдонина А.С., Амелина Е.А., Марданлы С.С. Первые результаты применения иммуноферментного анализа в серологической диагностике инфекции, вызванной герпесвирусом человека 7 типа. 530
- Никитина А.В., Акиншина Ю.А., Нищачкова Н.Е., Амелина Е.А., Марданлы С.Г. Иммунохроматографический тест для выявления скрытой крови в кале. 536
- Горенко И.Н. Уровни антител к тканям щитовидной железы у эутиреоидных мужчин и женщин, жителей Арктической зоны Российской Федерации. 541

МИКРОБИОЛОГИЯ

- Рунина А.В., Шпилевая М.В., Филиппова М.А., Катунин Г.Л., Кубанов А.А. Применение иммуночипа с панелью из 12 диагностических антигенов *T. pallidum* для изучения динамики профиля иммуноглобулинов классов IgG и IgM в сыворотке крови больных сифилисом до и после терапии. 546
- Рудаков Н.В., Штрек С.В., Блох А.И., Пенёвская Н.А., Щучинова Л.Д. Возможности серологической верификации сибирского клещевого тифа с использованием тест-системы для выявления антител к *Rickettsia conorii*. 553
- Кукина И.В., Зеля О.П., Карань Л.С. Лабораторная диагностика бабезиоза человека. 560

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Останкова Ю.В., Семенов А.В., Тотолян Арег А. Метод количественной оценки кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК ВГВ в пункционных биоптатах печени. 565
- Терновой В.А., Кононова Ю.В., Зайковская А.В., Чуб Е.В., Волынкина А.С., Микрюкова Т.П., Котенев Е.С., Пьянков О.В., Семенцова А.О., Локтев В.Б. Разработка и оценка набора реагентов для обнаружения РНК вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки методом петлевой изотермической амплификации с обратной транскрипцией. 571

ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

- Суранова Т.Г., Суворов Г.Н. Хранение, доступ и защита данных полногеномного секвенирования в России и зарубежных государствах: практический аспект. 578

BIOCHEMISTRY

- Zhloba A.A., Subbotina T.F., Molchan N.S., Polushin Yu.S. Homoarginine level and methionine-homocysteine balance in patients with ischemic heart disease
- Gusakova A.M., Suslova T.E., Ryabov V.V., Kercheva M.A. Multiplex analysis on the Luminex platform in complex estimation of cardiovascular biomarker dynamics in patients with acute myocardial infarction

IMMUNOLOGY

- Mardanly S.G., Arsenyeva V.A., Amelina E.A., Avdonina A.S., Mardanly S.S. First results of application of an enzyme immunoassay in the serological diagnostics of infection caused by herpesvirus type 7
- Nikitina A.V., Akinshina Y.A., Nishchakova N.E., Amelina E.A., Mardanly S.G. Immunochromatographic test for detection of fecal occult blood
- Gorenko I.N. Thyroid antibodies levels in euthyroid men and women – residents of the Arctic zone of the Russian Federation

MICROBIOLOGY

- Runina A.V., Shpilevaya M.V., Filippova M.A., Katunin G.L., Kubanov A.A. Diagnostic immunoarray assay for characterization of immunoglobulin IgG and IgM level in syphilis patients serum towards 12 recombinant antigens of *T. pallidum* before and after the therapy
- Rudakov N.V., Shtrek S.V., Blokh A.I., Penjevskaia N.A., Shchuchinova L.D. Possibility of serological verification of siberian tick typhus with the test system for identification of *Rickettsia conorii* antibodies
- Kukina I.V., Zelya O.P., Karan L.S. Laboratory diagnostic of human babesiosis

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

- Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Totolian Areg A. The quantitative determination method of covalently closed circular DNA HBV in puncture biopsy specimens of the liver
- Ternovoi V.A., Kononova Yu.V., Zaykovskaya A.V., Chub E.V., Volynkina A.S., Mikryukova T.P., Kotenev E.S., Pyankov O.V., Sementsova A.O., Loktev V.B. Development and assessment of a reagent kit for RNA detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus with using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method

LABORATORY SERVICE ORGANIZATION

- Suranova T.G., Suvorov G.N. Storage, access and protection of full genome sequencing data in Russia and foreign countries: practical aspect

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Жлоба А.А., Субботина Т.Ф., Молчан Н.С., Полушин Ю.С.

УРОВЕНЬ ГОМОАРГИНИНА И БАЛАНС МЕТИОНИН-ГОМОЦИСТЕИН У ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА

ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова»
Минздрава РФ, 197022, Санкт-Петербург, Россия

Согласно последним данным, уровень гомоаргинина (гАрг) плазмы по прогностической значимости в отношении прогрессирования сердечно-сосудистых заболеваний может превосходить натрийуретические пептиды и другие известные маркеры. Недостаток данных о связях уровней гАрг с уровнями других метаболитов затрудняет понимание его роли в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний. Проведена оценка связей уровней гАрг и других аминокислот, включая метионин (Мет) и гомоцистеин (Гци) и их соотношения у пациентов с ишемической болезнью сердца. В исследование включены 74 пациента с ишемической болезнью сердца (57 мужчин и 17 женщин) в возрасте 62 (57 – 67) лет перед плановой операцией аортокоронарного шунтирования и 27 близких по возрасту здоровых лиц. У пациентов уровень гАрг был почти в 2 раза ниже ($p < 0,05$), чем у здоровых лиц и у 50% - ниже 1,4 мкМ. Понижению уровня гАрг соответствовало статистически значимое снижение ($p = 0,0025$) соотношения Мет/оГци. Это соотношение не коррелировало с уровнем глюкозы или индексом массы тела. По отдельности уровни Мет и оГци коррелировали с уровнем гАрг с меньшей статистической значимостью. В подгруппе с уровнем гАрг выше 2,1 мкМ отмечена меньшая частота инфарктов миокарда. Таким образом, у пациентов с ишемической болезнью сердца пониженный уровень гАрг связан с нарушением обмена серосодержащих аминокислот, участвующих в процессах трансметилирования. Соотношение Мет/оГци, тесно коррелируя с уровнем гАрг, по-видимому, обнаруживает связь реакций образования креатина и трансметилирования, выделяя когорту пациентов с наиболее глубокими и опасными изменениями тканевого метаболизма.

Ключевые слова: гомоаргинин; метионин; гомоцистеин; аминокислоты; ишемическая болезнь сердца.

Для цитирования: Жлоба А.А., Субботина Т.Ф., Молчан Н.С., Полушин Ю.С. Уровень гомоаргинина и баланс метионин-гомоцистеин у пациентов с ишемической болезнью сердца. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (9): 516-524. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-9-516-524>

Zhloba A.A., Subbotina T.F., Molchan N.S., Polushin Yu.S.

HOMOARGININE LEVEL AND METHIONINE-HOMOCYSTEINE BALANCE IN PATIENTS WITH ISCHEMIC HEART DISEASE

Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University" of Minzdrav of Russia, 197022, St. Petersburg, Russia

The level of homoarginine (hArg) in terms of prognostic significance may exceed the natriuretic peptides and other well-known markers according to the latest data about the progression of cardiovascular diseases. The lack of data on the association of hArg levels with levels of other metabolites makes it difficult to understand its role in the pathogenesis of cardiovascular diseases. Relationships of hArg and other amino acids, including methionine (Met) and total homocysteine (tHcy), and their ratio in patients with ischemic heart disease were evaluated. The study included 74 patients with coronary heart disease (57 men and 17 women) aged 62 (57 - 67) years before coronary artery bypass surgery and 27 healthy people of similar age. In patients, the level of hArg was almost 2 times lower ($p < 0.05$) than in healthy individuals and rates lower than 1.4 μM were in half of them. The statistically significant decrease ($p = 0.0025$) of the Met/tHcy ratio corresponded to a decrease in the level of hArg. This ratio did not correlate with glucose level or body mass index. Less statistical significance of hArg correlation with levels of Met or tHcy separately was observed. In the subgroup of patients with hArg level above 2.1 μM , a lower incidence of myocardial infarction was noted. Thus, a low hArg level is associated with impaired metabolism of sulfur-containing amino acids involved in transmethylation reactions, in patients with ischemic heart disease. The Met/tHcy ratio, closely correlating with the level of hArg, apparently reveals a link between the reactions of creatine formation and transmethylation, highlighting a cohort of patients with the most profound and dangerous changes in tissue metabolism.

Key words: homoarginine, methionine; total homocysteine; amino acids; ischemic heart disease.

For citation: Zhloba A.A., Subbotina T.F., Molchan N.S., Polushin Yu.S. Homoarginine level and methionine-homocysteine balance in patients with ischemic heart disease. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (9): 516-524 (in Russ.)

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-9-516-524>

Acknowledgment. The authors would like to express their gratitude for organizational and information support to the Blood transfusion Department of Pavlov First Saint Petersburg State Medical University.

For correspondence: Zhloba A.A., Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of Biochemistry Department of Scientific and Educational Institute of Biomedicine; e-mail: zhlobaaa@1spbgmu.ru

Information about authors:

Zhloba A.A., <http://orcid.org/0000-0003-0605-7617>

Subbotina T.F., <http://orcid.org/0000-0002-2278-8391>

Polushin Yu.S. <https://orcid.org/0000-0002-6313-5856>

Conflict of interest. *The authors declare no conflict of interest.*

Acknowledgment. *The research was carried out within the Ministry of Health framework of the Russian Federation.*

Received 20.05.2019
Accepted 25.06.2019

Введение. В настоящее время известны метаболонные прогностические маркеры угрозы ишемического инсульта и инфаркта миокарда, к числу которых относится уровень гомоаргинина (гАрг) [1, 2]. Последние данные указывают на то, что этот показатель по прогностической значимости в отношении прогрессирования сердечно-сосудистых заболеваний может превосходить натрийуретические пептиды, тропонины, С-реактивный белок, сывороточный амилоид А, неоптерин, асимметричный и симметричный диметиларгинины [1]. Понижение уровня гАрг в плазме менее 1,4 мкМ приводит к появлению статистически значимого риска острых ишемических событий с неблагоприятными исходами с встречаемостью в 25%, а дальнейшее снижение гАрг ниже 0,84 мкМ удваивает этот риск [1, 3, 4]. В предыдущем сообщении нами показано существенное снижение данного метаболита у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) [5]. К настоящему времени показано, что среди пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями снижение гАрг обнаруживается не у всех. Так, среди пациентов с признаками стенокардии или с нарушениями сердечного ритма отмечена слабая связь данных состояний с пониженными уровнями гАрг [6]. В статье, опубликованной нами ранее, приведены данные о том, что отсутствие этой связи может быть обусловлено высокими уровнями аргинина и лизина - аминокислот, высвобождающихся в больших количествах при активации фибринолиза [5, 7]. Можно ожидать, что гАрг, как и другие известные метаболитические маркеры, приобретает большую диагностическую значимость, если рассматривается в группе с другими метаболитами. Недостаток данных о связях уровней гАрг с уровнями других метаболитов затрудняет понимание его роли в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний. Метаболическое происхождение гАрг известно, но не изучены метаболитические изменения, которые тесно связаны со снижением его уровня. Сам гАрг является менее подходящим, чем аргинин, субстратом эндотелиальной NO-синтазы. В настоящее время общепринятая точка зрения заключается в том, что гАрг в эндотелиальных клетках, сильно ингибируя аргиназы, повышает содержание внутриклеточного аргинина и тем самым активность эндотелиальной NO-синтазы, т.е. способствует вазодилатации [4]. Известно, что атеросклеротическое поражение артерий, в том числе, коронарных, сопряжено с многолетним отклонением в потреблении, метаболизме и эндогенном транспорте липидов, что может быть описано, как «нарушение эндозологии» с системными устойчивыми нарушениями других звеньев метаболизма [8, 9].

В этом аспекте связи уровня гАрг с регуляцией и моделированием клеточного метаболизма изучены не-

достаточно. Реакция, за счет которой образуется гАрг, катализируется аргинин:глицинамидинотрансферазой (АГАТ) и одновременно является ключевой реакцией биосинтеза креатина. Поэтому падение уровня гАрг в кровотоке может отражать интенсивность метаболитических процессов в тканях, богатых креатинфосфатом. Из важных устойчивых сдвигов на уровне организма отмечают существенные изменения соотношения мышечной массы и жировой ткани с превалированием последней. Из интенсивно используемых в азотистом обмене исходных субстратов для обновления тканей в настоящее время достаточно изучены колебания уровней аминокислот в крови. Особенно значительные сдвиги при сердечно-сосудистых заболеваниях наблюдаются со стороны метионина (Мет), группы разветвленных аминокислот валина (Вал), изолейцина (Иле), лейцина (Лей), а также глутамина (Глн) и глутамата (Глу) [10]. Мет, как незаменимая аминокислота, необходим в качестве нутриента во всех возрастных группах независимо от состояния организма. Недостаток Мет и пониженная концентрация его в крови ведут к гипометилированию, нарушению инициации и регуляции синтеза белков, а также низкомолекулярных метаболитов, участвующих в углеводном и липидном обменах [11, 12]. Содержание Мет в плазме или сыворотке крови по данным ведущих руководств по клинической лабораторной диагностике может колебаться в очень широких пределах от 6 до 40 мкМ [13]. При рассмотрении же однородных групп пациентов или динамики Мет у отдельных пациентов уровень этого показателя в плазме крови, взятой натощак, группируется в узком диапазоне концентраций [14-16]. Несмотря на значительные межлабораторные и географические различия в референтных уровнях Мет и других аминокислот, направления их сдвигов в патологических условиях оказываются сопоставимо близкими. Обычно уровень аминокислот, за исключением уровня серина (Сер), во всех возрастных группах на 5 - 15% выше у мужчин. В частности, у мужчин уровень Мет и общего гомоцистеина (оГци) несколько выше, чем у женщин репродуктивного возраста. У последних реметилирование гомоцистеина (Гци) с образованием Мет протекает более эффективно [17]. В возрастном и географическом аспектах также можно отметить некоторые особенности в содержании аминокислот, включая Мет [18, 19]. Уровень Мет в крови возрастает после поступления белков, богатых этой аминокислотой, включая казеин молочных продуктов и яичный альбумин. Однако в промежутках между приемами пищи уровень Мет быстро возвращается к исходному благодаря процессам трансметилирования и последующей утилизации образующегося Гци в цистатиониновом пути [20, 21]. Исследования с при-

влечением взрослых лиц показали отсутствие неблагоприятных последствий умеренных колебаний в потреблении Мет с пищей, но потребление более чем в 5 раз превышающее норму приводило к повышению уровня оГци. Этот эффект потребления избытка Мет смягчался добавками в рацион витаминов В₆, В₁₂, С и фолиевой кислоты [22]. Следует отметить, что долгосрочные последствия избытка Мет в рационе до настоящего времени не оценены, так как подобные исследования заняли бы слишком большие промежутки времени. Модельные опыты, например, показывают, что постоянное употребление продуктов богатых казеином и, соответственно, Мет, таких как сыр, может способствовать увеличению уровня оГци [23]. Таким образом, уровень Мет связан с генетическими факторами, образом жизни, пищевыми предпочтениями и поэтому определяется не только наличием тех или иных патологических состояний, полом и возрастом. Как справедливо отмечают в различных исследованиях, при определении отклонений от референтного уровня Мет у пациентов в конкретном регионе необходимо опираться на значения показателя в группе здоровых лиц с более или менее близкими параметрами образа жизни.

У пациентов с ИБС, часть которых имела в анамнезе ишемический инсульт, наблюдалось повышение уровня цистатинина - продукта обмена Мет и Гци [24]. У этих пациентов уровень цистатинина обнаруживал сильную связь с ишемическим инсультом, что свидетельствует об активации цистатининового пути для удаления избытка Мет. В другом проспективном исследовании с наблюдением за 4156 пациентами с ИБС среди участников с повышенным уровнем апоВ или ЛПНП-холестерина обнаружено, что пониженные уровни Мет в плазме связаны с повышенным риском развития инфаркта миокарда [25]. Уровни Мет и оГци не часто одновременно используют для характеристики пациентов. Несмотря на очевидную взаимосвязь этих серосодержащих аминокислот, их совместное определение и анализ связей с другими метаболическими изменениями, наблюдаемыми при сердечно-сосудистых заболеваниях, не проведены. Нам представляется важным изучение сдвигов в содержании этих аминокислот и гАрг у пациентов с ИБС, у которых одновременно наблюдается снижение эффективности поступления энергетических ресурсов и нарушается обмен серосодержащих аминокислот.

Это, возможно, позволит установить или отклонить не только патогенетическую роль, но также возможное значение серосодержащих аминокислот для диагностической оценки ишемических состояний.

Настоящее исследование заключалось в определении уровней Мет, других аминокислот и соотношения Мет к оГци у пациентов с ишемической болезнью сердца и в соответствующей группе здоровых лиц с целью оценки связи этих сдвигов с уровнями прогностического показателя угрозы обострения ишемических состояний - гАрг.

Материал и методы. В исследование включены 74 пациента с ИБС (57 мужчин и 17 женщин) в возрасте 62 (57 – 67) лет, находившихся на стационарном лечении в клиниках ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова с августа 2014 по октябрь 2016 г. в связи с плановой операцией аортокоронарного шунтирования в условиях искусственного кровообращения. Все пациенты имели многососудистое (у большинства трехсосудистое) поражение коронарного русла с необходимостью реваскуляризации,

хроническую сердечную недостаточность 3 функционального класса, (фракция выброса левого желудочка снижена, но не менее 50% от должного) и артериальную гипертензию, требующую медикаментозной коррекции.

Исследование было одобрено этическим комитетом ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова. Обязательным условием включения пациента в исследование являлось его информированное согласие. Критериями не включения являлись: отсутствие согласия пациента, поражение клапанного аппарата, перенесенный острый инфаркт миокарда (ОИМ) в предшествующие 6 недель, сахарный диабет, сердечная недостаточность с фракцией выброса левого желудочка менее 50%, хроническая болезнь почек > 3Б ст.

В среднем, фракция выброса левого желудочка у пациентов составила $(61,5 \pm 6,0)\%$ должного. 39 пациентов (53%) имели острый инфаркт миокарда (ОИМ) в анамнезе. Только 12 пациентов (16%) имели нормальный индекс массы тела ($ИМТ < 25 \text{ кг/м}^2$). У 39 пациентов (53%) отмечалась избыточная масса тела, а у 23 (31%) – ожирение ($ИМТ > 30 \text{ кг/м}^2$). Распределение основных клинико-лабораторных показателей в зависимости от величины ИМТ представлено в табл. 1.

Из данных табл. 1 видно, что достоверные различия у пациентов с нормальной массой тела и ожирением отмечается только по фибриногену: у лиц с ожирением он достоверно выше, хотя и находится в границах референтного диапазона. Группа пациентов в целом характеризуется тем, что основные биохимические показатели, как правило, не показывают значительных отклонений: глюкоза 5,3 (4,9 – 5,6) мМ, общий холестерин 4,2 (3,6 – 5,2) мМ, креатинин 84 (75 – 97) мкМ, мочевины 5,4 (4,7 – 6,2) мМ. Общий белок плазмы составлял 73 (70 – 75) г/л. Лишь уровень оГци у большинства пациентов был ближе к верхней границе референтного диапазона: 8,1 (6,4 – 10,5) мкМ, а у 15 пациентов (20%) превышал 12 мкМ. Фоновая терапия пациентов была представлена β-блокаторами (100% пациентов), ингибиторами ангиотензин-превращающего фермента (82%), антигипертензивными препаратами различного механизма действия (85%), нитратами (53%), диуретиками (25%).

Венозную кровь для исследования получали из кубитальной вены после 12-часового голодания непосредственно перед операцией аортокоронарного шунтирования. Образцы крови, взятые в вакутейнеры с ЭДТА, немедленно помещали в холодильник (+4° С), а затем отделяли плазму путем центрифугирования (1500 об/мин, 10 мин.) не позднее 30 минут после взятия. Аликвоты полученной плазмы хранили при -80° С вплоть до анализа.

Группу сравнения составили 27 здоровых лиц, сопоставимых по возрасту с исследуемой группой пациентов – регулярные доноры старшей возрастной группы 55 (42 – 58) лет. Забор образцов крови проводили из кубитальной вены после 10-часового голодания. Процессирование и хранение образцов осуществляли аналогично группе пациентов.

Спектр аминокислот плазмы крови (включая гАрг, но за исключением аминотиолов) определяли методом обращенно-фазного ВЭЖХ-анализа на хроматографе Agilent 1100 (Agilent Technologies, США) по разработанной нами технологии [26], с использованием ортофталевого альдегида для предколоночной дериватизации и колонки Zorbax Eclipse AAA C18 (150 x 4,6) мм, 3,5 мкм. Концентрации аминокислот рассчитывали, используя

Таблица 1

Распределение общеклинических показателей в соответствии с индексом массы тела пациентов

Показатели	Квартили ИМТ (кг/м ²)				P _{Q1-Q4}
	Q1 ≤25,9	Q2 26,0 – 28,1	Q3 28,2 – 30,1	Q4 ≥30,2	
Возраст, лет	63 (55 – 69)	62 (56 – 67)	64 (59 – 67)	61 (57 – 64)	0,35
Мужчины/женщины, п	14/5	14/4	14/4	15/4	0,87/0,99
ОИМ в анамнезе, п	11	11	8	9	0,67
оГци, мкМ	8,8 (5,8 – 10,7)	8,2 (6,5 – 13,4)	8,2 (6,5 – 10,5)	7,9 (6,8 – 10,6)	0,78
Глюкоза, мМ	5,2 (4,9 – 5,5)	5,2 (4,6 – 5,6)	5,5 (5,2 – 5,7)	5,3 (5,0 – 5,7)	0,33
Общий холестерин, мМ	4,4 (3,2 – 5,2)	4,4 (3,6 – 5,5)	4,0 (3,5 – 4,9)	4,1 (3,8 – 5,0)	0,96
Креатинин, мкМ	85 (78 – 93)	83 (70 – 96)	82 (72 – 105)	91 (82 – 107)	0,40
Мочевина, мМ	5,4 (4,8 – 6,1)	5,2 (4,3 – 6,0)	6,1 (4,8 – 6,7)	5,7 (4,7 – 6,1)	0,87
Общий белок, г/л	73 (70 – 75)	73 (70 – 75)	72 (69 – 73)	73 (69 – 77)	0,88
АлАТ, Ед/л	21 (14 – 34)	19 (17 – 31)	21 (15 – 35)	22 (17 – 33)	0,83
АсАТ, Ед/л	22 (17 – 31)	21 (18 – 26)	20 (18 – 24)	21 (17 – 28)	0,51
Фибриноген, г/л	2,9 (2,6 – 3,2)	3,5 (3,2 – 3,7)	3,2 (3,0 – 3,6)	3,4 (3,0 – 3,8)	0,025

Примечание. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала.

норвалин в качестве внутреннего стандарта. В описанных условиях времени удерживания аминокислот составляют (мин): Цитруллин – 11,56; гАрг – 14,14; Вал – 18,89; Мет – 19,35; Норвалин – 20,00; Иле – 22,08; Лей – 23,30. В отношении гАрг, предел обнаружения (limit of detection, LOD) составляет 0,10 пмоль, а предел количественного определения (limit of quantification, LOQ) равен 0,20 мкМ для модельных растворов и 0,33 мкМ для плазмы.

Концентрации оГци и общего глутатиона (оГлт) определяли также с помощью ВЭЖХ (Agilent 1100) описанным ранее методом [27].

Данные анализировали с применением программы Statistica 10.0 (Dell, Inc., USA). Степень соответствия распределения данных нормальному закону оценивали с помощью критериев Шапиро-Уилка и Колмогорова - Смирнова. Для сравнения групп применяли U-критерий Манна – Уитни. Анализ распределения частот проводили с помощью критерия согласия Пирсона и точного критерия Фишера. Статистическую связь между данными анализировали путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Статистически значимыми считали различия данных и корреляции при $p < 0,05$.

Результаты. В изученных нами образцах плазмы крови, взятых у пациентов с ИБС и хронической сердечной недостаточностью 3 функционального класса перед оперативным вмешательством по реваскуляризации миокарда, сохранялся пониженный уровень гАрг и соотношения Мет/оГци. Уровень гАрг у пациентов, составляя 1,4 (1,0–2,0) мкМ, был почти в 2 раза ниже, чем у здоровых доноров ($p = 1 \times 10^{-6}$), у которых его содержание было 2,1 (1,8 – 3,1) мкМ. У половины пациентов уровень гАрг был

ниже 1,4 мкМ - референтной границы понижения его содержания для обозначения высокого риска угрозы инсульта или инфаркта. У доноров-женщин уровень гАрг имел значительно больший межквартильный размах - от 1,8 до 3,1 мкМ, чем у мужчин – от 1,9 – 2,5 мкМ при одинаковом значении медианы- 2,1 мкМ, при этом уровень гАрг у доноров-женщин в нескольких случаях был ниже 1,4 мкМ. У пациентов-женщин наблюдалась тенденция к более низкому уровню Глу+Глн ($p = 0,08$) и оГци ($p = 0,07$), чем у мужчин. Со стороны других биохимических показателей к моменту операции можно отметить редкую встречаемость отклонений. Содержание цитруллина у пациентов и доноров достоверно не различалось, колеблясь, примерно, от 20 до 34 мкМ, не выходя за пределы референтного интервала (табл. 2). Как показало настоящее исследование, разницы в содержании гАрг не наблюдалось между пациентами с ИМТ выше и ниже 25 кг/м². У пациентов с ИМТ больше 25 кг/м² обнаруживался более высокий уровень глюкозы ($p=0,04$). В зависимости от ИМТ ни уровни Мет, ни оГци или каких-либо других аминокислот и азотистых веществ не имели различий.

Наличие избыточного веса у пациентов не было связано с уровнями Мет, оГци и гАрг. Как показало дальнейшее изучение корреляций уровней аминокислот, с одной стороны, и гАрг, с другой, только уровни Мет ($R = 0,23$, $p = 0,076$) и оГци ($R = -0,30$, $p=0,021$) являлись статистически значимыми (рисунок, а, б). Помимо аминокислот, и другие клинико-биохимические показатели не имели значимых корреляционных связей с гАрг, включая ИМТ, уровни глюкозы или креатинина (рис., жс). Оценка связей этих показателей между собой показала, что ИМТ коррелирует положительно с уровнем глюкозы ($R = 0,36$, $p = 0,011$), но не креатинина. Наиболее сильная положительная корреляционная связь была обнаружена между гАрг и соотношением Мет/оГци ($R = 0,39$, $p = 0,0025$, рис., в), а также Глн+Глу ($R = 0,31$, $p = 0,0064$, рис., и). Соотношение Мет/оГци, имея достоверную корреляционную положительную связь с уровнем гАрг, не коррелирует с уровнем глюкозы или ИМТ. Корреляционная связь положительная для Мет (см.рисунок,а,б) и отрицательная для оГци (рис., б) с уровнями гАрг была значительно слабее. Дальнейшее исследование связи этого соотношения и других изучаемых показателей отражено в табл. 3, которая группирует значения всех показателей в соответствии с поквартильными распределениями уровней гАрг.

При сравнении значений изученных показателей в подгруппах, соответствующих поквартильным значениям уровней гАрг, можно видеть тренд соответствия низких значений соотношения Мет/оГци низким значениям гАрг (табл. 3). Можно отметить более низкую частоту встречаемости в прошлом инфарктов миокарда в подгруппе с уровнем гАрг выше 2,1 мкМ (см.табл. 3). Существенных межквартильных различий остальных показателей не выявлено, включая показатель ИМТ. Со-

Уровни аминокислот (мкМ) у пациентов с ИБС

АК, мкМ	Все пациенты (n=74)	Подгруппы пациентов				Референтные интервалы [13]
		Мужчины (n=57)	Женщины (n=17)	ИМТ≤25 кг/м ² (n=12)	ИМТ>25 кг/м ² (n=62)	
гАрг	1,4 (1,0 – 2,0)	1,5 (1,1 – 2,0)	1,3 (0,8 – 2,0)	1,4 (1,2 – 2,1)	1,5 (1,1 – 1,9)	> 1,4
Цитрул-лин	25 (21 – 30)	25 (21 – 30)	26 (21 – 28)	26 (20 – 34)	25 (21 – 29)	12 - 55
Мет	23 (18 – 28)	24 (19 – 28)	20 (17 – 24)	21 (18 – 26)	23 (17 – 28)	6 - 40
оГци	8,1 (6,4 – 10,5)	8,5 (6,8 – 11,9)	7,7 (5,5 – 8,8)	8,2 (5,4 – 10,5)	8,1 (6,5 – 10,4)	< 12
оГлт	3,5 (2,6 – 4,7)	3,5 (2,8 – 4,5)	3,5 (2,2 – 4,7)	3,1 (2,5 – 4,2)	3,6 (2,7 – 4,7)	2 – 8
Асп и Асн	39 (32 – 49)	40 (35 – 50)	34 (28 – 39)	37 (34 – 46)	39 (32 – 50)	30 - 100
Глу и Глн	500 (430 – 583)	502 (36 – 588)	471 (359 – 538)	456 (423 – 567)	502 (433 – 579)	400 - 1000
Вал	219 (180 – 254)	220 (182 – 253)	205 (176 – 247)	223 (192 – 232)	212 (178 – 265)	141 - 317
Иле	55 (47 – 58)	55 (48 – 68)	52 (40 – 69)	51 (48 – 62)	55 (46 – 69)	37 - 98
Лей	122 (106 – 147)	125 (110 – 149)	119 (92 – 141)	118 (97 – 149)	123 (108 – 145)	75 - 175

Примечание. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала; достоверных различий между подгруппами не выявлено (тест Манна-Уитни); АК – аминокислоты.

отношение Мет/оГци, отчасти за счет разницы в содержании оГци, между крайними квартилями достоверно различалось ($p = 0,033$). У пациентов с самыми высокими уровнями гАрг (Q4) оно было почти в 2 раза выше.

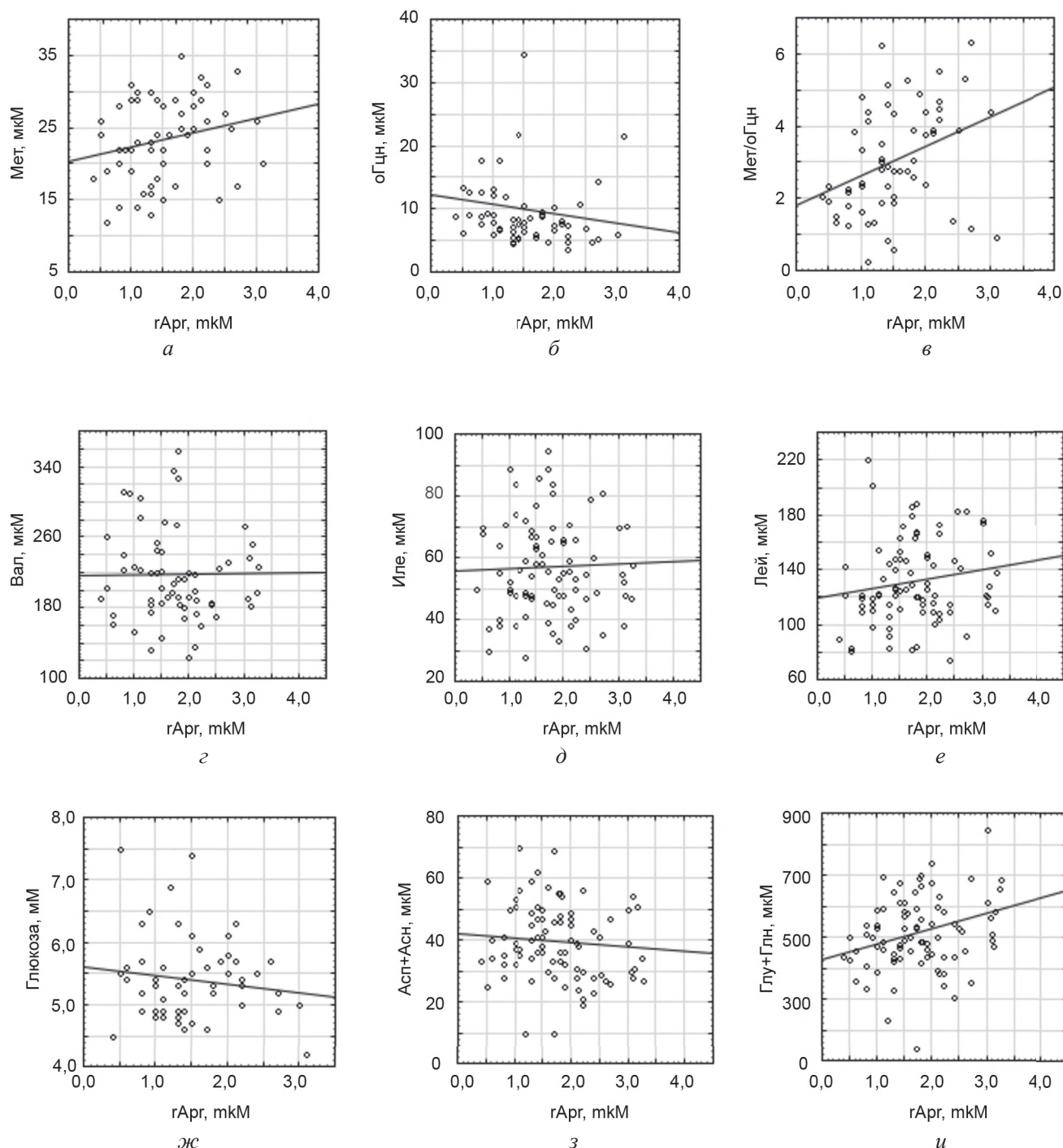
Обсуждение. У пациентов с многососудистым поражением коронарного русла имела артериальная гипертензия и хроническая сердечная недостаточность III функционального класса (фракция выброса левого желудочка не менее 50% от должного уровня). Кроме того, у большинства пациентов к моменту операции была избыточная масса тела, составившая в среднем $28,4 \pm 3,6$ кг/м². ИМТ у них положительно коррелировал с уровнем глюкозы, но не гАрг или соотношением Мет/оГци. Нарушение обмена липидов привело у обследованных пациентов к существенному нарушению кровотока в сердечной мышце. К моменту операции при рассмотрении поквартильного распределения лабораторно-диагностических показателей в зависимости от ИМТ, различий между ними, как правило, не наблюдалось (см. табл. 1). У четверти пациентов ($n=18$) ИМТ был ниже $25,3$ кг/м², а пониженный уровень гАрг < $1,4$ мкМ встречался у 8 из них. Остальные 56 пациентов с повышенным ИМТ в 47% имели пониженный уровень гАрг. Таким образом, пониженный уровень гАрг часто встречался у пациентов с пониженным и повышенным ИМТ. Как показало настоящее исследование, уровень гАрг ниже $1,4$ мкМ наблюдался, примерно, у половины обследованных и не зависел от ИМТ и уровня глюкозы. По данным современной литературы, эта часть пациентов может быть отнесена к группе более высокого риска возникновения острых ишемических осложнений [2, 6, 28].

Некодируемая минорная аминокислота гАрг известна в качестве предиктивного маркера острых ишемических событий у пациентов с нарушениями кровообращения,

обладая некоторыми преимуществами, перед другими, в том числе, уретическими пептидами [1]. Низкие уровни гАрг тесно связаны с повышенной смертностью: относительные риски сердечно-сосудистых заболеваний и смерти от всех причин более чем удвоились (+ 120%) на единицу снижения величины гАрг (мкМ) [3]. Этими авторами выявлено, что у пациентов с уровнем гАрг меньше $0,87$ мкМ смертность в 2 раза выше, чем у пациентов с уровнем гАрг выше $1,4$ мкМ, для которых обнаружено статистически значимое увеличение смертности на 25% по сравнению с популяционной когортой.

В нашей работе показано, что у близких по возрасту доноров мужчин и женщин гАрг варьируется в пределах $2,3$ ($1,8-3,1$) [5], что несколько выше, чем в общей популяции из европейского исследования $1,9$ ($1,7-2,4$) мкМ [4, 5], и значительно выше, чем в обследованной группе пациентов с ИБС $1,4$ ($1,0-2,0$) мкМ. Кроме того, в предыдущем нашем исследовании [7], показано, что значительное высвобождение аминокислот предшествует активации фибринолиза, может возникать повышение уровней гАрг. На эту связь также указывают работы по изучению транспорта катионных аминокислот через клеточные мембраны [29]. Это следует учитывать при значительной активации внутрисосудистого свертывания и фибринолиза.

В работах последних лет с появлением современных методов анализа спектра аминокислот плазмы обнаружены новые связи между нарушениями липидного обмена и балансом аминокислот. В этих работах установлены некоторые устойчивые закономерности, прежде всего, в сдвигах аминокислот, которые после трансаминирования сразу становятся кетокислотами-участниками



Диаграммы рассеяния, отражающие связь уровня гАрг с другими показателями: Мет (а), оГЦн (б), соотношением Мет/оГЦн (в), Вал (г), Иле (д), Лей (е), глюкозой (ж), Асп+Асн (з), Глу+Глн (и).

цикла Кребса, как, например, Глу [30], и разветвленными кетокислотами, которые способны, превращаясь в пропионил-КоА, и далее через метилмалонил-КоА-мутазную реакцию пополнять цикл Кребса [31, 32]. Продукты дезаминирования этих аминокислот могут в клетках быть источниками начальных субстратов для биосинтеза глюкозы или заменять её в окислительном метаболизме, пополняя пул кислот цикла Кребса. Другие аминокислоты после декарбоксилирования способ-

ны окисляться подобно жирным кислотам по пути утилизации ацетил-КоА.

Настоящее исследование показало, что из всего спектра аминокислот и производных показателей только соотношение Мет/оГЦн и сами эти аминокислоты характеризуются корреляционной связью с уровнями гАрг. Так же как и в отношении гАрг, у этих аминокислот не обнаружена корреляционная связь с ИМТ. Только у 12 пациентов из 74 был ИМТ ниже 25, но значимого от-

Распределение показателей в соответствии с уровнем гАрг в плазме пациентов

Показатели	Квартили гАрг				P_{Q1-Q4}
	Q1 ≤1,0мкМ	Q2 1,1–1,4 мкМ	Q3 1,5–2,0 мкМ	Q4 ≥2,1 мкМ	
Возраст, лет	62 (60 – 67)	64 (59 – 65)	58 (57 – 65)	60 (54 – 62)	0,20
ИМТ, кг/м ²	29,6 (25,1 – 32,5)	29,2 (25,6 – 30,8)	28,7 (26,0 – 30,1)	27,0 (25,3 – 29,1)	0,50
Мет, мкМ	22 (19 – 28)	23 (17 – 27)	25 (20 – 28)	26 (20 – 29)	0,27
оГци, мкМ	9,2 (7,8 – 12,8)	7,2 (5,6 – 10,2)	7,9 (6,4 – 9,6)	6,9 (5,2 – 8,2)	0,022
оГлт, мкМ	3,0 (2,3 – 4,4)	4,1 (3,0 – 4,7)	3,2 (2,7 – 4,4)	3,0 (1,3 – 5,4)	0,98
Мет/оГци	2,2 (1,7 – 2,4)	3,0 (1,6 – 4,3)	2,8 (2,4 – 4,4)	4,2 (3,8 – 4,7)	0,033
Цитруллин, мкМ	25 (21 – 29)	27 (21 – 29)	30 (22 – 36)	25 (20 – 29)	0,79
Вал, мкМ	223 (172 – 261)	220 (183 – 254)	212 (192 – 221)	170 (160 – 200)	0,145
Иле, мкМ	52 (40 – 68)	52 (48 – 68)	64 (55 – 70)	53 (40 – 70)	0,82
Лей, мкМ	115 (99 – 121)	125 (111 – 143)	148 (115 – 163)	116 (108 – 167)	0,62
Глюкоза, мМ	5,4 (4,9 – 5,7)	4,9 (4,8 – 5,4)	5,6 (5,3 – 5,9)	5,4 (5,0 – 5,6)	0,72
Асп+Асн, мкМ	37 (32 – 50)	43 (36 – 54)	46 (38 – 50)	31 (27 – 47)	0,36
Глу+Глн, мкМ	473 (409 – 531)	464 (428 – 603)	543 (463 – 593)	456 (384 – 528)	0,89
Холестерин, мМ	3,9 (2,9 – 5,1)	4,4 (3,8 – 5,3)	4,1 (3,7 – 4,8)	4,7 (3,4 – 6,8)	0,20
Общий белок, г/л	71 (68 – 74)	73 (70 – 79)	73 (71 – 74)	74 (71 – 75)	0,15
Фибриноген, г/л	3,2 (2,9 – 3,3)	3,1 (2,9 – 3,6)	3,2 (2,8 – 3,5)	3,2 (2,5 – 4,2)	0,57
АлАТ, Ед/л	18 (14 – 33)	22 (16 – 31)	25 (17 – 35)	21 (18 – 38)	0,46
АсАТ, Ед/л	17 (15 – 23)	21 (19 – 26)	22 (21 – 30)	21 (18 – 35)	0,075
Мочевина, мМ	5,8 (4,6 – 6,1)	5,5 (5,0 – 6,5)	5,5 (4,3 – 6,5)	5,0 (4,8 – 6,1)	0,61
Креатинин, мкМ	84 (71 – 92)	84 (76 – 102)	96 (78 – 107)	83 (74 – 89)	0,98
ОИМ в анамнезе, %	58	56	64	53	0,37

личия в содержании Мет у них по сравнению с остальными пациентами не обнаружено. Из данных других исследований известно, что повышение ИМТ и оГци часто встречается одновременно у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, но корреляция между этими показателями может отсутствовать, так как нарушение реакций метилирования (гипометилирование) и ресинтеза Мет из Гци (реметилирование) не имеет прямых связей с регуляцией обмена липидов [33]. При диабете второго типа уровни Мет могут не возрастать, хотя часто можно наблюдать увеличенный уровень оГци, ассоциированный с нарушением функции нефрона [34]. Из данных литературы известно, что уровни аминокислот Глу и Глн повышены у пациентов с ожирением [14, 30]. В нашем исследовании обнаружена положительная корреляционная связь между содержанием Глу и Глн с гАрг (рис., и).

Гци является продуктом использования Мет в реак-

циях трансметилирования, протекающих особенно интенсивно при росте и обновлении клеток, при активации регуляторных процессов и обновлении клеточных белков [20, 35].

Содержание оГци в крови является результатом соотношения скоростей реакций утилизации Мет, включая путь транссульфирования в тканях и реметилирования Гци в виде S-аденозил-Гци [15]. Наиболее интенсивно реакции с участием Мет и Гци в норме протекают в тканях печени и почек [36]. Таким образом, уровень Мет очень сильно связан с метаболизмом Гци. Поэтому в случае отсутствия данных о содержании оГци, что часто встречается в литературе, затруднительна интерпретация сдвигов уровня Мет в плазме крови и более точное определение роли Мет в патогенезе и диагностике сердечно-сосудистых заболеваний. Повышенный уровень оГци соответствует высокому содержанию S-аденозил-Гци в клетках. Последний является ингибитором процессов трансметилирования, что при-

водит в свою очередь к феномену гипометилирования [11, 12]. При рассмотрении данных литературы обращает на себя внимание очень редкие случаи отклонений в содержании Мет от общепринятого референтного интервала 6 - 40 мкМ. В подавляющем числе исследований сдвиги в содержании Мет изучают путем анализа размахов колебаний в когортах с высокими и низкими значениями этой аминокислоты и относительно групп сравнения. В частности, в работах последних лет получены данные о значительных изменениях уровней Мет при сердечно-сосудистых заболеваниях [25, 37]. В частности, показано, что сдвиг уровня Мет в сторону понижения ассоциируется с увеличением риска острого инфаркта миокарда у пациентов с высоким уровнем циркулирующих ЛПНП и других атерогенных липидов [25]. Интерпретация данных существенно улучшается, если одновременно с уровнем Мет имеется возможность оценить уровень оГци, так как высокий уровень этого аминотиола указывает на возможность гипометилирования и недостаточной скорости реметилирования Гци и поступления Мет в общий кровоток не за счет пищевых источников, а за счет реакций с участием витаминов В12 и фолиевой кислоты. Известно, что при гипергомоцистеинемии в тканях наблюдается высокое содержание S-аденозилметионина, являющегося сильным ингибитором метилтрансфераз, в результате чего для метилирования различных субстратов, включая нуклеиновые кислоты и белки, требуются более высокие уровни Мет в крови и S-аденозилметионина в клетках. Как показало настоящее исследование, у пациентов с уровнем гАрг менее 1,40 мкМ соотношение Мет/оГци было в среднем ниже 2. У пациентов с уровнем гАрг выше 1,4 мкМ соотношение Мет/оГци превышало значение 2,5, а при уровне гАрг выше 2,2 мкМ оно превышало значение 3,8 (табл. 3). При низком уровне гАрг снижение соотношения Мет/оГци до среднего уровня 1,7 более чем у 62% пациентов наблюдалось при невысоких (до 12 мкМ) значениях оГци, за счет понижения содержания Мет. Таким образом, у пациентов одновременно со снижением активности АГАТ-реакции, в которой образуется гАрг и предшественник креатина гуанидинуксусная кислота, наблюдается снижение превалирования уровня Мет над Гци. Это, согласно современным представлениям [11, 12], может приводить к феномену гипометилирования. В современных исследованиях отмечается, что понижение уровня Мет в плазме может быть связано с повышенным риском развития ОИМ среди групп пациентов с высоким уровнем циркулирующего ЛПНП-холестерина или апо В [25]. Значительное понижение уровня Мет отмечали также и у пациентов, перенесших ишемический инсульт [38].

Уровни гАрг ниже 1,4 мкМ у пациентов с острым коронарным синдромом, наблюдавшемся в возрасте от 18 до 85 лет, обладают чувствительностью для определения рисков инфаркта или инсульта на уровне 25% [2]. В настоящем исследовании показано, что понижение соотношения Мет/оГци ниже 1,7 указывает на дополнительное расширение нарушений метаболизма у этих пациентов. Можно считать, что среди характерных метаболических сдвигов, определяющих наиболее важные отклонения, имеются следующие: 1) нарушение обмена липидов, 2) угнетение ключевой реакции образования креатина (АГАТ-реакции), 3) нарушение реакций трансметилирования с участием Мет и реметилирования Гци, а также связанных с этими реакциями сигнальных путей. Для развивающейся современной лабораторной диагностики с применением метаболомного анализа указанные метаболические пути и отдельные метаболиты могут быть рекомендованы при учете

главных целей аналитического метода.

Выводы. У пациентов с ИБС и недостаточностью кровообращения в результате значительных сдвигов метаболизма липидов наблюдались выраженные отклонения в гомеостазе аминокислот-участников процессов метилирования. Примерно у половины пациентов непосредственно перед операцией по реваскуляризации миокарда обнаружен пониженный уровень гАрг, которому соответствовало снижение уровня Мет/оГци. Показатель Мет/оГци, отражая в основном баланс метилирования (трансметилирования) и реметилирования, в меньшей степени подвержен колебаниям, чем содержание Мет или оГци и характеризуется более тесной связью с уровнем гАрг. Соотношение Мет/оГци, тесно коррелируя с уровнем гАрг, обнаруживает связь активации АГАТ-реакции, и реакций трансметилирования и реметилирования Гци, выделяя когорту пациентов с наиболее глубокими и опасными изменениями тканевого метаболизма. Соотношение Мет/оГци, уровни гАрг и Глн у пациентов с ИБС не были связаны с варьированием ИМТ и содержанием глюкозы, что указывает на их дополнительное диагностическое и, возможно, прогностическое значение. Целесообразны дальнейшие исследования диагностического и прогностического значения гАрг и соотношения Мет/оГци у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Благодарности. Авторы выражают благодарность менеджменту ПСПбГМУ им. И.П. Павлова за поддержку в организации исследования.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках выполнения государственного задания.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-4, 6,7,10-15, 17-20,22-25, 27-30,32-38 см. REFERENCES)

- Жлоба А.А., Субботина Т.Ф., Молчан Н.С. Значение определения уровня гомоаргинина у пациентов с ишемической болезнью сердца при операциях реваскуляризации миокарда. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63(5): 281-6.
- Титов В. Н., Рожкова Т.А., Каминная В.И., Алчинова И.Б. Атеросклероз и атероматоз - два последовательных нарушения метаболизма, патология биологических функций трофологии и функции эндоэкологии. Основы профилактики ишемической болезни сердца. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63(4): 196-204.
- Ариповский А. В., Титов В.Н. Биологически активные пептиды в регуляции метаболизма. Пептоны, аминокислоты, жирные кислоты, липопротеины, липиды и действие нутрицевтиков. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64(1): 14-23.
- Субботина Т.Ф., Жлоба А.А., Алексеевская Е.С., Бируля И.В. Интерпретация аминокислотного профиля плазмы крови с использованием полимаркерного подхода. *Ученые Записки СПбГМУ*. 2015; 22(4): 76-80.
- Жлоба А.А. Лабораторная диагностика при гипергомоцистеинемии. *Клинико-лабораторный консилиум*. 2009; 26(1): 49-60.
- Жлоба А.А., Субботина Т.Ф., Шипаева К.А. Способ определения содержания гомоаргинина в плазме крови и других биологических жидкостях человека. Патент РФ. № 2609873; 2017.
- Жлоба А.А., Маевская Е.Г. Дисфункция анаплеротического пути энергетического метаболизма от аминокислот к сукцинату у лиц старшей возрастной группы. *Артериальная Гипертензия*. 2011; 17(1): 74-8.

REFERENCES

- Raedle-Hurst T., Mueller M., Meintzer A., März W., Dschietzig T. Homocysteine - A prognostic indicator in adolescents and adults with complex congenital heart disease? Fukumoto Y., ed. *PLoS One* 2017; 12(9): e0184333.

2. Atzler D., Baum C., Ojeda F., Keller T., Cordts K., Schnabel R.B. et al. Low homoarginine levels in the prognosis of patients with acute chest pain. *J. Am. Heart Assoc.* 2016; 5(4): e002565.
3. März W., Meinitzer A., Drechsler C., Pilz S., Krane V., Wanner C. Homoarginine as a biomarker for the risk of mortality. Patent US 9,506,909 B2; 2016.
4. Atzler D., Appelbaum S., Cordts K., Ojeda F.M., Wild P.S., Münzel T., et al. Reference intervals of plasma homoarginine from the German Gutenberg Health Study. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2016; 54(7): 1231-7.
5. Zhloba A.A., Subbotina T.F., Molchan N.S. The value of detection of homoarginine level in patients with ischemic heart disease under operations of myocardium re-vascularization. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2018; 63(5): 281-6. (in Russian)
6. Niekamp C., Atzler D., Ojeda F.M., Sinning C.R., Lackner K.J., Böger R.H., et al. Cross-sectional associations between homoarginine, intermediate phenotypes, and atrial fibrillation in the community—The Gutenberg Health Study. *Biomolecules*. 2018; 8(3) pii: E86.
7. Zhloba A.A., Subbotina T.F., Lupan D.S., Bogova V.A., Kusheleva O.A. Arginine and lysine as products of basic carboxypeptidase activity associated with fibrinolysis. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2012; 6(3): 261-5.
8. Titov V. N., Rozhkova T.A., Kaminnaya V.I., Alchinova I.B. Atherosclerosis and atheromatosis are consecutive metabolic disorders. Pathology of the biological functions of trophology and endoecology is the basis for ischemic heart disease prevention. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2018; 63(4): 196-204. (in Russian)
9. Aripovsky A.V., Titov V.N. Biologically active peptides in metabolism regulation. Peptons, peptides, amino acids, fatty acids, lipoproteins, lipids, and the effect of nutraceuticals. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2019; 64(1): 14-23. (in Russian)
10. Maltais-Payette I., Boulet M.M., Prehn C., Adamski J., Tchernof A. Circulating glutamate concentration as a biomarker of visceral obesity and associated metabolic alterations. *Nutr. Metab. (Lond.)*. 2018; 15: 78.
11. Yi P., Melnyk S., Pogribna M., Pogribny I.P., Hine R.J., James S.J. Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. *J. Biol. Chem.* 2000; 275(38): 29318-23.
12. Xiao Y., Su X., Huang W., Zhang J., Peng C., Huang H. et al. Role of S-adenosylhomocysteine in cardiovascular disease and its potential epigenetic mechanism. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2015; 67: 158-66.
13. Laposata's Laboratory Medicine: Diagnosis of Disease in the Clinical Laboratory. 3rd ed. Laposata M., ed.; 2019. Available at: <https://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2503§ionid=201361245> (Accessed 7 May 2019).
14. Geidenstam N., Magnusson M., Danielsson A.P.H., Gerszten R.E., Wang T.J., Reinius L.E. et al. Amino acid signatures to evaluate the beneficial effects of weight loss. *Int. J. Endocrinol.* 2017; 6490473.
15. Dhar I., Svingen G.F.T., Ueland P.M., Lysne V., Svenningsson M.M., Tell G.S., Plasma cystathionine and risk of incident stroke in patients with suspected stable angina pectoris. *J. Am. Heart Assoc.* 2018; 7(17): e008824.
16. Subbotina T.F., Zhloba A.A., Alekseevskaya E.S., Birulya I.V. Interpretation of plasma amino acid profile using multiple marker approach. *Uchenye Zapiski SPbGMU*. 2015; 22(4): 76-80. (in Russian)
17. Fukagawa N.K., Martin J.M., Wurthmann A., Prue A.H., Ebenstein D., O'Rourke B. Sex-related differences in methionine metabolism and plasma homocysteine concentrations. *Am. J. Clin. Nutr.* 2000; 72(1): 22-9.
18. Midttun Ø., Theofylaktopoulos D., McCann A., Fanidi A., Muller D.C., Meyer K. Circulating concentrations of biomarkers and metabolites related to vitamin status, one-carbon and the kynurenine pathways in US, Nordic, Asian, and Australian populations. *Am. J. Clin. Nutr.* 2017; 105(6): 1314-26.
19. Lepage N., McDonald N., Dallaire L., Lambert M. Age-specific distribution of plasma amino acid concentrations in a healthy pediatric population. *Clin. Chem.* 1997; 43(12): 2397-402.
20. Zhang N. Role of methionine on epigenetic modification of DNA methylation and gene expression in animals. *Anim. Nutr.* 2018; 4(1): 11-6.
21. Zhloba A.A. Laboratory diagnosis in hyperhomocysteinemia. *Kliniko-laboratornyi Konsilium*. 2009; 26(1): 49-60. (in Russian)
22. Garlick P.J. Toxicity of methionine in humans. *J. Nutr.* 2006; 136(6 Suppl):1722S-1725S.
23. Shapira N. Commentary: differential effects of high-protein diets derived from soy and casein on blood-brain barrier integrity in wild-type mice. *Front Nutr.* 2018; 5: 67.
24. Dhar I., Svingen G.F.T., Pedersen E.R., DeRatt B., Ulvik A., Strand E. Et al. Plasma cystathionine and risk of acute myocardial infarction among patients with coronary heart disease: results from two independent cohorts. *Int. J. Cardiol.* 2018; 266: 24-30.
25. Dhar I., Lysne V., Seifert R., Svingen G.F.T., Ueland P.M., Nygård O.K. Plasma methionine and risk of acute myocardial infarction: Effect modification by established risk factors. *Atherosclerosis*. 2018; 272: 175-181.
26. Zhloba A.A., Subbotina T.F., Shipaeva K.A. The way for determining the content of homoarginine in blood plasma and other biological fluids of human. Patent RF N 2609873; 2017. (in Russian)
27. Zhloba A.A., Subbotina T.F. Homocysteinylation score of high-molecular weight plasma proteins. *Amino Acids*. 2014; 46(4): 893-9.
28. Meinitzer A., Puchinger M., Winklhofer-Roob B.M., Rock E., Ribalta J., Roob J.M. et al. Reference values for plasma concentrations of asymmetrical dimethylarginine (ADMA) and other arginine metabolites in men after validation of a chromatographic method. *Clin. Chim. Acta; Int. J. Clin. Chem.* 2007; 384(1-2): 141-8.
29. Chafai A., Fromm M.F., König J., Maas R. The prognostic biomarker L-homoarginine is a substrate of the cationic amino acid transporters CAT1, CAT2A and CAT2B. *Sci. Rep.* 2017; 7: 4767.
30. Maltais-Payette I., Boulet M.M., Prehn C., Adamski J., Tchernof A. Circulating glutamate concentration as a biomarker of visceral obesity and associated metabolic alterations. *Nutr. Metab. (Lond.)*; 2018; 15: 78.
31. Zhloba A.A., Maevskaya E.G. The dysfunction of anaplerotic pathway of energy metabolism from amino acids to succinate in the elderly. *Arterial'naya Gipertenziya*. 2011; 17(1): 74-8. (in Russian)
32. Geidenstam N., Al-Majdoub M., Ekman M., Spégl P., Ridderstråle M. Metabolite profiling of obese individuals before and after a one year weight loss program International. *J. Obes.* 2017; 41: 1369-78.
33. Libert D.M., Nowacki A.S., Natowicz M.R., Metabolomic analysis of obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes: amino acid and acylcarnitine levels change along a spectrum of metabolic wellness. *Peer J.* 2018; 6: e5410.
34. Tessari P., Coracina A., Kiwanuka E., Vedovato M., Vettore M., Valerio A. et al. Effects of insulin on methionine and homocysteine kinetics in type 2 diabetes with nephropathy. *Diabetes*. 2005; 54(10): 2968-76.
35. Gao J., Cahill C.M., Huang X., Roffman J.L., Lamon-Fava S., Fava M. et al. S-adenosyl methionine and transmethylation pathways in neuropsychiatric diseases throughout life. *Neurotherapeutics*. 2018; 15(1):156-75.
36. Pacana T., Cazanave S., Verdianelli A., Patel V., Min H.-K., Mirshahi F. et al. Dysregulated hepatic methionine metabolism drives homocysteine elevation in diet-induced nonalcoholic fatty liver disease *PLoS One*. 2015; 10(8): e0136822.
37. Joseph J., Loscalzo J. Methoxistasis: Integrating the roles of homocysteine and folic acid in cardiovascular pathobiology. *Nutrients*. 2013; 5(8): 3235-56.
38. Goulart V.A.M., Sena M.M., Mendes T.O., Menezes H.T., Cardeal Z.L., Paiva M.J.N. et al. Amino acid biosignature in plasma among ischemic stroke subtypes. *BioMed Res. Int.* 2019; Article ID 8480468. <https://doi.org/10.1155/2019/8480468>.

Поступила 20.05.19
Принята к печати 25.06.19

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Гусакова А.М.¹, Сулова Т.Е.¹, Рябов В.В.^{1,2,3}, Керчева М.А.¹

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МУЛЬТИПЛЕКСНОГО АНАЛИЗА НА ПЛАТФОРМЕ LUMINEX В КОМПЛЕКСНОЙ ОЦЕНКЕ ДИНАМИКИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ БИОМАРКЕРОВ У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ ИНФАРКТОМ МИОКАРДА

¹ ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»,
НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, 634012, Томск, Россия;

² ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 634050, Томск, Россия;

³ ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», 634050, Томск, Россия

Многмаркерный подход способен более точно отражать ключевые механизмы патогенеза и биохимических взаимодействий, по сравнению с использованием отдельных показателей. В связи с этим наблюдается стабильно растущий интерес к разработке и использованию разнообразных комбинаций биомаркеров в оценке прогноза и стратификации сердечно-сосудистого риска у пациентов широкого кардиологического профиля. Технология мультиплексного анализа на платформе Luminex является оптимальным инструментом для одновременного количественного определения комплекса различных биомаркеров в одном образце. С помощью диагностической мультимаркерной панели MILLIPLEX® MAP Human Cardiovascular Disease Panel было показано многократное увеличение содержания FABP, тропонин I, CK-MB, BNP, Nt-proBNP, BNP в течение первых 24 часов после ИМ, снижающееся через 6 месяцев с высокой степенью достоверности. Не выявлено статистически значимых отличий в содержании LIGHT между этапами наблюдения, а также в сравнении с референсным диапазоном концентраций. Количество LIGHT в первые сутки ИМ продемонстрировало сильные позитивные ассоциации с маркерами повреждения миокарда и миокардиального стресса. В первые сутки ИМ установлено значительное увеличение содержания ESM-1, снижающееся через 6 месяцев после ИМ до уровня референсных значений. Корреляционный анализ выявил наличие взаимосвязей ESM-1 с уровнями Тропонина I и BNP. Показано значительное увеличение провоспалительного цитокина OSM в первые сутки ИМ, снижающееся в отдаленном постинфарктном периоде до референсных значений. Показатель OSM продемонстрировал прямые взаимосвязи с содержанием Тропонина I, CK-MB, Nt-proBNP и BNP. Использование диагностической мультимаркерной панели MILLIPLEX® MAP Human Cardiovascular Disease Panel 1 даёт возможность выполнить одновременный количественный анализ 11 биохимических показателей, патогенетически связанных с воспалением, атерогенезом, эндотелиальной дисфункцией и некрозом миокарда. Полученные результаты могут быть использованы для повышения эффективности комплексной диагностики у пациентов, перенесших первичный инфаркт миокарда с подъемом сегмента ST.

Ключевые слова: инфаркт миокарда; лабораторная диагностика; биомаркеры; xMAP® технология; мультиплексный анализ.

Для цитирования: Гусакова А.М., Сулова Т.Е., Рябов В.В., Керчева М.А. Использование мультиплексного анализа на платформе Luminex в комплексной оценке динамики сердечно-сосудистых биомаркеров у пациентов с острым инфарктом миокарда. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (9): 525-529. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821.0869-2084-2019-64-9-525-529>

Gusakova A.M.¹, Suslova T.E.¹, Ryabov V.V.^{1,2,3}, Kercheva M.A.¹

MULTIPLEX ANALYSIS ON THE LUMINEX PLATFORM IN COMPLEX ESTIMATION OF CARDIOVASCULAR BIOMARKER DYNAMICS IN PATIENTS WITH ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION

¹ Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, 634012, Tomsk, Russia;

² Siberian State Medical University, 634050, Tomsk, Russia;

³ National Research Tomsk State University, 634050, Tomsk, Russia

The multimarker approach more accurately reflects the key mechanisms of pathogenesis and biochemical interactions, compared with the use of individual indicators. It is a reason of steadily growing interest in the development and use of various combinations of biomarkers in assessing the prognosis and stratification of cardiovascular risk in patients with a wide range of cardiological profiles. Multiplex analysis technology on the Luminex platform is the best tool for the simultaneous quantitative determination of a complex of different biomarkers in a single. Using the MILLIPLEX® MAP Human Cardiovascular Disease Panel, a multiple-fold increase of FABP, Troponin I, CK-MB, BNP, Nt-proBNP, BNP in the first 24 hours after MI, decreasing in 6 months with a high degree of confidence, was shown. There were no differences in the content of LIGHT between the stages of observation, as well as in comparison with the reference range. The content of LIGHT on the first day of MI showed strong positive associations with markers of damage of myocardium and myocardial stress. On the first day of MI, a significant increase in the content of ESM-1, decreasing in 6 months after MI to the reference values was found. Strong positive associations of ESM-1 with Troponin I and BNP levels were established. A significant increase of proinflammatory cytokine OSM on the first day of MI, decreasing in the late post-infarction period to reference values was shown. Correlation analysis revealed direct relationships of OSM with Troponin I, CK-MB, Nt-proBNP and BNP. The use of the MILLIPLEX® MAP Human Cardiovascular Disease Panel 1 diagnostic multimarker panel allowed for the simultaneous quantitative analysis of 11 biochemical parameters, associated with inflammation, atherogenesis, endothelial dysfunction, ischemia and myocardial necrosis. The results can be used to improve the effectiveness of complex diagnostics in patients with primary myocardial infarction with ST segment elevation.

Для корреспонденции: Гусакова Анна Михайловна, канд. фарм. наук, науч. сотр. отд-ния функциональной и лабораторной диагностики; e-mail: mag_a@mail.ru

Key words: myocardial infarction; laboratory diagnostics; biomarkers; xMAP® technology; multiplex analysis.

For citation: Gusakova A.M., Suslova T.E., Ryabov V.V., Kercheva M.A. Multiplex analysis on the luminex platform in complex estimation of cardiovascular biomarker dynamics in patients with acute myocardial infarction. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (9): (in Russ.) 525-529. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-9-525-529>

For correspondence: Gusakova A.M., PhD, researcher of the department of functional and laboratory diagnosis; e-mail: mag_a@mail.ru

Information about authors:

Gusakova Anna <https://orcid.org/0000-0002-3147-3025>

Suslova Tatiana <http://orcid.org/0000-0001-9645-6720>

Ryabov Vyacheslav <http://orcid.org/0000-0002-4358-7329>

Kercheva Maria <https://orcid.org/0000-0003-1444-1037>

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 16.05.2019
Accepted 25.06.2019

Введение. Инфаркт миокарда (ИМ) – одна из острых клинических форм ишемической болезни сердца (ИБС). Несмотря на успехи современной медицинской науки, а также широкое применение в клинической практике различных методов и режимов реперфузии миокарда, алгоритмов и рекомендаций по ведению больных с ИМ, широкое использование лекарственных средств различных фармакологических групп, смертность от ИМ остаётся очень высокой [1-2]. Биохимические маркеры являются неотъемлемым ежедневным инструментом для своевременной диагностики, коррекции лечения и прогнозирования риска развития сердечно-сосудистых осложнений. Обзор исследований последних лет выявил тенденцию к использованию в оценке прогноза и стратификации сердечно-сосудистого риска у пациентов широкого кардиологического профиля разнообразных комбинаций маркеров [3-7]. Предполагается, что комплекс биомаркеров будет более точно отражать различные процессы и патофизиологические механизмы ИМ, развития и прогрессирования неблагоприятных сердечно-сосудистых событий в постинфарктном периоде, по сравнению с использованием отдельных показателей. Однако обзор публикаций свидетельствует о том, что большинство предлагаемых мультимаркерных моделей либо не обладает достаточной диагностической и прогностической ценностью, либо изучены на малой выборке и требуют подтверждения.

Технология мультиплексного анализа на платформе Luminex (xMAP® технология) является важным инструментом для одновременного количественного определения комплекса различных биомаркеров в одном образце. xMAP® технология характеризуется рядом существенных преимуществ, таких как, открытая аналитическая платформа, позволяющая использовать диагностические тест-системы, наборы и реагенты различных производителей, небольшой объём исследуемого образца, высокая производительность, позволяющая за максимально короткий промежуток времени выполнить определение до 50 отдельных аналитов в одном исследуемом образце [8-9], высокая чувствительность, широкий диапазон определяемых концентраций и полностью автоматизированный процесс обработки данных и расчета концентрации. В настоящее время для изучения сердечно-сосудистых заболеваний с использованием xMAP® технологии доступны несколько мультимаркерных панелей,

однако сведения о применении у пациентов с острым первичным инфарктом миокарда с подъёмом сегмента ST (ИМпST) малочисленны.

Цель исследования - изучить динамику кардиоваскулярных биомаркеров у пациентов с острым первичным ИМпST в первые сутки и через 6 мес после ИМ с использованием мультиплексного иммуноанализа и диагностической панели MILLIPLEX® MAP Human Cardiovascular Disease Panel 1 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) на приборе FLEXMAP 3D® System (Luminex® Corporation, США).

Материал и методы. В исследование включено 17 пациентов (58,46±8,54 лет) с острым первичным передним ИМпST, поступивших в палату интенсивной терапии в течение первых 24 ч от начала заболевания. Критерии исключения: возраст >75 лет, неудовлетворительная визуализация сердца, острая недостаточность ЛЖ III-IV функциональный класс по Т. Killip, синусовая брадикардия, наличие постоянной формы фибрилляции предсердий, клапанных пороков сердца, декомпенсация ХСН (III-IV ФК по NYHA), тяжёлая сопутствующая патология. Исследование зарегистрировано в базе ClinicalTrials.gov, идентификационный номер NCT02562651. Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом (выписка из протокола №116). Все пациенты подписывали информированное согласие на участие в исследовании.

У всех пациентов при поступлении в стационар и через 6 мес после ИМ из локтевой вены методом венепункции выполнялся забор крови, полученные образцы инкубировали и центрифугировали при скорости 3000 об/мин. в течение 15 мин при комнатной температуре. Образцы сывороток крови хранились при -40°C. Методом мультиплексного иммуноанализа с использованием системы FLEXMAP 3D Luminex Corporation и диагностической панели Human Cardiovascular Disease Panel 1 определяли содержание в сыворотке крови следующих показателей: тропонин I, мозговой натрийуретический пептид (BNP), N-концевой фрагмент мозгового натрийуретического пептида (Nt-proBNP), креатинфосфокиназа фракция MB (CK-MB), сердечный белок, связывающий жирные кислоты (FABP), эндокан-1 (ESM-1), онкостатин М (OSM), плацентарный фактор роста (PIGF), хемокиновые лиганды 16 и 6 (CXCL16 и CXCL6), а также лиганд фактора некроза опухоли (LIGHT).

Таблица 1

Характеристика биохимических маркеров, включенных в диагностическую панель MILLIPLEX® MAP Human Cardiovascular Disease Panel 1

Процессы	Биомаркеры
Воспаление	CXCL6, CXCL16, ESM-1, LIGHT, PIGF, OSM
Эндотелиальная дисфункция	ESM-1, PIGF
Нестабильность бляшки	LIGHT
Ишемические повреждения, миокардиальный некроз, дисфункция миокарда	CK-MB, Тропонин I, FABP, BNP, NT-proBNP

Анализ полученных данных осуществлялся с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 10.0 и SPSS 10.0. Проверка нормальности распределения проводилась методом Колмогорова-Смирнова. В связи с малыми объемами выборок и отличием распределений в группах от нормального, все количественные признаки описывались значением медианы (Me) и интерквартильным размахом (Q_{25} - Q_{75}), а также использовались непараметрические критерии. Для попарного сравнения использовался ранговый критерий Краскала-Уолиса. Оценка достоверности различий проводилась с помощью непараметрического критерия Уилкоксона. Для оценки взаимосвязи признаков был рассчитан коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости p принят равным 0,05.

Результаты и обсуждение. Возможности xMAP® технологии позволили нам с высокой чувствительностью выполнить одновременный количественный анализ комплекса из 11 биохимических аналитов, содержащихся в одном образце сыворотки крови больных ИМпСТ в ранние и отдаленные сроки ИМ. Используемая диагностическая панель включает в себя лабораторные показатели, отражающие различные патофизиологические процессы развития и течения сердечно-сосудистых заболеваний (табл.1). В табл. 2 представлены результаты количественного анализа изучаемых биохимических маркеров при поступлении в стационар (исход) и через 6 мес после ИМ. Нормальные (референсные) значения исследуемых аналитов, полученные и рекомендуемые производителем тест-систем MILLIPLEX® MAP KIT, представлены в виде среднего, минимального и максимального значений (C_{cp} ; Мин., Макс.).

Анализ полученных данных показал, что в течение первых 24 ч от начала заболевания концентрации маркеров ишемии и миокардиального некроза – FABP, тропонин I, CK-MB, высвобождающихся в кровь при ИМ

вследствие нарушения целостности клеточных мембран, были ожидаемо многократно выше референсных значений (табл. 2).

Через 6 месяцев после перенесенного ИМ выявлено снижение концентраций указанных показателей с высокой степенью достоверности ($p < 0,0005$).

Содержание маркеров Nt-proBNP и BNP течение первых 24 ч также превышало диапазон референсных значений. В отдаленном постинфарктном периоде Nt-proBNP и BNP статистически значимо снижались по сравнению с исходом ($p < 0,0005$). Принимая во внимание высокую диагностическую и прогностическую значимость данных маркеров в оценке развития СН, смерти от сердечно-сосудистых осложнений и инсульта, можно предположить, что существенное снижение показателей через 6 месяцев после ИМ будет ассоциировано с благоприятным отдаленным постинфарктным прогнозом у наблюдаемых пациентов.

Корреляционный анализ показал наличие выраженных положительных ассоциаций между изучаемыми показателями в первые сутки ИМ (табл. 3).

Высокие концентрации тропонина I также ассоциировались с величиной подъема сегмента ST в первые

Таблица 2

Динамика биохимических маркеров при поступлении в стационар, через 6 месяцев после ИМ и их референсные значения

Показатель	Исход	6 месяцев после ИМ	Референсные значения C_{cp} (Мин.; Макс.)	Значение p
	Me (25%; 75%)	Me (25%; 75%)		
Troponin I, нг/мл	147,48 (18,65; 431,18)	0,06 (0,03; 0,21)	0,240 (0,0; 1,154)	$p=0,0003$
CK-MB, нг/мл	213,63 (125,156; 239,69)	2,85 (1,88; 3,13)	2,036 (0,876; 3,779)	$p=0,0004$
FABP, пг/мл	32155,0 (8058,0; 77051,0)	2717,0 (2045,0; 3684,0)	1956,40 (531,0; 3605,0)	$p=0,0004$
BNP, пг/мл	90,27 (5,260; 279,07)	2,06 (0,31; 4,8)	0,0 (0,0; 0,0)	$p=0,0009$
Nt-proBNP, пг/мл	1127,00 (467,02; 1611,00)	325,64 (235,65; 554,53)	299,85 (0,0; 632,0)	$p=0,022$
PIGF, пг/мл	6,73 (2,54; 14,44)	3,58 (1,44; 6,19)	8,72 (0,0; 39,98)	$p=0,034$
CXCL16, пг/мл	300,10 (220,13; 327,07)	287,86 (233,71; 315,44)	547,30 (430,0; 766,0)	н/д
CXCL6, пг/мл	161,81 (120,55; 265,44)	149,82 (77,86; 237,78)	160,12 (93,19; 287,0)	н/д
LIGHT, пг/мл	148,85 (77,68; 265,31)	82,31 (50,19; 135,24)	337,66 (0,0; 1627,0)	н/д
ESM-1, пг/мл	2950,00 (2012,0; 3923,0)	1401,0 (960,14; 1575,0)	935,5 (650,0; 1720,0)	$p=0,0006$
OSM, пг/мл	46,90 (18,91; 75,73)	13,12 (6,88; 19,58)	22,73 (4,07; 53,83)	$p=0,0005$

Примечание. p – степень достоверности различий исхода и 6 месяцев.

Таблица 3

Результаты корреляционного анализа взаимосвязей между изучаемыми маркерами в первые сутки ИМ

	СК-МВ	FABP	Nt-proBNP	BNP
Тропонин I	R=0,735 p=0,0008	R=0,613 p=0,009	R=0,809 p=0,0001	R=0,925 p=0,0000
BNP	R=0,728 p=0,0009	R=0,591 p=0,0125	R=0,851 p=0,0000	—

сутки ИМ перед чрескожным коронарным вмешательством (R=0,598, p=0,019).

В нашем исследовании у пациентов с острым первичным ИМпST в первые сутки ИМ содержание циркулирующего PIGF, используемого в качестве маркера дисфункции эндотелия, находилось в пределах референсного диапазона, а через 6 месяцев концентрации PIGF статистически значимо снижались по сравнению с исходом (p=0,034).

Содержание CXCL6 на протяжении всех этапов наблюдения было в пределах нормального диапазона значений, без статистически значимых отличий между этапами наблюдения.

Результаты нашего исследования не выявили статистически значимых отличий в содержании хемокина CXCL16 между исходом и отдаленным постинфарктным периодом. Анализ динамики хемокина CXCL16 показал, что концентрации, полученные в первые сутки госпитализации и через 6 мес после, были ниже диапазона референсных значений. Полученные нами результаты подтверждают противоречивость данных о хемокине CXCL16 при сердечно-сосудистых заболеваниях. Так, в исследовании M. Lehrke et al. [10] у пациентов с ишемической болезнью сердца были обнаружены повышенные концентрации CXCL16, положительно коррелирующие с тяжестью острого коронарного синдрома (ОКС). А.М. Jansson et al. [11] в своей работе показали высокие уровни CXCL16 в течение первых 24 часов ОКС, достоверно ассоциированные со смертностью в отдаленном периоде. В то же время, Y. Sheikine et al. [12] выявили снижение уровня CXCL16 как при стабильной, так и при нестабильной стенокардии. Неоднозначность результатов может быть связана с наличием двух форм CXCL16 – трансмембранной и растворимой, выполняющих разные биологические функции.

Анализ динамики биомаркера LIGHT, являющегося членом суперсемейства фактора некроза опухоли, показал, что концентрации маркера в первые 24 часа и через 6 месяцев после ИМ находились в пределах диапазона референсных значений, сравнительный анализ содержания LIGHT между этапами наблюдения не выявил статистически значимых отличий. Однако значения концентраций LIGHT в первые сутки после ИМ продемонстрировали сильные позитивные ассоциации с маркерами повреждения миокарда и миокардиального стресса (табл. 4).

Таблица 4

Корреляционные взаимосвязи показателей LIGHT и OSM в первые сутки ИМ

	Тропонин I	СК-МВ	Nt-proBNP	BNP	FABP
LIGHT	R=0,860 p=0,000009	R=0,517 p=0,034	R=0,806 p=0,00009	R=0,823 p=0,00005	R=0,525 p=0,031
OSM	R=0,797 p=0,0001	R=0,532 p=0,028	R=0,713 p=0,0013	R=0,777 p=0,0002	—

В настоящее время показатель LIGHT используется как маркер, отражающий нестабильность атеросклеротической бляшки. Известно, что LIGHT принимает участие во врожденном и адаптивном иммунных ответах, в регуляции выживания и пролиферации клеток, способствует атерогенезу и дестабилизации бляшки. В ряде работ высокий уровень экспрессии LIGHT наблюдали у пациентов с атеросклерозом и хронической сердечной недостаточностью [13-14]. Отсутствие выраженной динамики и низкие концентрации LIGHT в нашем исследовании могут быть обусловлены характерной особенностью взаимодействия лигандов и рецепторов, а именно, избыточностью сигнала, при которой лиганд может взаимодействовать сразу с несколькими рецепторами, а рецептор принимать сигнал от нескольких лигандов [15].

В первые сутки ИМ содержание ESM-1 было выше диапазона референсных значений. В отдаленном периоде наблюдали значимое снижение (p=0,0006) по сравнению с исходом, при этом уровни сывороточного ESM-1 находились в пределах нормальных. Значения артериального давления более 140/90 у пациентов с ИМпST были ассоциированы с повышенными уровнями ESM-1 при поступлении и спустя 6 мес (p<0,008). Корреляционный анализ выявил наличие взаимосвязей ESM-1 с уровнями Тропонина I и BNP (R_{Троп. I}=0,809 p=0,0001; R_{BNP}=0,569 p=0,017, соответственно). Полученные результаты согласуются с данными литературы, согласно которым ESM-1 экспрессируется в повышенном количестве у пациентов при остром коронарном синдроме [16], инфаркте миокарда [17]. С. Qiu et al. [18] с помощью многофакторного логистического регрессионного анализа показали, что уровни ESM-1 в сыворотке могут быть независимым предиктором серьезных неблагоприятных сердечно-сосудистых событий.

Нами было установлено значительное увеличение провоспалительного цитокина OSM в первые сутки ИМ, что может свидетельствовать о ведущей роли воспаления в этот период ИМ. Содержание OSM значимо снижалось через 6 мес после перенесенного ИМ (p=0,0005) и находилось в диапазоне референсных значений. Согласно данным ряда исследований, основной индуктор синтеза острофазовых белков и белков внеклеточного матрикса OSM вовлечен в патогенез сердечно-сосудистых заболеваний и принимает участие в таких процессах, как воспаление, тканевая регенерация, пролиферация клеток [19-22]. На сегодняшний день информация о количественном анализе и содержании OSM у пациентов с ИМпST ограничена. Обзор публикаций выявил результаты единичных исследований концентрации OSM у пациентов с ИБС, сердечной недостаточностью, артериальной гипертензией, фибрилляцией предсердий и метаболическими нарушениями, демонстрирующие повышение содержания изучаемого маркера во всех случаях [23-26].

Показатель OSM в нашем исследовании продемонстрировал прямые взаимосвязи с широко известными и хорошо изученными маркерами повреждения миокарда и миокардиального стресса (табл. 4). В отдаленном постинфарктном периоде взаимосвязь OSM и тропонина I сохранялась (R=0,751, p=0,0005). Выявленные особенности динамики OSM и анализ полученных ассоциаций согласуются с данными литературы, которые указывают на участие OSM в процессах воспаления и ремоделирования сердца, и возможность использования результатов динамики его концентрации в плазме крови для выявления

пациентов с гипертрофией ЛЖ и избыточным кардиоваскулярным ремоделированием [19].

Выводы.

1. С помощью диагностической мультимаркерной панели MILLIPLEX® MAP Human Cardiovascular Disease Panel было показано многократное увеличение содержания FABP, тропонин I, CK-MB, BNP, Nt-proBNP, BNP в течение первых 24 ч после ИМ, снижающееся через 6 мес с высокой степенью достоверности. Не выявлено статистически значимых отличий в содержании LIGHT между этапами наблюдения, а также в сравнении с референсным диапазоном концентраций. Количество LIGHT в первые сутки ИМ продемонстрировало сильные позитивные ассоциации с маркерами повреждения миокарда и миокардиального стресса.

2. В первые сутки ИМ установлено значительное увеличение содержания ESM-1, снижающееся через 6 мес после ИМ до уровня референсных значений. Корреляционный анализ выявил наличие взаимосвязей ESM-1 с уровнями Тропонина I и BNP.

3. Показано значительное увеличение провоспалительного цитокина OSM в первые сутки ИМ, снижающееся в отдаленном постинфарктном периоде до референсных значений. Показатель OSM продемонстрировал прямые взаимосвязи с содержанием Тропонина I, CK-MB, Nt-proBNP и BNP.

4. Использование диагностической мультимаркерной панели MILLIPLEX® MAP Human Cardiovascular Disease Panel 1 даёт возможность выполнить одновременный количественный анализ 11 биохимических показателей, патогенетически связанных с воспалением, атерогенезом, эндотелиальной дисфункцией, ишемией и некрозом миокарда.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3–18, 20–26 см. REFERENCES)

1. Вишневецкий А. Г., Андреев Е. М., Тимонин С. А. Смертность от болезней системы кровообращения и продолжительность жизни в России. *Демографическое обозрение*. 2016; 1 (3): 6-34.
2. Рекомендации ЕОК по ведению пациентов с острым инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST 2017. *Российский кардиологический журнал* 2018; 23 (5): 103-58.
19. Ковалева О. Н., Кочубей О. А. Онкостатин М и его роль в формировании сердечно-сосудистых заболеваний. *Научные ведомости Белгородского государственного университета*. Сер. Медицина. Фармация. 2014; 11 (182): 5-8.

REFERENCES

1. Vishnevsky AG, Andreev EM, Timonin SA. The mortality from diseases of the circulatory system and life expectancy in Russia. *Demograficheskoe obozrenie*. 2016;3,1: 6-34. (in Russian)
2. 2017 ESC guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal*. 2018; 23 (5): 103-58. (in Russian)
3. Yin X., Subramanian S., Hwang S.J., O'Donnell C.J., Fox C.S., Courchesne P. et al. Protein biomarkers of new-onset cardiovascular disease: prospective study from the systems approach to biomarker research in cardiovascular disease initiative. *Arterioscler. Thromb. Vasc Biol*. 2014; 34: 939-45.
4. Klingenberg R., Aghlmandi S., Räber L., Gencer B., Nanchen D., Heg D. et al. Improved risk stratification of patients with acute coronary syndromes using a combination of hsTnT, NT-proBNP and hsCRP

- with the GRACE score. *Eur. Heart J. Acute Cardiovasc. Care*. 2018 Mar; 7 (2): 129-38.
5. Zethelius B., Berglund L., Sundstrom J., Ingelsson E., Basu S., Larsson A et al. Use of Multiple Biomarkers to Improve the Prediction of Death from Cardiovascular Causes. *N. Engl. J Med*. 2008; 358: 2107-16.
6. Demissei B. G., Cotter G., Prescott M. F., Felker G. M., Filippatos G., Greenberg B. H. et al. A multimarker multi-time point-based risk stratification strategy in acute heart failure: results from the RELAX-AHF trial. *European Journal of Heart Failure*. 2017; 19: 1001-10.
7. Sharma A., Hijazi Z., Andersson U., Al-Khatib S. M., Lopes R. D., Alexander J. H. et al. Use of biomarkers to predict specific causes of death in patients with atrial fibrillation insights From the ARISTOTLE trial. *Circulation*. 2018; 138: 1666-76.
8. Dowall S.D., Graham V.A., Fletcher T., Hewson R. Use and reliability of multiplex bead-based assays (Luminex) at Containment Level 4. *Methods*. 2019; 158: 17-21.
9. Overview of the xMAP Technology. Available at: <https://www.luminexcorp.com/xmap-technology>.
10. Lehrke M., Millington S.C., Lefterova M., Cumarantunge R.G., Szapary P., Wilensky R., Rader D.J., Lazar M.A., Reilly M.P. CXCL16 is a marker of inflammation, atherosclerosis, and acute coronary syndromes in humans. *J. Am. Coll Cardiol*. 2007; 49: 442-9.
11. Jansson A.M., Aukrust P., Ueland T., Smith C., Omland T., Hartford M., Caidahl K. Soluble CXCL16 predicts long-term mortality in acute coronary syndromes. *Circulation*. 2009; 119: 3181-8.
12. Sheikine Y., Bang C.S., Nilsson L., Samnegard A., Hamsten A., Jonasson L., Eriksson P., Sirsjo A. Decreased plasma CXCL16/SR-PSOX concentration is associated with coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2006; 188: 462-6.
13. Dahl C.P., Gullestad L., Fevang B., Holm A.M., Landrø L., Vinje L.E., Fiane A.E., Sandberg W.J. Increased expression of LIGHT/TNFSF14 and its receptors in experimental and clinical heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2008 Apr; 10(4): 352-9.
14. Yuan X., Gu Y., Lai X., Gu Q. LIGHT is increased in patients with coronary disease and regulates inflammatory response and lipid metabolism in oxLDL-induced THP-1 macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Aug; 490(3): 732-8.
15. Aggarwal B.B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2003 Sep; 3(9): 745-56.
16. Kose M., Emet S., Akpinar T. S., Kocaaga M., Cakmak R., Akarsu M., Yuruyen G., Arman Y., Tuke, T. Serum endocan level and the severity of coronary artery disease: a pilot study. *Angiology* 2015; 66(8): 727-31.
17. Chong-Rong Qiu, Qiang Fu, Jian Sui, Qian Zhang, Peng Wei, Yan Wu, Ke Zhu, Yi Lu, Bing Zong. Serum endothelial cell-specific molecule 1 (Endocan) levels in patients with acute myocardial infarction and its clinical significance: a pilot study. *Angiology*. 2017; 68(4): 354-9.
18. Qiu C., Sui J., Zhang Q., Wei P., Wang P., Fu Q. Relationship of endothelial cell-specific molecule 1 level in stress hyperglycemia patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction: a pilot study. *Angiology*. 2016; 67(9): 829-34.
19. Kovalyova O.N., Kochubei O.A. Oncostatin M is a proinflammatory cytokines and its role in the cardiovascular disease. *Nauchnye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta*. Seriya: Meditsina. 2014; 11 (182): 5-8. (in Russian)
20. Hunter J. J., Chien K. R. Signaling pathway for cardiac hypertrophy and failure. *New Engl. J. Med*. 1999; 341:1276-83.
21. Tanaka M., Miyajima A. Oncostatin M, a multifunctional cytokine. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol*. 2003; 1 (149): 39-52.
22. Nagata T., Kai H., Shibata R., Koga M., Yoshimura A., Imaizumi T. Oncostatin M, an interleukin-6 family cytokine, upregulates matrix metalloproteinase-9 through the mitogen-activated protein kinase kinase-extracellular signal-regulated kinase pathway in cultured smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2003; 23: 588-93.
23. Li X., Zhang X., Wei L., Xia Y., Guo X. Relationship between serum oncostatin M levels and degree of coronary stenosis in patients with coronary artery disease. *Clinical Laboratory*. 2014; 60(1): 113-8.
24. Gruson D., Ferracin B., Ahn S.A., Rousseau M.F. Elevation of plasma oncostatin M in heart failure. *Future Cardiol*. 2017; 13(3): 219-27.
25. Ashcheulova T., Kochubei O., Demydenko G., Gerasimchuk N., Maliy A. Oncostatin M, interleukin-6, glucometabolic parameters and lipid profile in hypertensive patients with prediabetes and type 2 diabetes mellitus. *Rom J Diabetes Nutr Metab Dis*. 2017; 24(4): 345-54.
26. Xie J., Zhu S., Dai Q., Lu J., Chen J., Li G., Wu H., Li R., Huang W., Xu B., Xu W. Oncostatin M was associated with thrombosis in patients with atrial fibrillation. *Medicine*. 2017; 96 (18): pe6806.

Поступила 16.05.19

Принята к печати 25.06.19

ИММУНОЛОГИЯ

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Марданлы С.Г.^{1,2}, Арсеньева В.А.¹, Авдонина А.С.¹, Амелина Е.А.¹, Марданлы С.С.^{1,3}

ПЕРВЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА В СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ГЕРПЕСВИРУСОМ ЧЕЛОВЕКА 7 ТИПА

¹ЗАО «ЭКОлаб», 142530, г. Электрогорск Московской обл.;

²Государственный гуманитарно-технологический университет «ГГТУ» ГОУВО Московской обл.,
142611, г. Орехово-Зуево Московской обл.;

³Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика
Н.Ф. Гамалеи Минздрава РФ, 123098, Москва

HHV-7 (Human Herpes virus type 7) - относительно недавно открытый, повсеместно распространенный бета-герпесвирус. В РФ диагностика HHV-7-инфекции осуществляется методом ПЦР, направленным на определение ДНК в сыворотке или плазме крови, при наличии клинических показаний. Лабораторные серологические обследования на HHV-7 не проводятся. В настоящее время в научной литературе сведения о клинических исследованиях HHV-7-инфекции, ее эпидемиологии и роли в этиопатогенезе различных заболеваний представлены недостаточно.

В данной работе приведены результаты разработки набора реагентов (иммуноферментной тест-системы) «ИФА-ВГЧ-7-IgG», предназначенного для выявления специфических антител класса G к HHV-7 методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Проведены исследования чувствительности и специфичности разработанного набора, в том числе на потенциально перекрестно-реактивных образцах, положительных в отношении других герпесвирусных инфекций. В аспекте серологической диагностики исследованы образцы сыворотки детей (167) и пожилых людей (238) на содержание IgG к HHV-7 с подтверждением полученных результатов в реакции непрямой иммунофлюоресценции и реакции иммунного блоттинга. Результаты исследований свидетельствуют о возможности применения разработанной иммуноферментной тест-системы для проведения серологической диагностики HHV-7-инфекции.

Ключевые слова: герпесвирусные инфекции; вирус герпеса человека 7 типа; иммуноферментный анализ.

Для цитирования: Марданлы С.Г., Арсеньева В.А., Авдонина А.С., Амелина Е.А., Марданлы С.С. Первые результаты применения иммуноферментного анализа в серологической диагностике инфекции, вызванной герпесвирусом человека 7 типа. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (9): 530-535. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-9-530-535>
Mardarly S.G.^{1,2}, Arsenyeva V.A.¹, Avdonina A.S.¹, Amelina E.A.¹, Mardarly S.S.^{1,3}

FIRST RESULTS OF APPLICATION OF AN ENZYME IMMUNOASSAY IN THE SEROLOGICAL DIAGNOSTICS OF INFECTION CAUSED BY HERPESVIRUS TYPE 7

¹ CJSC "EKOLab", 142530, Elektrogorsk, Moscow region;

² State educational institution of higher education of the Moscow region;

State Humanitarian University of Technology "GGTU", 142611, Orekhovo-Zuyevo, Moscow region

³ National Research Center of Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N. F. Gamalei of the Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow

HHV-7 (Human Herpes virus type 7) is a relatively recently discovered, ubiquitous beta herpes virus. In Russia, the diagnosis of HHV-7 infection is carried out by PCR, which determines the DNA in serum or plasma, if there are clinical indications. Laboratory serological tests for HHV-7 are not performed. Currently, in the scientific literature, information on clinical studies of HHV-7 infection, its epidemiology, and its role in the etiopathogenesis of various diseases is insufficient.

This article presents the results of the development of a test kit "ELISA-HHV-7-IgG", designed to detect specific IgG to HHV-7 by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Studies of the sensitivity and specificity of the developed test kit, including potential cross-reactive samples positive for other herpesvirus infections, were carried out. In the context of serological diagnostics, we studied samples of the sera of children (n = 167) and old people (n = 238) for the presence of IgG to HHV-7 with confirmation of the results in the indirect immunofluorescence reaction and the immune blotting reaction. The research results are evidence of the possibility of using the developed test kit for serological diagnosis of HHV-7 infection.

Key words: herpesvirus infections; human herpes virus type 7; linked immunosorbent assay.

For citation: Mardarly S.G., Arsenyeva V.A., Avdonina A.S., Amelina E.A., Mardarly S.S. First results of application of an enzyme immunoassay in the serological diagnostics of infection caused by herpesvirus type 7. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika* (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (9): 530-535. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0969-2084-2019-64-9-530-535>

For correspondence: Mardarly Seifaddin Gashimovich, doctor of medical sciences, president CJSC EKOLab; e-mail: ekolab-president@mail.ru

Conflict of interests. The authors declare the absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 15.08.2019

Accepted 22.08.2019

Для корреспонденции: Марданлы Сейфаддин Гашимович, д-р мед/ наук, президент ЗАО «ЭКОлаб», e-mail: ekolab-president@mail.ru

Введение. Вирус герпеса человека 7 типа (Human Herpes virus type 7, HHV-7) был выделен в 1990 г. из Т-лимфоцитов здоровых доноров [12,22]. По классификации его отнесли к семейству бета-герпесвирусов, роду Розеоовирусов [7,11]. В это семейство входят также цитомегаловирус (ЦМВ) и вирус герпеса человека 6 типа (Human Herpes virus type 6, HHV-6). Гибридизационный анализ ДНК показал, что HHV-7, хотя и отличается от остальных герпесвирусов человека, имеет участки, идентичные последовательностям ЦМВ и HHV-6, причем схожесть геномов HHV-6 и HHV-7 составляет 42,5%. Как и HHV-6, HHV-7 является лимфотропным вирусом, реплицирующимся в моноцитах и Т-лимфоцитах [1]. Основным рецептором, с которым взаимодействует HHV-7 в процессе инфицирования клетки, является CD4+ [14,21,23].

HHV-7 широко распространен в человеческой популяции (присутствует практически у 95 % населения), причем у большинства людей его можно обнаружить в периферических мононуклеарах крови [2,10,14,17]. Первичная HHV-7-инфекция, как и в случае остальных герпесвирусных инфекций, чаще всего происходит в раннем возрасте, но немного позднее, чем HHV-6-инфекция, при которой сероконверсия отмечается в возрасте до 12 месяцев [16]. Клинические проявления HHV-6- и HHV-7-инфекций сходны: внезапная экзантема, лихорадка без сыпи. По данным литературы причиной внезапной экзантемы чаще бывает HHV-6, на долю HHV-7 приходится 10% [16]. Первичная инфекция также может быть связана с неврологическими симптомами [3]. Более тяжелые формы HHV-7-инфекции осложняются фебрильными судорогами и лейкопенией [18]. Часто первичная HHV-7-инфекция проходит без симптомов. В дальнейшем HHV-7 персистирует в организме, и инфекция переходит в латентную форму с реактивацией при снижении иммунитета [13,25,28].

Для постановки диагноза HHV-7-инфекции применяют вирусологические, культуральные методы, количественную и качественную полимеразную цепную реакцию (ПЦР), из серологических методов – реакцию непрямой иммунофлюоресценции [4-6,8,11,29], которая остается практически единственным методом, позволяющим определить антитела к HHV-7, оценить их титр и развитие сероконверсии. При помощи иммунофлюоресцентного теста можно дифференцировать первичные HHV-6- и HHV-7-инфекции, хотя есть данные об ограниченной перекрестной реактивности антител к двум этим вирусам в реакции непрямой иммунофлюоресценции при исследовании образцов сыворотки [7,15,19].

В Российской Федерации диагностика HHV-7-инфекции осуществляется методом ПЦР, направленным на определение ДНК вируса в сыворотке или плазме крови пациентов при наличии клинических симптомов или при подозрении на развитие герпесвирусной инфекции и неблагоприятных последствий ее реактивации при выраженном снижении иммунитета [11,13,14]. Кроме того, при инфицировании несколькими герпесвирусами, один из них может являться триггером для реактивации другого: так, HHV-7 может инициировать реактивацию HHV-6-инфекции [26], явиться кофактором развития ЦМВ-инфекции у пациентов после пересадки органов [27]. По всей видимости, проводить диагностику и оценку иммунного статуса в отношении герпесвирусов (в том числе и HHV-7) крайне необходимо. Изучение связи между первичной герпесвирусной инфекцией и

ассоциированным с ней заболеванием требует надежных тестов на определение антител.

В России зарегистрированы наборы реагентов, основанные на методе иммуноферментного анализа (ИФА) и предназначенные для выявления маркеров всех патогенных для человека герпесвирусных инфекций, кроме HHV-7-инфекции [2,9]. Поэтому разработка такого набора реагентов представляется весьма актуальной задачей.

Метод ИФА позволяет с высокой чувствительностью и специфичностью выявлять антитела к возбудителю, оценивать их титры и развитие сероконверсии. Применение диагностических тестов, основанных на методе ИФА, позволит с высокой эффективностью и надежностью проводить серологическую диагностику HHV-7-инфекции, а также масштабные эпидемиологические исследования инфицированности населения с целью изучения распространенности HHV-7 и его роли в этиопатогенезе различных заболеваний.

Цель данной работы – разработка набора реагентов, основанного на методе ИФА и предназначенного для выявления антител класса G к HHV-7, в целях совершенствования серологической диагностики инфекции, вызванной герпесвирусом человека 7 типа.

Материал и методы. Исследуемые образцы. В исследовании были использованы образцы сыворотки здоровых доноров, предоставленные станцией переливания крови г. Владимир, а также образцы сыворотки детей в возрасте от 0 до 18 лет и пожилых людей в возрасте от 60 до 90 лет, предоставленные диагностическим центром «El Clinic», г. Электрогорск.

Образцы сыворотки здоровых доноров были протестированы на наличие IgG к другим герпесвирусам при помощи иммуноферментных тест-систем «ИФА-ВПГ-1-IgG», «ИФА-ВПГ-2-IgG», «ИФА-Ветряная оспа-IgG», «ИФА-Эпштейн-Барр-IgG», «ИФА-ЦМВ-IgG», «ИФА-ВГЧ-6-IgG», «ИФА-ВГЧ-8-IgG», производимых ЗАО «ЭКОлаб», Россия.

Иммуноферментный анализ. При разработке набора реагентов «ИФА-ВГЧ-7-IgG», предназначенного для выявления IgG к HHV-7, применяли традиционный метод непрямого ИФА. Для приготовления иммуносорбента использовали рекомбинантный очищенный антиген HHV-7, содержащий иммунодоминантные последовательности белка gB HHV-7 (TRX-гибрид). Иммуноспецифичный регион белка gB HHV-7 [20] был получен генно-инженерным методом путем гибридизации с тиредоксином кишечной палочки (*E.coli*). В составе гибридного белка антиген gB HHV-7 был экспрессирован в бактериальной системе *E. coli* (штамм BL-21), выделен в гомогенном виде и очищен с помощью металлохелатной хроматографии. Степень чистоты полученного антигена составила 95 %. Антиген gB HHV-7 в концентрации 2,5 мкг/мл в 100 мМ карбонат-бикарбонатном буфере (pH = 9,6) вносили в лунки полистиролового планшета с поверхностью MaxiSorp (ф. «Nunc», Дания), инкубировали в течение 18-22 ч при температуре 4°C. Затем в лунки планшетов вносили блокирующий раствор для исключения «участия» свободных зон пластика в проведении ИФА (предотвращения неспецифической сорбции) и стабилизации биологической активности антигена. Блокирование проводили в течение 1 ч при комнатной температуре, затем удаляли блокирующий раствор из лунок планшета, планшет высушивали. Сушку осуществляли при температуре 25–27°C и относительной влажности

не более 60% в течение 2,5-3 часов. Планшеты запаивали с влагопоглотителем при помощи устройства для вакуумной запайки в пакеты из алюминиевой фольги на полиэтиленовой основе.

При проведении ИФА для разведения исследуемых образцов сыворотки и их титрования использовали фосфатный буфер, включавший активные компоненты, в том числе лизат *E.coli*, содержащий рекомбинантные TRX-белки, для исключения неспецифических реакций. На первой стадии ИФА антитела к HHV-7 при их наличии в исследуемых образцах взаимодействовали с рекомбинантным антигеном, иммобилизованным в лунке планшета. На второй стадии антивидовой конъюгат связывался с образовавшимися комплексами «антиген-антитело», в результате чего формировались комплексы «антиген иммуносорбента – IgG к HHV-7 образца – анти-IgG конъюгата», которые далее выявляли в цветной реакции с субстратно-индикаторным раствором. Интенсивность окрашивания реакционной смеси была прямо пропорциональна концентрации IgG к HHV-7 в образце. Результаты ИФА регистрировали спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность содержимого лунок планшета при 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620-650 нм.

Реакцию иммунофлюоресценции проводили при помощи набора реагентов для качественного и полуквантитетного определения IgG к инактивированным вирусным антигенам HHV-7 методом непрямого иммунофлюоресцентного анализа – «Human Herpes Virus 7 IgG IFA Kit», «SCIMEDX Corporation» (США). Исследование образцов сыворотки в реакции непрямой иммунофлюоресценции, учет и анализ результатов проводили в соответствии с инструкцией по применению данного набора.

Исследование методом иммунного блоттинга (ИБ) проводили с использованием набора реагентов «ИФА-Блот-ВГЧ-7-IgG», предназначенного для выявления антител класса G к отдельным антигенам HHV-7 методом иммунного блоттинга в формате «Western Blot». Для создания иммуносорбента данного набора применяли электрофорез нативного лизата HHV-7 «Zepto Metrix» (США) в полиакриламидном геле и электроперенос разделенных по молекулярному весу вирусных белков на нитроцеллюлозную мембрану «Sartorius Stedim» (Германия) по технологии, описанной ранее [3].

Анализ образцов сыворотки крови проводили в соответствии с инструкцией по применению данного набора. Учет результатов исследования осуществляли визуально, оценивая интенсивность окрашивания полос в зонах расположения антигенов HHV-7 и сравнивая полосы на тестовом стрипе и референс-стрипе. Результат анализа считали положительным при наличии как минимум одной окрашенной полосы, соответствующей высокоспецифичному антигену HHV-7 (рис. 1), и отрицательным – при отсутствии окрашенных полос или окрашивании полос, соответствующим антигенам, перекрестно реагирующим с HHV-6. Результат анализа считался достоверным при наличии окрашенной контрольной линии на стрипе.

Результаты и обсуждение. В связи с отсутствием клинического материала, охарактеризованного на наличие или отсутствие антител к HHV-7, на первом этапе работы образцы сыворотки крови здоровых доноров были исследованы на наличие IgG к HHV-7 в реакции иммуноблоттинга.

По данным литературы гуморальный ответ человека на HHV-7-инфекцию характеризуется выработкой специфических антител к высокоспецифичному антигену - фосфопротеину pp 85 [24,25]. В связи с этим по резуль-

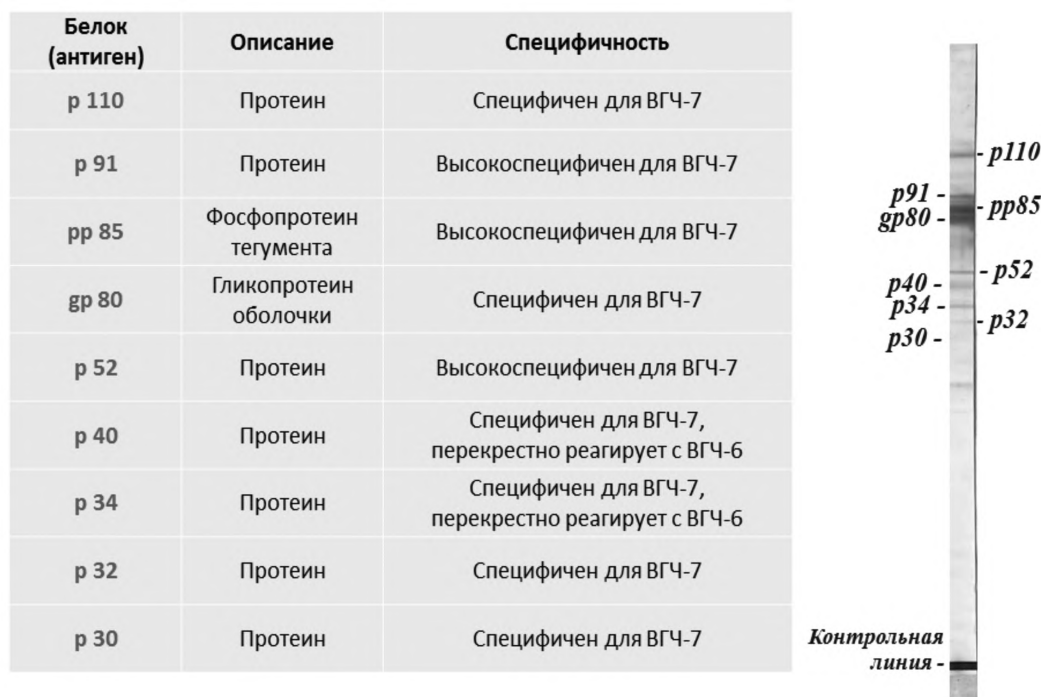


Рис. 1. Расположение индивидуальных белков HHV-7 на иммуносорбенте (набор реагентов «ИФА-Блот-ВГЧ-7-IgG»).

татам иммуноблота были отобраны 30 положительных образцов сыворотки, содержащих IgG к данному антигену, и 8 отрицательных.

Отобранные образцы были верифицированы в реакции непрямой иммунофлюоресценции. В положительных сыворотках было подтверждено наличие специфических IgG к HHV-7 и определен их титр (от 1:20 до 1:160); в отрицательных сыворотках было подтверждено отсутствие IgG к HHV-7.

Положительные образцы давали ярко-зеленое флюоресцентное окрашивание слайдов, отрицательные – красное окрашивание (рис. 2, см.обложку).

Отобранные сыворотки послужили основой для оценки чувствительности и специфичности разработан-

ной иммуноферментной тест-системы «ИФА-ВГЧ-7-IgG». Особенно информативными оказались сыворотки, содержащие IgG к HHV-7 в низком титре.

Результаты исследования клинического материала, охарактеризованного методами РИФ и ИБ, в разработанной тест-системе «ИФА-ВГЧ-7-IgG» представлены в табл. 1.

Данные, приведенные в табл. 1, свидетельствуют о полном совпадении результатов исследования образцов сыворотки, полученных в ИФА, РИФ и ИБ, что является подтверждением высокой чувствительности и специфичности разработанной тест-системы «ИФА-ВГЧ-7-IgG».

Далее было проведено изучение специфичности разработанной тест-системы при исследовании потен-

Таблица 1

Результаты исследования образцов сыворотки, охарактеризованных методами РИФ и ИБ, в разработанной тест-системе «ИФА-ВГЧ-7-IgG»

№ образца	ИФА, «ИФА-ВГЧ-7-IgG»		РИФ, «Human Herpes Virus 7 IgG IFA Kit»		ИБ, «ИФА-Блот-ВГЧ-7-IgG»	
	Индекс позитивности Ip	Результат	Титр	Результат	Наличие антител к антигенам ...	Результат
1	1,18	пол.	1:20	пол.	pp 85	пол.
2	1,54	пол.	1:20	пол.	pp 85	пол.
3	2,23	пол.	1:40	пол.	pp 85, gp80	пол.
4	1,72	пол.	1:20	пол.	pp 85	пол.
5	2,09	пол.	1:20	пол.	pp 85, gp80	пол.
6	3,05	пол.	1:40	пол.	p 91, pp 85, gp80	пол.
7	2,58	пол.	1:40	пол.	pp 85, gp80	пол.
8	2,06	пол.	1:20	пол.	pp 85, gp80	пол.
9	1,33	пол.	1:20	пол.	pp 85	пол.
10	1,41	пол.	1:20	пол.	pp 85	пол.
11	1,88	пол.	1:20	пол.	pp 85	пол.
12	2,15	пол.	1:20	пол.	pp 85, gp80	пол.
13	1,25	пол.	1:20	пол.	pp 85	пол.
14	2,20	пол.	1:20	пол.	pp 85, gp80	пол.
15	5,09	пол.	1:80	пол.	p 91, pp 85, gp80, p 34	пол.
16	2,16	пол.	1:20	пол.	pp 85, gp80	пол.
17	6,57	пол.	1:160	пол.	p 110, p 91, pp 85, gp80, p 34	пол.
18	2,30	пол.	1:20	пол.	pp 85, gp80	пол.
19	1,11	пол.	1:20	пол.	pp 85	пол.
20	1,16	пол.	1:20	пол.	pp 85	пол.
21	1,29	пол.	1:20	пол.	pp 85	пол.
22	4,52	пол.	1:80	пол.	p 91, pp 85, gp80, p 34	пол.
23	8,05	пол.	1:160	пол.	p 110, p 91, pp 85, gp80, p 52, p 34	пол.
24	2,65	пол.	1:20	пол.	pp 85, gp80	пол.
25	1,31	пол.	1:20	пол.	pp 85	пол.
26	2,14	пол.	1:20	пол.	pp 85, gp80	пол.
27	2,05	пол.	1:20	пол.	pp 85, gp80	пол.
28	1,41	пол.	1:20	пол.	pp 85	пол.
29	2,14	пол.	1:20	пол.	pp 85, gp80	пол.
30	1,92	пол.	1:20	пол.	pp 85	пол.
31	0,18	отр.	-	отр.	-	отр.
32	0,42	отр.	-	отр.	-	отр.
33	0,22	отр.	-	отр.	-	отр.
34	0,15	отр.	-	отр.	-	отр.
35	0,51	отр.	-	отр.	-	отр.
36	0,19	отр.	-	отр.	-	отр.
37	0,24	отр.	-	отр.	-	отр.
38	0,37	отр.	-	отр.	-	отр.

Таблица 2

Результаты исследования потенциально перекрестно-реактивных образцов сыворотки в тест-системе «ИФА-ВГЧ-7-IgG»

Образцы, содержащие IgG к ...	Количество образцов	Результаты, полученные в «ИФА-ВГЧ-7-IgG»	
		Положительные	Отрицательные
ВПП-1	15	0	15
ВПП-2	5	0	5
ВВО	20	0	20
ВЭБ	17	0	17
ЦМВ	10	0	10
ВГЧ-6	9	0	9
ВГЧ-8	3	0	3

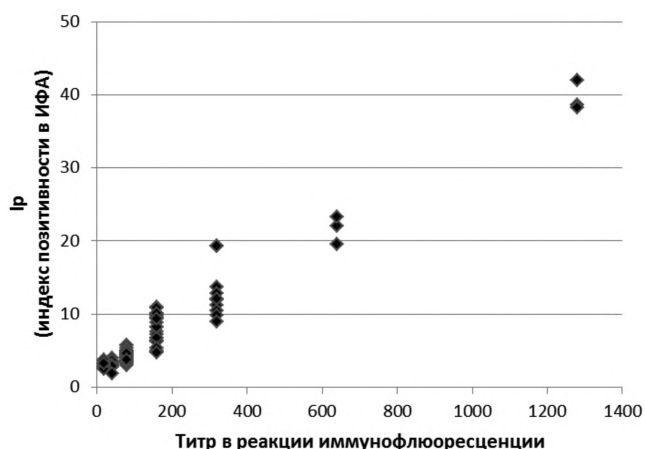


Рис. 3. Корреляционная зависимость результатов исследования образцов сыворотки методами ИФА и непрямой иммунофлюоресценции.

циально перекрестно реактивных образцов сыворотки, содержащих IgG к другим герпесвирусам, отобранных с помощью иммуноферментных тест-систем ЗАО «ЭКО-лаб». Данные сыворотки не содержали IgG к HHV-7 по результатам РИФ и ИБ.

Исследовали сыворотки с высоким титром IgG к вирусу простого герпеса первого типа - ВПП-1 (15 образцов), вирусу простого герпеса второго типа - ВПП-2 (5 образцов), вирусу герпеса человека 3 типа (вирусу ветряной оспы) - ВГЧ-3, ВВО (20 образцов), вирусу герпеса человека 4 типа (вирусу Эпштейна-Барр) - ВГЧ-4, ВЭБ (17 образцов), вирусу герпеса человека 5 типа (цитомегаловирусу) - ВГЧ-5, ЦМВ (10 образцов), вирусу герпеса человека 6 типа - ВГЧ-6 (9 образцов), вирусу герпеса человека 8 типа - ВГЧ-8 (3 образца). Полученные результаты исследования приведены в табл. 2.

Таким образом, по данным, представленным в табл. 2, все исследованные образцы показали отрицательный результат в разработанной тест-системе и, соответственно, отсутствие перекрестного реагирования с другими герпесвирусными инфекциями.

Затем было проведено исследование инфицированности HHV-7 детей в возрасте от 0 до 18 лет и лиц пожилого возраста в возрасте от 60 до 90 лет, которое показало следующие результаты:

- среди 167 образцов сыворотки детей 113 содержали IgG к HHV-7, что составляет 68%;

- из 238 образцов сыворотки пожилых лиц 198 содержали IgG к HHV-7, что составляет 83 %.

При анализе полученных данных была установлена корреляция между результатами ИФА и титрами антител в реакции непрямой иммунофлюоресценции (коэффициент корреляции составил $R_z = 0,955$). Результаты проведенного анализа представлены на рис. 3.

Таким образом, высокие показатели чувствительности и специфичности разработанной тест-системы «ИФА-ВГЧ-7-IgG», предназначенной для выявления антител класса G к HHV-7, отсутствие перекрестных реакций с другими герпесвирусными инфекциями, корреляция полученных результатов с традиционно подтверждающими тестами на основе иммунофлюоресцентной реакции и иммунного блоттинга, позволяют говорить о целесообразности применения данного набора реагентов для диагностики HHV-7-инфекции, дифференциации ее от других герпесвирусных инфекций, а также с целью проведения сероэпидемиологических исследований.

Заключение. Применение метода ИФА, обладающего высокой чувствительностью и специфичностью, для выявления IgG к HHV-7 расширяет возможности серологической диагностики данной инфекции. ИФА позволит в дальнейшем провести более масштабное исследование HHV-7 и изучить его роль в этиопатогенезе различных заболеваний.

Благодарность. Авторы выражают благодарность сотрудникам отдела перспективных разработок ЗАО «ЭКОлаб» за оказанную помощь при проведении исследований.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 15-29 см. REFERENCES)

1. Амелина Е.А., Арсеньева В.А., Марданлы С.С., Марданлы С.Г. Применение непрямого метода иммуноферментного анализа для выявления специфических IGM к вирусу герпеса человека 6 типа. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64(3): 158-63.
2. Даниленко Е.Д., Гончаров Д.Б., Казарян С.М., Марданлы С.Г., Асратян А.А. Частота инфицирования токсоплазмами женщин с акушерско-гинекологической патологией. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2008; 1: 11-3.
3. Малышев В.В., Сидорчик М.С., Марданлы С.Г. Эпидемиология, лабораторная диагностика и неврологические последствия герпесвирусной инфекции у взрослых. *Вестник Российской военной медицинской академии*. 2018; 53: 145-6.
4. Марданлы С.Г., Авдонина А.С. Разработка набора реагентов для выявления антител класса G к отдельным антигенам вируса краснухи методом иммунного блоттинга в формате «WESTERN BLOT». *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63 (11): 696-701.
5. Марданлы С.Г., Авдонина А.С., Марданлы С.С., Шершнёва Н.Н. Разработка набора реагентов для выявления антител класса G к отдельным антигенам вирусов простого герпеса первого и второго типов методом иммунного блоттинга в формате Western-Line-Blot. *Медицинский алфавит*. 2017; 4 (38): 33-9.
6. Марданлы С.Г., Арсеньева В.А., Марданлы С.С., Ротанов С.В., Амелина Е.А. Синхронная детекция серологических маркеров основных герпесвирусных инфекций человека. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63 (1): 35-40.
7. Марданлы С.Г. Герпесвирусные инфекции. *Учебное пособие*. Орехово-Зуево: Государственный гуманитарно-технологический университет; 2017.
8. Марданлы С.Г. К вопросу о стандартизации условий производства компонентов и постановки реакции иммунофлюоресценции.

ции на примере лабораторной диагностики сифилиса. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64 (7): 409-12.

9. Марданлы С. Г. Состояние и перспективы развития отечественного рынка медицинских изделий для диагностики *in vitro* в сегменте диагностических реагентов и их наборов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64 (7): 443-8.
10. Марданлы С.С., Марданлы С.Г., Арсеньева В.А. Распространённость вируса герпеса человека среди контингентов различного возраста. *Сборник «Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации»*. Орехово-Зуево: Государственный гуманитарно-технологический университет; 2018; 128-36.
11. Марданлы С.Г., Первушин Ю.В., Иванова В.Н. Спинномозговая жидкость, лабораторные методы исследования и их клинико-диагностическое значение: учебное пособие. М.: Электрогорск; 2011.
12. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. Учебник. Т.2.Зверев В.В., Бойченко М.Н., ред. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2016.
13. Миронов А. Ю. Основы клинической микробиологии и иммунологии. Воробьёв А.А., ред. М.: Изд-во «Первого МГМУ им. И.М. Сеченова»; 1997.
14. Никольский М.А. Вирус герпеса человека 7 типа. *Инфекция и иммунитет*. 2013; 3 (1): 15-20.

REFERENCES

1. Amelina E.A., Arsenyeva V.A., Mardany S.S., Mardany S.G. The use of an indirect sign of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect specific IGM for type 6 human herpes virus. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2019; 64 (3): 158-63. (in Russian)
2. Danilenko E. D., Goncharov D. B., Kazaryan S. M., Mardany S. G., Asratyan A. A. The frequency of infection with toxoplasma of women with obstetric-gynecological pathology. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni*. 2008; 1: 11-3. (in Russian)
3. Malyshev V.V., Sidorchik M.S., Mardany S.G. Epidemiology, laboratory diagnostics and neurological consequences of herpesvirus infection in adults. *Vestnik Rossiyskoy voenno-meditsinskoy akademii*. 2018; 53: 145-6. (in Russian)
4. Mardany S.G., Avdonina A.S. Development of a set of reagents for immunoglobulins by immune blotting in the format "WESTERN BLOT". *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2018; 63(11): 696-701. (in Russian)
5. Mardany S.G., Avdonina A.S., Mardany S.S., Shershneva N.N. Development of a kit of reagents for the detection of class G antibodies to individual antigens of herpes simplex viruses of the first and second types by immune blotting in Western-Line-Blot format. *Meditsinskiy alfavit*. 2017; 4 (38): 33-9. (in Russian)
6. Mardany S.G., Arsenyev V.A., Mardany S.S., Rotanov S.V., Amelina E.A. Synchronous detection of serological markers of major human herpesvirus infections. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2018; 63 (1): 35-40. (in Russian)
7. Mardany S.G. Herpes virus infections [Gerpessvirusnye infektsii. Uchebnoe posobie]. Orekhovo-Zuevo: Izd-vo Gosudarstvennyj humanitarно-tekhnologicheskij universitet; 2017. (in Russian)
8. Mardany S.G. To the question of standardization of the production conditions of components and formulation of the immunofluorescence reaction using the laboratory diagnosis of syphilis as an example. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2019; 64 (7): 409-12. (in Russian)
9. Mardany S. G. Status and development prospects of the domestic market of medical devices for *in vitro* diagnostics in the segment of diagnostic reagents and their kits. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2019; 64 (7): 443-8. (in Russian)
10. Mardany S.S., Mardany S.G., Arsenyev V.A. The prevalence of human herpes virus among people of different ages. *Sbornik «Perspektivi vnedreniya innovatsionnykh tekhnologiy v meditsine i farmatsii»*. Orekhovo-Zuevo: Izd-vo Gosudarstvennyj humanitarно-tekhnologicheskij universitet; 2018; 128-36. (in Russian)
11. Mardany S.G., Pervushin Yu.V., Ivanova V.N. Cerebrospinal fluid, laboratory research methods and their clinical diagnostic value: a training manual. Moscow: Elektrogorsk; 2011. (in Russian)
12. Medical Microbiology, Virology and Immunology: Textbook [Meditsinskaya mikrobiologiya, virusologiya i immunologiya. Uchebnik. T.2.] Zverev V.V., M.N. Boychenko M.N., eds. Moscow: GEOTAR-Media; 2016.
13. Mironov A. Yu. Fundamentals of clinical microbiology and immunology. Vorob'yov A.A., ed. Moscow: «Pervyi Moskovskiy gosudarstvennyi meditsinskiy universitet im. I.M. Sechenova»; 1997. (in Russian)
14. Nikolsky M.A. Human Herpes Virus Type 7. *Infektsiya i immunitet*. 2013; 3 (1): 15-20. (in Russian)
15. Black J.B., Schwarz T.F., Patton J.L., Kite-Powell K., Pellett P.E., Wiersbitzky S. et al. Evaluation of Immunoassays for Detection of Antibodies to Human Herpesvirus 7. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1996; 3 (1): 79-83.
16. Caserta M.T., Hall C.B., Schnabel K., Long C.E., D'Heron N. Primary human herpesvirus 7 infection: a comparison of human herpesvirus 7 and human herpesvirus 6 infections in children. *J. Pediatr.* 1998; 133: 386-9.
17. Clark D.A., Freeland M.L., Mackie M.L., Jarret R.F., Onions D.E. Prevalence of antibody to human herpesvirus 7 by age. *J. Infect. Dis.* 1993; 168: 251-2.
18. Epstein L.G., Shinnar S., Hesdorffer D.C., Nordli D.R., Hamidullah A., Benn K.T. et al. Human Herpesvirus 6 and 7 in febrile status epilepticus: The FEBSTAT study. *Epilepsia*. 2012; 53 (9): 1481-8.
19. Foa-Tomasi L., Fiorilli M.P., Avitabile E., Campadelli-Fiume G. Identification of a 85 kDa phosphoprotein as an immunodominant protein specific for human herpesvirus 7 infected cells. *J. Gen. Virol.* 1996; 77: 511-8.
20. Franti M., Aubin J.T., De Saunt-Maur G., Kosuge H., Yamanishi K., Gaytheret-Dejean A. et al. Immune reactivity of human sera to the glycoprotein B of Human Herpesvirus 7. *J. Clin. Microb.* 2002; 1 (40): 44-51.
21. Frenkel N., Schirmer E.C., Wyatt L.S., Katsafanas G., Roffman E., Danovich R.M., June. C.H. Isolation of a new herpesvirus from human CD4+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990; 87: 748-52.
22. Hall C.B., Caserta M.T., Schnabel K.C. Characteristics and acquisition of human herpesvirus (HHV) 7 infections in relation to infection with HHV-6. *J. Infect. Dis.* 2006; 193 (8): 1063-9.
23. Lusso P., Secchiero P., Crowley R.W., GarzinoDemo A., Berneman Z.N., Gallo R.C. CD4 is a critical component of the receptor for human herpesvirus 7: interference with human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994; 91: 3872-6.
24. Savolainen H., Lautenschlager I., Piiparinen H., Saarinen-Pihkala U., Hovi L., Vetterranta K. Human herpesvirus-6 and -7 in pediatric stem cell transplantation. *Pediatr. Blood Cancer*. 2005; 45: 820-5.
25. Stefan A., Secchiero P., Baechi T., Kempf W., Campadelli-Fiume G. The 85-Kilodalton phosphoprotein (pp85) of Human Herpesvirus 7 is encoded by open reading frame U14 and localizes to a tegument substructure in virion particles. *J. Virol.* 1997; 71 (8): 5758-63.
26. Tanaka-Taya K., Kondo T., Nakagawa N., Inagi R., Miyoshi H., Sunagawa T. et al. Reactivation of human herpesvirus 6 by infection of human herpesvirus 7. *J. Med. Virol.* 2000; 60: 284-9.
27. Tong C.Y., Bakran A., Williams H., Cheung C.Y., Peiris J.S. Association of human herpesvirus 7 with cytomegalovirus disease in renal transplant recipients. *Transplantation*. 2000; 70: 213-6.
28. Torigoe S., Kumamoto T., Koide W., Taya K., Yamanishi K. Clinical manifestations associated with human herpesvirus 7 infection. *Arch. Dis. Child.* 1995; 72: 518-9.
29. Ward K.N., Couto Parada X., Passas J., Thiruchelvam A.D. Evaluation of specificity and sensitivity of indirect immunofluorescence tests for IgG to human herpesvirus-6 and -7. *J. Virol. Meth.* 2002; 106: 107-13.

Поступила 15.08.19

Принята к печати 22.08.19

Никитина А.В.¹, Акиншина Ю.А.¹, Нищакова Н.Е.¹, Амелина Е.А.¹, Марданлы С.Г.^{1,2}

ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ ТЕСТ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ СКРЫТОЙ КРОВИ В КАЛЕ

¹ЗАО «ЭКОлаб», 142530, г. Электрогорск Московской обл., Россия;

²Государственный гуманитарно-технологический университет «ГГТУ» ГОУВО Московской обл., 142611, г. Орехово-Зуево Московской обл., Россия;

В работе представлены результаты создания и оценки диагностических характеристик иммунохроматографической тест-системы для выявления скрытой крови (гемоглобина) в кале. Тест был апробирован на образцах, не содержащих гемоглобин, и на модельных пробах, сенсibilизированных стандартизированным препаратом гемоглобина в различных концентрациях. Разработанная тест-система обеспечила выявление гемоглобина в концентрации выше 5 мкг/г кала в 97,6% случаев, специфичность анализа составила 100%. Иммунохроматографический FOB-тест может быть использован для экспрессного исследования при первичном скрининге колоректального рака.

Ключевые слова: иммунохроматографический анализ; скрытая кровь; FOB-тест; скрининг.

Для цитирования: Никитина А.В., Акиншина Ю.А., Нищакова Н.Е., Амелина Е.А., Марданлы С.Г. Иммунохроматографический тест для выявления скрытой крови в кале. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (9): 536-540. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-9-536-540>

Nikitina A.V.¹, Akinshina Y.A.¹, Nishchakova N.E.¹, Amelina E.A.¹, Mardanly S.G.^{1,2}

IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST FOR DETECTION OF FECAL OCCULT BLOOD

¹CJSC "EKOLab", 142530, Elektrogorsk, Moscow region;

²State educational institution of higher education of the Moscow region;
State Humanitarian University of Technology "GGTU", 142611, Orekhovo-Zuyevo, Moscow region

The developing and evaluating results of the diagnostic characteristics of an immunochromatographic test for the detection of fecal occult blood (hemoglobin) were presents in the article. The test was approved samples without hemoglobin and model samples containing of standardized preparation of hemoglobin in various concentrations. The developed test system identified hemoglobin in concentrations higher 5 µg / g feces in 97.6% cases, the specificity of the analysis was 100%. The immunochromatographic FOB-test can be used for rapid analysis in the primary screening of colorectal cancer.

Key words: immunochromatographic analysis; fecal occult blood; FOB-test; screening.

For citation: Nikitina A.V., Akinshina Y.A., Nishchakova N.E., Amelina E.A., Mardanly S.G. Immunochromatographic test for detection of fecal occult blood. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika* (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (9): 536-540. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-9-536-540>

For correspondence: Nikitina Anna Viktorovna – a head of the Express diagnostic Departments, EKOLab, e-mail: ekolab-nikitina@mail.ru.

Conflict of interests. The authors declare the absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 26.08.2019
Accepted 02.09.2019

Введение. Лабораторные исследования являются неотъемлемой частью диагностики физиологических и патологических состояний организма человека, методы лабораторной диагностики позволяют поставить диагноз на ранней стадии заболевания и объективно оценить эффективность проводимого лечения [1-6].

Ежегодное возрастание числа случаев онкозаболеваний регистрируется как в России, так и во всём мире [7, 8]. По последним данным Росстата в перечне диагностированных видов злокачественных опухолей колоректальный тип рака (КРР) занимает третье место по распространённости после новообразований кожи (кроме меланомы) и молочной железы [8]. Аналогичная ситуация по заболеваемости КРР наблюдается во всём мире [9]. В ряде стран в последние десятилетия отмечается сокращение числа случаев КРР (США, Новая Зеландия, Франция), в других – сохранение неизменных показате-

лей заболеваемости (Канада, Австралия) или же возрастание случаев КРР (страны Латинской Америки, Азии, Восточной Европы) [7, 10-12]. Существующие различия в тенденции заболеваемости КРР у населения разных стран связывают с влиянием факторов риска (пассивный образ жизни, курение, чрезмерное употребление животного жира). Несмотря на увеличение числа пациентов с диагнозом КРР в некоторых странах, в мире регистрируется снижение показателей смертности от данной патологии (прежде всего, от рака прямой кишки) [10, 13], что объясняется введением скрининговых программ обследования [14-16] и, как следствие, успешным диагностированием КРР на ранних стадиях и своевременностью удаления новообразований. Скрининг КРР проводится во многих странах, однако рекомендации, связанные с частотой и алгоритмом обследования, а также возрастом пациентов, подлежащих скринингу, значительно варьируют [17-19].

В последние годы отмечается увеличение числа случаев КРР среди лиц моложе 50 лет [20,21], для которых массовые обследования в настоящее время не проводят-

Для корреспонденции: Никитина Анна Викторовна нач. отд-ния экспресс-диагностики ЗАО «ЭКОлаб» e-mail: ekolab-nikitina@mail.ru

ся. В связи с этим, Американское онкологическое общество и ряд европейских специалистов вносят изменения в руководства по скринингу КРР. Предусматривается организация обследований для лиц со средним уровнем риска, начиная с 45 лет в США [22] и с 50 лет – в Англии и Уэльсе [23,24].

Несмотря на несомненную успешность применения скрининговых программ для снижения смертности от КРР, используемые методы для выделения группы риска и подтверждения первичного диагноза не являются универсальными. Наиболее распространено выявление скрытой крови (FOB) на первом этапе скрининга и инструментальное обследование – при положительном ответе FOB-теста [25,26]. Определение скрытой крови основано на способности тонких капилляров полипозных новообразований повреждаться и кровоточить при прохождении каловых масс через просвет кишки. В тонком и толстом отделах кишечника кровь подвергается воздействию ферментов и теряет окраску, вследствие чего она может быть визуальнo незаметна в составе фекальных масс. Определение гемоглобина в кале не является специфичным маркером для КРР, поскольку выделение крови может наблюдаться при наличии воспалительных заболеваний ЖКТ. В то же время FOB-тест обладает высоким прогностическим значением при патологиях нижних отделов ЖКТ: у 20-40% лиц с положительным результатом анализа на скрытую кровь обнаруживаются аденоматозные полипы, у 0,5-5% - КРР [27]. Своевременное выявление аденом по результатам скрининга обеспечивает их удаление до начала процесса малигнизации.

Определение скрытой крови проводится биохимическими (гваяковая, бензидиновая проба) и иммунохимическими методами (агглютинация латекса, иммунохроматографический (ИХА) и иммуноферментный анализ). Чувствительность биохимических методов на основе пероксидазной активности гема в составе гемоглобина не превышает 70%, а при ранних формах КРР – 5-10% [1, 28]. Возможные неспецифические реакции связаны с несоблюдением диеты, исключающей приём препаратов с железом или аскорбиновой кислотой, а также употребление продуктов, содержащих пероксидазные ферменты [29]. Иммунохимические тесты, основанные на использовании антител к гемоглобину человека, широко применяются в скрининговых программах и анонимных обследованиях (ИХА) за рубежом [17, 19, 24]. В РФ скрининг на КРР проводится в рамках диспансеризации населения и утверждён приказом №869н, предусматривающим регулярное обследование кала на скрытую кровь иммунохимическим методом для граждан в возрасте от 49 до 73 лет один раз в 2 года¹. Применение иммунохимических тестов в скрининге КРР связано с их высокой чувствительностью (79%) и специфичностью (94%), показанной во многих исследованиях [30]. Необходимо отметить, что разные авторы приводят различные диагностические показатели для FOB-теста. Это связано с кратностью процедур анализа и пороговым уровнем, установленным для конкретного набора реагентов (от 2 до 200 мкг гемоглобина на г пробы) [31].

Обследование больших групп населения, расширение скрининговых программ и экономическая состав-

ляющая их осуществления диктуют необходимость использования доступных, неинвазивных и экспрессных методов анализа. Данным требованиям в полной мере отвечают иммунохроматографические тесты, позволяющие проводить исследование как в лаборатории, так и в домашних условиях. Основное их назначение – выделение группы риска с положительным результатом FOB-теста для дальнейшего обследования инструментальными методами.

В связи с вышесказанным целью нашей работы являлась разработка высокочувствительной иммунохроматографической тест-системы для выявления гемоглобина в образцах кала.

Материал и методы. В работе использовались мышиные моноклональные антитела к гемоглобину человека (Medix, Финляндия), иммуноглобулины класса G кролика, козьи антитела к иммуноглобулинам кролика (ООО «Имтек», Россия). В качестве контрольного материала для оценки аналитической чувствительности теста применяли лиофилизированный гемоглобин человека (Level 1 ClinChek, Recipe, Германия).

Коллоидное золото готовили из 1% раствора золотохлористоводородной кислоты (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 2% раствора цитрата натрия при кипячении и постоянном перемешивании. Получение частиц коллоидного золота (НЧ-КЗ) размером 20нм контролировали с помощью спектрофотометра ($D_{520}=1$).

Приготовление конъюгатов коллоидного золота с антивидовыми иммуноглобулинами и антителами к гемоглобину человека включало проведение диализа антител, определение оптимальных условий для иммунобилизации специфических реагентов на НЧ-КЗ, инкубацию компонентов, блокировку 10% раствором бычьего сывороточного альбумина (БСА), очистку конъюгатов от несвязавшегося белка и измерение оптической плотности готовых конъюгатов на спектрофотометре.

Смесь конъюгатов наносили на предварительно подготовленную стекловолоконную мембрану (PT-R7 AMD, Индия) в объёме 27 мкл на 1 см мембраны. Аналитическую зону формировали путём нанесения контрольной (1 мг/мл козьих антител к IgG кролика в 0,02М PBS, pH-7,4) и тестовой (1 мг/мл мышиных антител к гемоглобину человека в 0,02М PBS, pH-7,4) линий. Антитела наносили в виде линий на нитроцеллюлозную мембрану CN140 (Sartorius, Германия) с помощью диспенсера HGS-510 (Autokun, Китай) в объёме 2 мкл/см. Мембраны с иммунореагентами сушили при комнатной температуре и влажности не более 30% в течение 24 часов, после чего их последовательно наклеивали на подложку из поливинилхлорида. Готовый композит нарезали на полоски шириной 4 мм, упаковывали каждую полоску (тест) в пластиковый катридж (тест-кассету) с двумя отверстиями: для внесения исследуемой пробы и окошком с аналитической зоной. Готовые тесты хранили в запаянных фольгированных пакетах с влагопоглотителем при комнатной температуре.

С помощью иммунохроматографических тестов, полученных нами, оценивали качественную реакцию на наличие гемоглобина человека в образцах кала, собранных с согласия обследуемых ($n=50$). Исходя из данных анамнеза и возраста лиц, предоставивших образцы для исследования (25-40 лет), предполагалось отсутствие патологий нижних отделов ЖКТ у обследуемых, в связи с чем из данных проб была сформирована контрольная группа.

¹Приказ Министерства здравоохранения РФ от 26 октября 2017 г. № 869н “Об утверждении порядка проведения диспансеризации определенных групп взрослого населения”.

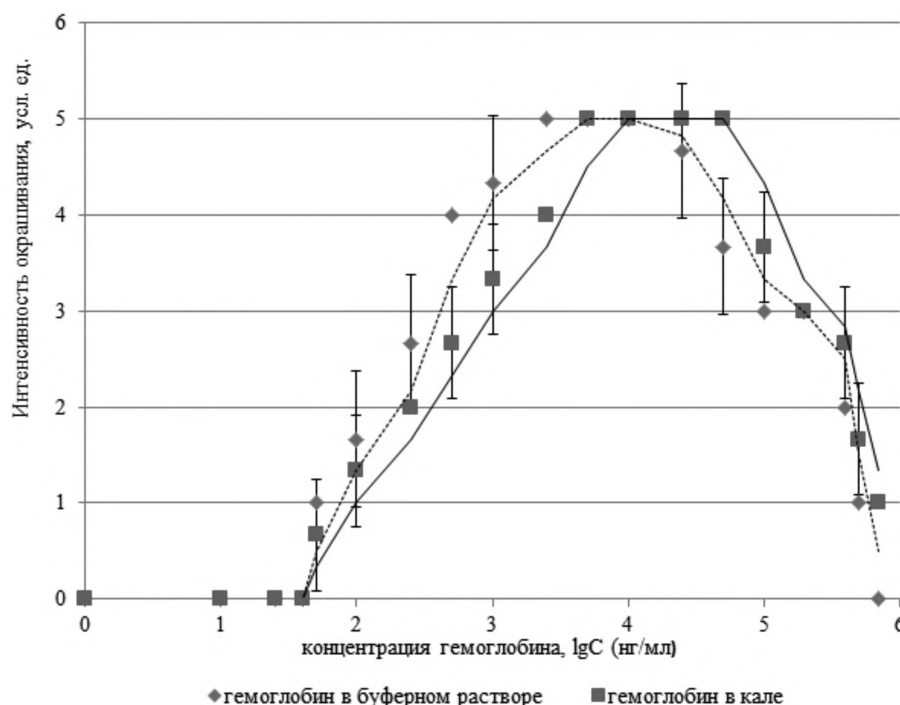


Рис. 2. Результаты определения гемоглобина в различных концентрациях в модельных пробах на основе буферного раствора или кала (указано стандартное отклонение).

В качестве положительного контроля для оценки динамического диапазона выявляемых концентраций гемоглобина и чувствительности теста использовали стандартизированный гемоглобин человека (ClinChek, Rescure, Германия). Препарат разводили в буферном растворе (0,05M трис-буфер, pH-7,2 с 0,1% БСА и 0,1% азида натрия) от 700.000 до 10 нг/мл.

Образцы кала собирали в чистый сухой контейнер, не содержащий консервантов. С помощью аппликатора с резьбой забирали 20-30 мг кала из трёх разных локаций образца. Аппликатор погружали в одноразовый флакон-капельницу с 2 мл буферного раствора (0,05M трис-буфер, pH-7,2) и встряхивали до растворения материала. Аналогично готовили образцы положительного контроля, содержащие гемоглобин в выбранных концентрациях. Положительный контроль исследовали в буферном растворе, а также в составе проб кала, не содержащих нативный гемоглобин и предварительно искусственно контаминированных стандартизированным препаратом. Каждую пробу исследовали как минимум в двух повторях. Подготовленные для анализа образцы хранили во флаконах-капельницах при 2-8°C не более суток.

Иммунохроматографический анализ проводили при комнатной температуре. Отломив кончик колпачка флакона-капельницы, вносили в отверстие тест-кассеты, предназначенное для образца, 2 капли (80 мкл) пробы, приготовленной описанным выше способом. Для каждого образца использовали отдельную тест-кассету. Результат анализа визуально контролировали через 5-10 мин и не позднее 15 мин после внесения пробы. Положительным считался результат исследования с образованием двух различных полос розового или красного цвета в контрольной и тестовой зонах. Отрицательный результат анализа фиксировали при появлении одной

окрашенной полосы в области контрольной зоны. В случае отсутствия окрашивания полосы в зоне контроля результат анализа считался недействительным, и требовалось повторное исследование пробы. При положительном результате анализа образцу присваивали значения от 1 до 5 условных единиц в зависимости от степени интенсивности окрашивания (рис. 1, см.обложку).

Результаты. В процессе создания иммунохроматографической тест-системы для выявления скрытой крови в кале были подобраны оптимальные условия для получения конъюгатов антител с коллоидным золотом, состав буферных растворов и концентрации иммунореагентов для достижения необходимых характеристик тест-системы. Наиболее значимыми показателями представляются экспрессность анализа, специфичность и аналитическая чувствительность (порог детекции) теста. Время исследования зависит от быстроты прохождения латерального потока и скорости образования иммунных комплексов в аналитических зонах. В свою очередь время протекания жидкости напрямую связано с размером и количеством пор в нитроцеллюлозной мембране и составом раствором, обеспечивающих смачиваемость мембран, растворение конъюгата и блокировку неспецифических взаимодействий. За счёт сочетания компонентов тест-системы (тип мембраны, буферные растворы, концентрация антител в аналитических зонах и оптическая плотность конъюгатов), подобранных в серии предварительных опытов, удалось достичь получения результатов анализа через 5-10 минут после внесения пробы.

Аналитическая чувствительность прежде всего связана с качеством специфических компонентов теста, в данном случае – с выбором моноклональных антител к гемоглобину, а также созданием оптимальных условий

Характеристики иммунохроматографической тест-системы «ИХА-Скрытая кровь»

Показатели	Значения показателей
Время анализа, мин	5-10
Порог детекции (нг/мл) гемоглобина:	
в буферном растворе	50
в образцах кала	50
Динамический диапазон, мкг/мл	0,05 - 500
Чувствительность (%) выявления гемоглобина*:	
в буферном растворе	97,8
в образцах кала	97,6
Специфичность (%)	100

Примечание: * - на модельных образцах.

для формирования «сэндвич»-комплекса в тестовой зоне. Специфичность анализа обеспечивалась использованием антител, специфичных к гемоглобину человека.

Результаты исследования образцов, содержащих гемоглобин в различных концентрациях ($n=108$), представлены на рис. 2. Продемонстрирована типичная зависимость изменения степени окрашивания от концентрации гемоглобина в образце с выходом на «плато» при 5000–50 000 нг/мл и дальнейшим снижением яркости тестовой линии.

Половина исследуемых проб была приготовлена на основе буферного раствора для разведения образцов, вторая часть – из искусственно контаминированных гемоглобином проб кала. В первой группе положительный результат анализа получили в 97,8% ($n=44$) случаев для проб, содержащих гемоглобин в концентрации 0,05–700 мкг/мл; во второй группе – в 93,3% ($n=42$) для тех же образцов. В первой группе отрицательный результат был получен для одной пробы с концентрацией гемоглобина 50 нг/мл, во второй группе – для трёх проб с концентрацией гемоглобина 700 мкг/мл. При снижении верхней границы до 500 000 нг/мл чувствительность анализа для проб второй группы составила 97,6%. На основании полученных результатов был определён динамический диапазон выявляемых значений гемоглобина с помощью иммунохроматографического теста в пределах 50–500 000 нг/мл.

Все пробы, содержащие гемоглобин в концентрации ниже 50 нг/мл ($n=18$) в обеих группах, были определены как отрицательные. Интерферирующие вещества в составе кала не оказывали влияния на чувствительность анализа. Таким образом, аналитическая чувствительность выявления гемоглобина составила 50 нг/мл.

При исследовании образцов контрольной группы ($n=50$) положительных результатов анализа зафиксировано не было.

Обсуждение. Скрининг ранних форм КРР и сопряженных с высоким риском малигнизации ворсинчатых аденоматозных полипов широко распространен в мировой практике. Первичное обследование может осуществляться различными способами, включая как инструментальные методы, так и определение маркёров опухоли [32]. При этом наилучшие результаты продемонстрировал подход, сочетающий применение нескольких методов [1,33]. Среди быстрых и неинвазивных способов обследования на КРР ведущим является анализ, направленный на выявление скрытой крови в кале. Использование FOB-теста обеспечивает проведение экономически эффективного скрининга, охватывающего широкий

круг обследуемых. Недостатки тестов, основанных на псевдопероксидазной активности гема (низкая чувствительность, ложноположительные результаты анализа, канцерогенные свойства компонентов и пр.), приводят к необходимости использования альтернативных иммунохимических методов скрининга.

Иммунохроматографический FOB-тест продемонстрировал соответствие требованиям, предъявляемым к первичному звену скрининга (см.таблицу), обеспечивая экспрессное выявление гемоглобина в образцах кала от 50 нг/мл (5-6 мкг гемоглобина в 1 г кала).

Высокая специфичность теста предполагает отсутствие гипердиагностики и, соответственно, сокращение количества подтверждающих обследований. Возможность бесприборного учёта результатов анализа позволяет проводить исследование вне специализированной лаборатории.

Заключение. Разработанная тест-система «ИХА-Скрытая кровь» может применяться в целях первичного скрининга КРР при соблюдении рекомендаций производителя по процедуре забора материала для исследования, проведению и регистрации результатов анализа, а также при обязательном учёте ограничений метода.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 8-33 см. REFERENCES)

1. Краевский Н.А. Патологоанатомическая диагностика опухолей человека. Краевский Н.А., Смольяников А.В., Саркисов, ред. Д.С. Т.2. М.: Медицина; 1993.
2. Куляш Г.Ю., Сабаев М.И., Ермо Л.В., Марданлы С.Г., Бахилина Н.В. Об эффективности и перспективе применения теста исследовательской лаборатории венерических заболеваний (VDRL) для диагностики нейросифилиса в Российской Федерации. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; 3: 30-3.
3. Марданлы С.Г. Проблемы обращения медицинских изделий для *in vitro*-диагностики. *Перспективы внедрения инновационных технологий в фармации*. 2014; 27.
4. Марданлы С.Г. Состояние и перспективы развития отечественного рынка медицинских изделий для диагностики *in vitro* в сегменте диагностических реагентов и их наборов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64 (7): 443-8.
5. Марданлы С.Г., Долгов В.В. О роли клинической лабораторной диагностики внутриутробных инфекций. *Компетентность*. 2013; 7 (108): 50-3.
6. Никитина А.В., Помелова В.Г., Соколова М.В., Осин Н.С., Марданлы С.Г. Детекция иммуноглобулинов g к возбудителям TORCH-инфекций методом мультиплексного иммуноанализа на основе технологии фосфанTM. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61 (5): 289-92.
7. Каприн А.Д., Старинский В.В., Г.В. Петрова Г.В., ред. Состояние онкологической помощи населению России в 2017 году. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена - филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; 2018.

REFERENCES

1. Kraevskij N.A. Pathological diagnosis of human tumors. [Patologo-anatomicheskaya diagnostika opuholej cheloveka] Kraevskij N.A., Smol'yannikov A.V., Sarkisov D.S., eds. T.2. Moscow: Meditsina; 1993. (in Russian)
2. Kulyash G.Yu., Sabaev M.I., Erko L.V., Mardany S.G., Bakhilina N.V. On the effectiveness and prospects of using the test of the Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) for the diagnosis of neurosyphilis in the Russian Federation. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2013; 3: 30-3. (in Russian)

3. Mardanly S.G. Problems of circulation of medical devices for in vitro diagnostics. *Perspektivy vnedreniya innovatsionnykh tekhnologiy v farmatsii*. 2014; 27. (in Russian)
4. Mardanly S.G. The state and development prospects of the domestic market for in vitro diagnostic medical products in the segment of diagnostic reagents and their kits. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2019; 64 (7): 443-8. (in Russian)
5. Mardanly S.G., Dolgov V.V. On the role of clinical laboratory diagnosis of intrauterine infections. *Kompetentnost'*. 2013; 7 (108): 50-3. (in Russian)
6. Nikitina A.V., Pomelova V.G., Sokolova M.V., Osin N.S., Mardanly S.G. Detection of immunoglobulins g to causative agents of TORCH infections by multiplex immunoassay based on phosphan™ technology. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 61 (5): 289-92. (in Russian)
7. A.D. Kaprin, V.V. Starinskij, G.V. Petrova, eds. The status of cancer care for the population of Russia in 2017 [Sostoyanie onkologicheskoy pomoshchi naseleniyu Rossii v 2017 godu]. Moscow: MNIOI im. P.A. Gertsena - filial FGBU «NMIC radiologii» Minzdrava Rossii; 2018. (in Russian)
8. Ferlay J., Soerjomataram I., Ervik M., Dikshit R., Eser S., Mathers C., et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: *IARC Cancer Base*. 2015; 11.
9. Arnold M., Sierra M.S., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*. 2017; 66(4): 683-91.
10. Bosetti C., Bertuccio P., Malvezzi M., Levi F., Chatenoud L., Negri E., et al. Cancer mortality in Europe, 2005–2009, and an overview of trends since 1980. *Ann. Oncol.* 2013; 24: 2657–71.
11. Chatenoud L., Bertuccio P., Bosetti C., Malvezzi M., Levi F., Negri E., et al. Trends in mortality from major cancers in the Americas: 1980–2010. *Ann. Oncol.* 2014; 25: 1843–53.
12. Zhang J., Dhakal I.B., Zhao Z., Li L. Trends in mortality from cancers of the breast, colon, prostate, esophagus, and stomach in East Asia: role of nutrition transition. *Eur. J. Cancer Prev.* 2012; 21: 480–9.
13. Bosetti C., Levi F., Rosato V., Bertuccio P., Lucchini F., Negri E., et al. Recent trends in colorectal cancer mortality in Europe. *In. J. Cancer*. 2011; 129: 180–91.
14. Faivre J., Dancourt V., Lejeune C., Tazi M.A., Lamour J., Gerard D., et al. Reduction in colorectal cancer mortality by fecal occult blood screening in a French controlled study. *Gastroenterology*. 2004; 126: 1674–80.
15. Kronborg O., Jørgensen O.D., Fenger C., Rasmussen M. Randomized study of biennial screening with a fecal occult blood test: results after nine screening rounds. *Scand. J. Gastroenterol.* 2004; 39: 846–51.
16. Lindholm E., Brevinge H., Haglund E. Survival benefit in a randomized clinical trial of fecal occult blood screening for colorectal cancer. *Br. J. Surg.* 2008; 95: 1029–36.
17. European Colorectal Cancer Screening Guidelines Working Group, von Karsa L., et al. European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis: overview and introduction to the full supplement publication. *Endoscopy*. 2013; 45: 51–9.
18. Rex D.K., Boland C.R., Dominitz J.A., Giardiello F.M., Johnson D.A., Kaltenbach T., et al. Colorectal Cancer Screening: Recommendations for Physicians and Patients from the U.S. Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Am. J. Gastroenterol.* 2017; 112: 1016–30.
19. Von Karsa L., Patrick J., Segnan N. European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis. First Edition Executive summary. *Endoscopy*. 2012; 44 (3): 1–8.
20. Siegel R.L., Miller K.D., Fedewa S.A., Ahnen D.J., Meester R.G.S., Barzi A., Jemal A. Colorectal Cancer Statistics, 2017. *Cancer J. Clin.* 2017; 67: 177–93.
21. Young J.P., Win A.K., Rosty C., Flight I., Roder D., Young G.P., et al. Rising incidence of early-onset colorectal cancer in Australia over two decades: report and review. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2015; 30: 6–13.
22. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines): Colorectal Cancer Screening. National Comprehensive Cancer Network. Fort Washington: NCCN, 2017. https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/colorectal_screening.pdf.
23. http://www.pharmatimes.com/news/bowel_cancer_screening_to_start_10_years_earlier_1248694.
24. Wolf A.M.D., Fontham E.T.H., Church T.R., Flowers C.R., Guerra C.E., LaMonte S.J., et al. Colorectal Cancer Screening for Average-Risk Adults: Guideline Update From the American Cancer Society, 2018. *Cancer J. Clin.* 2018; 68: 250–81.
25. German Cancer Society. Evidence-based Guideline for Colorectal Cancer, long version 1.0. *Berlin: GGPO*; 2014. http://www.awmf.org/fileadmin/user_upload/Leitlinien/021_D_Ges_fuer_Verdauungs-_und_Stoffwechselkrankheiten/021-007_S3_Colorectal_Cancer_2015_03-extended.pdf.
26. Lee B.I., Hong S.P., Kim S.E., Kim S.H., Kim H.S., Hong S.N., et al. Korean guidelines for colorectal cancer screening and polyp detection. *Clin. Endosc.* 2012; 45: 25–43.
27. Crotta S., Segnan N., Paganin S., Dagnes B., Rosset R., Senore C. High Rate of Advanced Adenoma Detection in 4 Rounds of Colorectal Cancer Screening With the Fecal Immunochemical Test. *Clin. Gastroenterol. and Hepatol.* 2012; 10:633-8.
28. Kronborg O., Fenger C., Olsen J., Jorgenson OD, Sondergaard O. Randomised study of screening for colorectal cancer with fecal-occult-blood test. *Lancet*. 1996; 348: 1467–71.
29. Lieberman D.A., Weiss D.G. One-time screening for colorectal cancer with combined fecal occult-blood testing and examination of the distal colon. *N. Engl. J. Med.* 2001; 345: 555–60.
30. Lee J.K., Liles E.G., Bent S., Levin T.R., Corley D.A. Accuracy of fecal immunochemical tests for colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Ann. Intern. Med.* 2014; 160: 171.
31. Robertson D.J., Lee J.K., Boland C.R., Dominitz J.A., Giardiello F.M., Johnson D.A., et al. Recommendations on fecal immunochemical testing to screen for colorectal neoplasia: a consensus statement by the US Multi-Society Task Force on colorectal cancer. *Am. J. Gastroenterol.* 2017; 112 (1): 37-53.
32. Carroll M.R., Seaman H.E., Halloran S.P. Tests and investigations for colorectal cancer screening. *Clin. Biochem.* 2014; 47: 921-39.
33. Issa I.A., Nouredine M. Colorectal cancer screening: An updated review of the available options. *World J. Gastroenterol.* 2017; 23 (28): 5086-96.

Поступила 26.08.19
Принята к печати 02.09.19

© ГОРЕНКО И.Н., 2019

Горенко И.Н.

УРОВНИ АНТИТЕЛ К ТКАНЯМ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ЭУТИРЕОИДНЫХ МУЖЧИН И ЖЕНЩИН, ЖИТЕЛЕЙ АРКТИЧЕСКОЙ ЗОНЫ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФГБУН Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики имени академика Н.П. Лавёрова
РАН, 163000, г. Архангельск, Россия

Целью исследования было определение уровней антител к тканям щитовидной железы и их взаимосвязи с тиреоидными гормонами и тироглобулином у эутиреоидных мужчин и женщин, жителей Арктической зоны Российской Федерации. Были обследованы 208 практически здоровых людей, разделенных на группы в зависимости от пола и уровня аутоантител в крови. Методом иммуноферментного анализа в сыворотке крови определяли уровни гормонов гипофизарно-тиреоидной системы, тироглобулина и антител. В ходе исследования была определена распространенность положительных антител среди различных групп обследованных лиц и изучена характеристика эутиреоидных субъектов со сверхнормативными уровнями антител к щитовидной железе. Циркулирующие положительные антитела к тканям щитовидной железы определяются у 20% обследованных жителей Арктической зоны РФ. Медиана содержания антител к тиреопероксидазе (АнтиТПО), антител к тироглобулину (АнтиТГ) в крови и процент лиц с положительными антителами (то есть АнтиТПО ≥ 50 МЕ/мл и/или АнтиТГ ≥ 100 МЕ/мл) были статистически значимо выше у женщин, чем у мужчин, в общей популяции ($p < 0,01$). Такие уровни антител к щитовидной железе сочетаются с более высокой функциональной активностью щитовидной железы у женщин, что демонстрируют достоверно более высокие уровни тироксина и более низкие значения тироглобулина в периферической крови. Доля женщин с положительными АнтиТПО увеличивалась с возрастом с 18 до 33% (в группах 18-44 и 45-59 лет соответственно, $p=0,04$). Результаты исследования показывают корреляцию между параметрами теста функции щитовидной железы и уровнями антител щитовидной железы, уточняя клиническую значимость антител к щитовидной железе при клиническом обследовании и наблюдении пациентов с аутоиммунными нарушениями.

Ключевые слова: аутоантитела; тиреоидные гормоны; тиреотропный гормон; Арктика

Для цитирования: Горенко И.Н. Уровни антител к тканям щитовидной железы у эутиреоидных мужчин и женщин, жителей Арктической Зоны Российской Федерации. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (9): 541-545.
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-9-541-545>

Gorenko I.N.

THYROID ANTIBODIES LEVELS IN EUTHYROID MEN AND WOMEN – RESIDENTS OF THE ARCTIC ZONE OF THE RUSSIAN FEDERATION

N. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research (FCIARctic), 163000, Arkhangelsk, Russia

The aim of the study was to determine the levels of thyroid antibodies and their relationship with thyroid hormones and thyroglobulin in euthyroid men and women, residents of the Arctic zone of the Russian Federation. A total of 208 apparently healthy people were enrolled in this study and classified into two groups depending on gender and level of autoantibodies in the blood. Serum hormones of the pituitary-thyroid system, thyroglobulin and antibodies concentration was measured by enzyme immunoassay. The prevalence of positive antibodies among various examined groups was determined and the characteristics of euthyroid subjects with abnormal thyroid antibodies levels were studied. Circulating positive thyroid antibodies were found in 20% of the surveyed residents of the Arctic zone of the Russian Federation. The median serum antibodies against thyroid peroxidase (AntiTPO) or thyroglobulin (AntiTG) levels and the percentage of people in general population with positive antibodies (i.e. AntiTPO ≥ 50 IU / ml and / or AntiTG ≥ 100 IU / ml) were statistically significant higher in women than in men, $p < 0.01$. Such thyroid antibodies levels were associated with a higher thyroid gland functional activity in women, which was demonstrated by significantly higher thyroxine level and lower thyroglobulin value in the peripheral blood. Part of women positive for AntiTPO increased with age from 18 to 33% (in groups aged 18-44 and 45-59 years, $p = 0.04$). The findings of the study reveal correlation between thyroid function test and thyroid antibodies levels, elaborating the clinical importance of thyroid antibodies in clinical examination and follow-up of patients with autoimmune thyroid disorders.

Key words: autoantibodies; thyroid hormones; thyroid-stimulating hormone; Arctic

For citation: Gorenko I.N. Thyroid antibodies levels in euthyroid men and women – residents of the Arctic Zone of the Russian Federation. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64(9): 541-545. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-9-541-545>

For correspondence: Gorenko I.N., research scientist of laboratory of endocrinology named after prof. A.V. Tkachev; e-mail: pushistiy-86@mail.ru

Information about author:

Gorenko I.N., <http://orcid.org/0000-0003-3097-9427>

Acknowledgment. The study was carried out in accordance with the R&D financing plan of the FCIARctic on the topic «Determination of the modulating effect of the blood content of catecholamines on the hormonal profile in humans and hydrobionts of the European North» (state number AAAA-A15-115122810188-4).

Conflict of interest. The author declare absence of conflict of interests.

Received 20.05.2019
Accepted 31.05.2019

Для корреспонденции: Горенко Ирина Николаевна, науч. сотр. лаб. эндокринологии; e-mail: pushistiy-86@mail.ru

Введение. Гормоны щитовидной железы были признаны одними из наиболее важных регуляторных гормонов, которые модулируют каждый компонент метаболических путей. Дисфункция щитовидной железы распространена в клинической практике и имеет значительные последствия. Наиболее частой причиной гипотиреоза являются аутоиммунные заболевания щитовидной железы, характеризующиеся наличием антитиреоидных антител [1]. Тиреопероксидаза (ТПО) является ключевым ферментом в образовании гормонов щитовидной железы и основным аутоантигеном при аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы. Анализ сывороточных антител к ТПО (АнтиТПО) стали намного более чувствительными, и очень низкие титры могут быть обнаружены практически у всех субъектов. Ряд крупномасштабных исследований установил высокую распространенность антител к ТПО у эутиреоидных субъектов [2–4].

АнтиТПО могут влиять на способность тиропероксидазы использовать йод для производства гормонов щитовидной железы, что приводит к гипотиреозу, они также могут вызывать воспаление и в конечном итоге разрушить всю или часть щитовидной железы, а также привести к образованию узелков или гипертрофии щитовидной железы [4]. Уровни антител к тиреоидной пероксидазе и антител к тиреоглобулину (АнтиТГ) считаются диагностическими для аутоиммунных заболеваний щитовидной железы, поскольку они присутствуют в более чем 90% случаев тиреоидита Хашимото и более чем в 80 % случаев болезни Грейвса [5].

АнтиТПО и АнтиТГ связаны с уровнями тиреотропного гормона (ТТГ), и оба по отдельности или в комбинации были использованы для прогнозирования развития гипотиреоза [6, 7]. Так, исследование М.Р. Vanderpump и соавт. [8] показало, что степень прогрессирования к явному гипотиреозу составляет 2,1% в год только на основании наличия АнтиТПО (на фоне референтного уровня ТТГ) с увеличением этого риска до 4,3% в год при комбинации ТТГ > 6,0 мкМЕ/л и положительных АнтиТПО. Таким образом, большинство исследователей придерживается мнения о том, что присутствие АнтиТПО даже на фоне нормальных уровней ТТГ в крови предшествует развитию недостаточности щитовидной железы. При этом важно отметить, что у некоторых людей, несмотря на наличие положительных антител к ТПО, никогда не развивается гипотиреоз.

Определение профиля щитовидной железы у людей с положительными антителами к тканям щитовидной железы очень важно для своевременной диагностики тиреоидных нарушений, поскольку такие антитела были обнаружены у здоровых людей [3, 4]. Например, частота встречаемости положительных АнтиТПО среди эутиреоидных женщин и мужчин согласно Национальной программе проверки здоровья и питания США (NHANES III) составила 14,6 и 8,0% соответственно [2].

В крупных популяционных исследованиях наблюдается явное преобладание женщин с положительными уровнями антител к тканям щитовидной железы: в исследовании NHANES III [2], посвященном изучению 17533 представителей различных географических и этнических групп населения США за период с 1988 по 1994 года, соотношение женщин и мужчин составляло 2:1, в историческом когортном исследовании 2779 представителей Великобритании за двадцатилетний период – 3:1 [8].

Известно, что природно-климатические условия Севера приводят к повышению содержания и разнообразия продуктов тканевого обмена со свойствами аутоантигенов [9], а щитовидная железа одной из первых реагирует на постоянно меняющиеся условия внешней среды, изменяя свою функциональную активность [10, 11]. Однако распространенность антител к тканям щитовидной железы среди различных групп населения севера РФ, как и их связь с профилем щитовидной железы, а именно уровнями ТТГ, тироксина, трийодтиронина, тироглобулина в целом малоизучена [12, 13].

В связи с этим целью работы стало определение уровней антител к тканям щитовидной железы и их взаимосвязи с тиреоидными гормонами и тироглобулином у эутиреоидных мужчин и женщин, проживающих на территории, относящейся к Арктической зоне Российской Федерации.

Материал и методы. Проведено аналитическое поперечное неконтролируемое исследование, в котором приняли участие 208 эутиреоидных субъектов (98 мужчин и 110 женщин), жителей Арктической зоны Российской Федерации, в возрасте от 22 до 70 лет, средний возраст (среднее значение ± стандартная ошибка среднего) женщин составил $44 \pm 1,01$ лет, мужчин – $40 \pm 0,8$ лет, со статистически значимой разницей, $p=0,002$. Для анализа распространенности положительных аутоантител обследованные лица подразделялись на две группы: группа А (91 мужчина и 76 женщин) – лица с нормальными значениями тиреоидных гормонов и отрицательными значениями антител (АнтиТПО < 50 МЕ/мл и / или АнтиТГ < 100 МЕ/мл), группа В (7 мужчин и 34 женщины) – лица с нормальными значениями тиреоидных гормонов и положительными антителами (АнтиТПО ≥ 50 МЕ/мл и/или АнтиТГ ≥ 100 МЕ/мл). Согласно классификации возрастов, принятой Всемирной организацией здравоохранения, обследованные лица были разделены на группы: молодой возраст – 18–44 лет (1-я группа), средний возраст – 45–59 лет, пожилой возраст – 60–74 лет. В 2003 году Национальная академия клинической биохимии (НАСВ) США рекомендовала снизить верхний контрольный предел ТТГ до 2,5 мкМЕ/л на основе широкомасштабного эпидемиологического обследования, которое выявило, что более 95% нормальных людей имеют уровни ТТГ < 2,5 мкМЕ/л, а люди с более высоким уровнем ТТГ могут иметь различные заболевания щитовидной железы [11]. Согласно данным рекомендациям была вычислена доля лиц с уровнями ТТГ > 2,5 мкМЕ/л.

Обследование проводилось с добровольного согласия участников и в соответствии с документом «Этические принципы медицинских исследований с участием человека в качестве субъекта исследования» (Хельсинкская декларация Всемирной Медицинской Ассоциации 1964 г. с изменениями и дополнениями 2013 г.). В ходе исследования осуществлялось анкетирование, забор крови из локтевой вены и осмотр врача, на основании заключения которого делался вывод о состоянии здоровья испытуемых. Для измерения уровней гормонов и антител пробы крови брали утром, между 7:00 и 10:00, после 12–14 ч голодания. Образцы крови центрифугировали при 2000 об/мин в течение 15 минут. Собранную сыворотку хранили при -20°C до определения в ней концентраций гормонов и антител. При анализе анкетных данных из обследования исключались лица, состоящие на диспансерном учете у эндокринолога, имеющие в анамнезе заболевания сердечно-сосудистой системы, низкий (<17 кг/м²) или высокий индекс массы тела (>25 кг/м²).

Методом иммуноферментного анализа (ИФА) на планшетном автоматическом анализаторе для ИФА (ELISYS Uno, Германия) в сыворотке крови определяли уровни тиреотропного гормона (ТТГ), общего трийодтиронина (T_3), общего тироксина (T_4), свободного трийодтиронина (св. T_3), свободного тироксина (св. T_4) с использованием наборов фирмы Human GmbH (Германия), антител к тиреопероксидазе (АнтиТПО), антител к тироглобулину (АнтиТГ) с использованием наборов фирмы Euroimmun (Германия). За норму принимались предлагаемые нормативы для соответствующих коммерческих тест-наборов.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 10.0. В связи с тем, что большинство полученных выборок не имели нормального распределения (оценка по критерию Шапиро – Уилка), были использованы непараметрические методы анализа. Пороговое значение уровня значимости (p) принимали равным 0,05. Значимость различий между группами оценивали с помощью U-критерия Манна-Уитни. Наряду с этим проводили вычисление медиан (Me) и 10–90-х перцентильных интервалов изучаемых признаков в группах для того, чтобы исключить более редкие и выпадающие из общей массы значения концентраций гормонов. Корреляции между значениями выборок определялись с помощью рангового коэффициента корреляции Спирмена (R).

Результаты. В общей популяции положительный уровень АнтиТПО (≥ 50 МЕ/мл) был обнаружен у 16,3% обследованных, а положительный АнтиТГ (≥ 100 МЕ/мл) был обнаружен у 6,4%. Приблизительно 20% населения всей обследованной эутиреоидной популяции имели положительные АнтиТПО или АнтиТГ. Из тех, у кого были положительные АнтиТГ, 36% также имели положительные АнтиТПО; а из тех, у кого были положительные АнтиТПО, 26% также имели положительные АнтиТГ. Положительные АнтиТПО и АнтиТГ были обнаружены одновременно у 4,3% обследованных.

В группе лиц со сверхнормативными уровнями АнтиТПО в крови статистически значимо выше уровни АнтиТГ (48,1 (4,3–245,5) против 4,3 (0–21,2) МЕ/мл, $p < 0,001$) и ниже значения тироглобулина (5,4 (0,5–31,3) против 15,1 (3–44,6) нг/мл, $p < 0,001$) по сравнению с обследованными, уровни АнтиТПО в крови которых соответствуют значениям норы.

Анализ функциональной активности щитовидной железы жителей Арктической зоны РФ в зависимости от пола показал статистически значимо более высокие уровни тироксина и более низкие уровни тироглобулина в крови женщин по сравнению с мужчинами на фоне достоверно более высоких уровней антител к щитовидной железе (табл. 1). Распространенность положительных АнтиТПО и АнтиТГ в общей популяции была выше у женщин, чем у мужчин, и составила для АнтиТПО 25,5% против 6% ($p < 0,001$), а для АнтиТГ 10% против 3% ($p = 0,02$). Процент лиц с положительными антителами к щитовидной железе вместе или по отдельности (то есть АнтиТПО ≥ 50 МЕ/мл и / или АнтиТГ ≥ 100 МЕ/мл) статистически значимо выше среди женщин, чем среди мужчин, в общей популяции (30,9% против 7%, $p < 0,001$). Процент аномальных результатов тестов функции щитовидной железы среди женщин по сравнению с мужчинами для уровней ТТГ $> 2,5$ мкМЕ/л составил 31,2% против 2% ($p < 0,001$), для св. $T_3 > 6,45$ пмоль/л – 11,6% против 21,4% ($p = 0,03$), относительно остальных показателей статистически значимых отличий выявлено не было. Не смотря на то, что в общей популяции отсутствовали статистически значимые возрастные изменения уровней циркулирующих тиреоидных антител, как у мужчин, так и у женщин, распространенность положительных АнтиТПО у женщин увеличивалась с возрастом с 18% в возрасте 18–44 лет до 33% в группе 45–59 лет ($p = 0,04$).

В результате корреляционного анализа были установлены статистически значимые взаимосвязи уровней антител к тканям щитовидной железы с тиреоидными

Таблица 1

Содержание антител к щитовидной железе, гормонов гипофизарно-тиреоидной системы, тироглобулина в крови у жителей Арктической зоны РФ, Me (10%-90%).

Показатель, норма	Мужчины	Женщины	p -уровень
ТТГ 0,3–4,0 мкМЕ/л	1,78 (0,74–3,52)	1,96 (0,8–3,97)	$> 0,1$
T_4 ♂ 56,6–139 нмоль/л ♀ 61,8–149,3 нмоль/л	102,3 (69,0–123,7)	109,0 (74,0–134,8)	0,005
св. T_4 10,3–25,7 пмоль/л	14,5 (11,7–17,7)	14,5 (11,5–18,4)	$> 0,1$
T_3 1,06–3,1 нмоль/л	1,6 (1,1–2,5)	1,6 (1,1–3,2)	$> 0,1$
св. T_3 2,15–6,45 пмоль/л	5,2 (3,3–7,5)	5,1 (3,5–7,0)	$> 0,1$
Тироглобулин 2–50 нг/мл	17,1 (4,7–41,0)	10,1 (0,9–45,1)	0,001
АнтиТПО < 50 МЕ/мл	4,4 (1,1–20,9)	9,0 (1,1–219,5)	0,002
АнтиТГ < 100 МЕ/мл	2,1 (0,0–12,8)	9,5 (1,4–91,7)	0,001

Примечание. Me – медиана значений признака; 10%-90% – перцентильный интервал; p -уровень – уровень значимости различий; ♂ – значения нормы в группе мужчин; ♀ – значения нормы в группе женщин.

Таблица 2

Корреляционные взаимосвязи между уровнями антител и гормонов щитовидной железы у жителей Арктической зоны РФ.

Показатель	R	p-уровень
АнтиТПО		
ТТГ	0,17	0,004
T ₄	0,14	0,018
св. T ₄	-0,13	0,028
T ₃	0,20	<0,001
св. T ₃	0,08	0,170
Тироглобулин	-0,26	<0,001
АнтиТГ		
ТТГ	-0,13	0,025
T ₄	-0,26	<0,001
св. T ₄	0,42	<0,001
T ₃	-0,10	0,070
св. T ₃	-0,35	<0,001
Тироглобулин	-0,57	<0,001

Примечание. R – коэффициент корреляции Спирмена; p-уровень – уровень значимости различий.

гормонами, ТТГ и тироглобулином (табл. 2). АнтиТПО положительно взаимосвязан с уровнями ТТГ, T₃, T₄, св. T₄ и отрицательно с тироглобулином. АнтиТГ отрицательно взаимосвязан с ТТГ, тироглобулином, T₄ и св. T₃, и положительно с св. T₄.

Обсуждение. В исследуемой популяции жителей Арктической зоны РФ распространённость положительных уровней АнтиТПО выше, чем положительных АнтиТГ, при этом в исследуемых образцах сыворотки крови АнтиТПО присутствуют в более высоких титрах, чем АнтиТГ, что соответствует аналогичным исследованиям [15].

Известно, что от 2 до 4 % женщин и до 1% мужчин во всем мире страдают от аутоиммунных заболеваний щитовидной железы, и уровень распространённости увеличивается с возрастом [16]. Настоящее исследование показывает, что концентрации АнтиТПО и АнтиТГ в сыворотке и распространённость антител против щитовидной железы выше у женщин, чем у мужчин, и это подтверждает, что женщины Арктической зоны Российской Федерации страдают от аутоиммунных болезней щитовидной железы чаще, чем мужчины. Этот вывод аналогичен исследованию, проведенному G.J.Canaris и соавт. [16], в котором упоминалось, что аутоиммунные заболевания щитовидной железы поражают женщин в 2-4 раза чаще, чем мужчин. Характерная для женщин высокая распространённость антител к щитовидной железе по сравнению с мужчинами была отмечена исследователями ряда стран: Пакистана [17], США [2], Индии [18] и Непала [1].

Согласно литературным данным явный гипотиреоз развивается со скоростью 5% в год у женщин, которые первоначально имели как повышенные концентрации ТТГ, так и положительные антитела к щитовидной железе [19]. Интересно отметить, что в нашем исследовании высокие уровни антител к щитовидной железе сочетаются с более высокой функциональной активностью щитовидной железы у женщин, что демонстрируют

статистически значимо более высокие уровни тироксина и более низкие значения тироглобулина в периферической крови, на фоне отсутствия значимых отличий уровня ТТГ. Однако анализ аналогичных исследований показывает, что для лиц с положительными антителами к тканям щитовидной железы характерны также и повышенные уровни ТТГ [2]. Также в настоящем исследовании было установлено, что число женщин с уровнями ТТГ > 2,5 мкМЕ/л статистически значимо выше, чем мужчин. В связи с этим профилактическое лечение тироксином может быть оправдано у женщин, у которых обнаружены оба признака надвигающейся недостаточности щитовидной железы (повышенные концентрации ТТГ и антител к щитовидной железе).

Несмотря на то, что большинство источников указывает на увеличение содержания антител к щитовидной железе с возрастом [1, 9], в нашем исследовании отсутствовали значимые возрастные изменения уровней АнтиТПО и АнтиТГ как у мужчин, так и у женщин, что, возможно, связано с меньшим числом обследованных, чем в аналогичных работах. В то же время доля женщин с положительными АнтиТПО в крови с возрастом статистически значимо увеличивалась. Подобного рода возрастные изменения у женщин были отмечены в национальном исследовании США (NHANES) [2]. M.Swain [20] с соавторами сообщали, что большинством (95%) пациентов с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы были женщины в возрастной группе 30–50 лет.

Хотя это поперечное исследование не определяет риск развития субклинического гипотиреоза, такое прогрессирование было зарегистрировано в некоторых продольных исследованиях [8, 19, 21]. Поскольку, по мнению ряда авторов антитела к тканям щитовидной железы чаще присутствуют при нарушении секреции ТТГ [17], то именно эту категорию граждан следует относить к группе риска по развитию субклинического гипотиреоза. Данное утверждение вполне согласуется с результатами нашего корреляционного анализа показавшего, что именно в группе женщин с уровнями АнтиТПО ≥ 50 МЕ/мл значения антител положительно взаимосвязаны с ТТГ. По мнению Bektas Uysal H.[22], положительные антитела к щитовидной железе являются маркерами для последующего развития системного аутоиммунного заболевания с многочисленными симптомами.

Корреляционный анализ показал наличие взаимосвязей между тиреоидными гормонами, ТТГ, тироглобулином и антителами к щитовидной железе, причём не только для АнтиТПО, что было описано ранее другими исследователями, но и для АнтиТГ. Так, S. Dhakal и соавт. [1] показали наличие значимых корреляционных взаимосвязей между АнтиТПО и уровнями ТТГ ($r=0,67$, $p<0,001$) и св. T₄ ($r=-0,38$, $p = <0,001$), однако, спектр гормонов щитовидной железы был ограничен свободными фракциями и не рассматривались уровни тироглобулина и АнтиТГ. Изучая пациентов с аутоиммунными заболеваниями, S.M. Ghoraihsian и соавт. [23] также продемонстрировали значимую взаимосвязь между повышенными титрами АнтиТПО и концентрациями ТТГ и T₄. Кроме того, исследование, проведенное в Греции, показало значимую связь между субклиническим гипотиреозом и положительными антителами к щитовидной железе [24].

Таким образом, наши результаты подтверждают взаимосвязь между тестом функции щитовидной железы и значениями антител у эутиреоидных субъектов, про-

живающих на территории, относящейся к Арктической зоне РФ, что указывает на клиническую значимость АнтиТПО и АнтиТГ и предполагает проведение клинического обследования с использованием УЗИ-диагностики и последующее наблюдение за пациентами с высоким титром антител к тканям щитовидной железы.

Выводы:

1) уровни антител к тиреопероксидазе и антител к тироглобулину в крови и процент лиц с положительными антителами были статистически значимо выше у женщин, по сравнению с мужчинами;

2) более высокие уровни антител к тканям щитовидной железы у женщин сочетаются со статистически значимо более высокими концентрациями тироксина и более низкими значениями тироглобулина в периферической крови, по сравнению с мужчинами;

3) частота встречаемости женщин со сверхнормативными уровнями антител к тиреопероксидазе в возрасте 45-59 лет статистически значимо выше, чем в группе 18-44 лет;

4) корреляционный анализ показал наличие положительной взаимосвязи антител к тиреопероксидазе с уровнями ТТГ, T_3 , T_4 , св. T_4 и отрицательной – с тироглобулином; антитела к тироглобулину отрицательно взаимосвязаны с ТТГ, тироглобулином, T_4 и св. T_3 , и положительно – со св. T_4 .

Финансирование. Работа выполнена в соответствии с планом ФНИР ФГБУН ФИЦКИА РАН по теме «Выяснение модулирующего влияния содержания катехоламинов в крови на гормональный профиль у человека и гидробионтов Европейского Севера» (номер гос. регистрации АААА-А15-115122810188-4).

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-8, 13-24 см. REFERENCES)

- Лютфалиева Г.Т., Чуркина Т.С. Роль аутоантител в адаптивных механизмах регуляции функциональной активности тиреоидных гормонов и тиреотропного гормона гипофиза у жителей Севера. *Экология человека*. 2010; 10: 33-6.
- Типисова Е.В., Аленикова А.Э., Карякина О.Е. Зависимость содержания гормонов в крови у жителей Европейского Севера от погодных факторов. *Вестник Уральской медицинской академической науки*. 2014; 2: 47-51.
- Типисова Е. В., Киприянова К.Е., Горенко И.Н., Лобанов А.А., Попов А.И., Андронов С.В. и др. Содержание дофамина и гормонов системы гипофиз-щитовидная железа в крови у кочующего, оседлого и местного населения Арктики. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62(5): 291-6.
- Горенко И.Н., Киприянова К.Е., Типисова Е.В. Тиреоидные гормоны и уровень антител у здоровых жителей Архангельской области. *Экология человека*. 2018; 9: 36-41.

REFERENCES

- Dhakal S., Nagila A., Koirala R., Bhatta M.P., Regmi S.M., Hamza A.M. et al. Correlation of anti-thyroid peroxidase antibodies (Anti-TPO) with thyroid hormones in local population of Western Nepal. *International Journal of Advanced Research*. 2017; 5(4): 692-9.
- Hollowell J.G., Staehling N.W., Flanders W.D. Hannon W.H., Gunter E.W., Spencer C.A. et al. Serum TSH, T_4 , and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002; 87: 489-99.
- McLeod D.S.A., Cooper D.S. The incidence and prevalence of thyroid autoimmunity. *Endocrine Journal*. 2012; 42(2): 252-65.
- Prummel M.F., Wiersinga W.M. Thyroid peroxidase auto antibodies

- in euthyroid subjects. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005; 19(1): 1-15.
- Stathatos N., Daniels G.H. Autoimmune thyroid disease. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2012; 24(1): 70-5.
- Roos A., Links T.P., De Jong-Van Den Berg L.T.W., Gans R.O.B., Wolfenbutter B.H.R., Bakker S.J.L. Thyroid peroxidase antibodies, levels of thyroid stimulating hormone and development of hypothyroidism in euthyroid subjects. *European Journal of Internal Medicine*. 2010; 21(6): 555-9.
- Walsh J.P., Bremner A.P., Feddema P., Leedman P.J., Brown S.J., O'Leary P. Thyrotropin and thyroid antibodies as predictors of hypothyroidism: a 13-year, longitudinal study of a community-based cohort using current immunoassay techniques. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2010; 95(3): 1095-104.
- Vanderpump M.P., Tunbridge W.M., French J.M., Appleton D., Bates D., Clark F. et al. The incidence of thyroid disorders in the community: a twenty-year follow-up of the Whickham Survey. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 1995; 43: 55-68.
- Lyutfuliyeva G.T., Churkina T.S. Autoantibodies' role in adaptive mechanisms of regulation of functional activity of thyroid hormone and thyrotropin hormone of hypophysis in northern inhabitants. *Ekologiya cheloveka*. 2010; 10: 33-6. (in Russian)
- Tipisova E.V., Alenikova A.E., Karyakina O.E. Dependence of hormone levels in the blood on weather factors in men from European North. *Vestnik Ural'skoy medicinskoj akademicheskoy nauki*. 2014; 2: 47-51. (in Russian)
- Tipisova E.V., Kipriyanova K.E., Gorenko I.N., Lobanov A.A., Popov A.I., Andronov S.V. et al. The content of dopamine and hormones of system "hypophysis-thyroid" in blood of nomadic, settled and local population of the Arctic. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2017; 62(5): 291-6. (in Russian)
- Gorenko I.N., Kipriyanova K.E., Tipisova E.V. Thyroid hormones and antibody level in healthy residents of the Arkhangelsk region. *Ekologiya cheloveka*. 2018; 9: 36-41. (in Russian)
- Tipisova E.V., Gorenko I.N., Popkova V.A., Elfimova A.E., Potutkin D.S., Andronov S.V. et al. The Relationship between blood thyroid hormone and dopamine levels in residents of the Arctic Regions of Russia. *International Journal of Biomedicine*. 2019; 9 (1): 43-7.
- Kratzsch J., Fiedler G.M., Leichter A., Brügel M., Buchbinder S., Otto L. et al. New reference intervals for thyrotropin and thyroid hormones based on National Academy of Clinical Biochemistry criteria and regular ultrasonography of the thyroid. *Clin. Chem.* 2005; 51(8): 1480-6.
- Fröhlich F., Wahl R. Thyroid autoimmunity: role of anti-thyroid antibodies in thyroid and extra-thyroidal diseases. *Front Immunol.* 2017; 8(521). Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.00521/full> (accessed 9 May 2017).
- Canaris G.J., Manowitz N.R., Mayor G., Ridgway C. The Colorado thyroid disease prevalence study. *Arch. Intern. Med.* 2000; 160: 526-34.
- Tipu H.N., Ahmed D., Bashir M.M., Asif N. Significance of testing anti-thyroid autoantibodies in patients with deranged thyroid profile. *J. Thyroid. Res.* 2018; 2018: 9610497. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5925209/> (accessed 11 April 2018).
- Unnikrishnan A.G., Kalra S., Sahay R.K., Bantwal G., John M., Tewari N. Prevalence of hypothyroidism in adults: An epidemiological study in eight cities of India. *Indian J. Endocrinol. Metab.* 2013; 17(4): 647-52.
- Tunbridge W.M., Brewis M., French J.M., Appleton D., Bird T., Clark F. et al. Natural history of autoimmune thyroiditis. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)*. 1981; 282: 258-82.
- Swain M., Swain T., Kumar Mohanty B. Autoimmune thyroid disorders – An update. *Indian J. Clin. Biochem.* 2005; 20: 9-17.
- Pandey J.P., Fudenberg H.H., Ainsworth S.K., Loadholt C.B. Autoantibodies in health subjects of different age groups. *Mech. Ageing Dev.* 1979; 10(6): 399-404.
- Bektas Uysal H., Ayhan M. Autoimmunity affects health-related quality of life in patients with Hashimoto's thyroiditis. *Kaohsiung J. Med. Sci.* 2016; 32(8): 427-33.
- Ghoraishian S.M., Moghaddam S.H., Afkhami Ardekani M. Relationship between anti-thyroid peroxidase antibody and thyroid function test. *Iran J. Immunol.* 2006; 3: 146-9.
- Zois C., Stavrou I., Kalogera C., Svarna E., Dimoliatis I., Seferiadis K. et al. High prevalence of autoimmune thyroiditis in schoolchildren after elimination of iodine deficiency in North-western Greece. *Thyroid*. 2003; 13: 485-9.

Поступила
Принята к печати

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Рунина А. В.¹, Шpileвая М. В.¹, Филиппова М. А.², Катунин Г. Л.¹, Кубанов А. А.¹

ПРИМЕНЕНИЕ ИММУНОЧИПА С ПАНЕЛЬЮ ИЗ 12 ДИАГНОСТИЧЕСКИХ АНТИГЕНОВ *T. PALLIDUM* ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ДИНАМИКИ ПРОФИЛЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ КЛАССОВ IGG И IGM В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ СИФИЛИСОМ ДО И ПОСЛЕ ТЕРАПИИ

¹ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» Минздрава РФ, 107076, Москва, Россия;

²ФГБУ Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, Россия

Цель исследования – применение иммуночипа с панелью из 12 диагностических антигенов *T. pallidum* для изучения динамики профиля иммуноглобулинов классов IgG и IgM у больных различными формами сифилиса в процессе клинико-серологического контроля и оценка прогностической значимости полученных результатов. Динамику показателей иммуноглобулинов двух классов IgG и IgM по результатам реакции непрямой флуоресценции (нРИФ) на иммуночипе сравнивали с показателями нетрепонемного – RPR и трепонемных – ИФА, РПГА серологических тестов. В сыворотке крови пациентов с первичным, вторичным, ранним скрытым и поздним скрытым сифилисом с диагностически значимым уровнем IgM-антител после успешного лечения в нРИФ на иммуночипе отмечается негативация результатов данного теста. Сохранение противотрепонемных IgM может свидетельствовать об активности инфекционного процесса и служить показанием к проведению дополнительного специфического лечения. Выраженная в большинстве случаев в нРИФ тенденция к снижению диагностически значимого титра антител класса IgG после адекватной и полноценной антибиотикотерапии может свидетельствовать об успешном лечении. Полученные с использованием иммуночипа результаты не противоречат данным стандартных серологических тестов. Технология с применением иммуночипа даёт перспективу расширения диагностических возможностей трепонемных тестов при контроле качества проводимого лечения и детекции антител класса IgM в качестве критерия эффективности терапии сифилиса.

Ключевые слова: иммуночип; иммунофлуоресценция; серологические тесты; иммуноглобулины; *T. pallidum*.

Для цитирования: Рунина А. В., Шpileвая М. В., Филиппова М. А., Катунин Г. Л., Кубанов А. А. Применение иммуночипа с панелью из 12 диагностических антигенов *T. pallidum* для изучения динамики профиля иммуноглобулинов классов IgG и IgM у больных различными формами сифилиса. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (9): 546-552.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-9-546-552>

Runina A. V.¹, Shpilevaya M. V.¹, Filippova M. A.², Katunin G. L.¹, Kubanov A. A.¹

DIAGNOSTIC IMMUNOARRAY ASSAY FOR CHARACTERIZATION OF IMMUNOGLOBULIN IGG AND IGM LEVEL IN SYPHILIS PATIENTS SERUM TOWARDS 12 RECOMBINANT ANTIGENS OF *T. PALLIDUM* BEFORE AND AFTER THE THERAPY

¹State Research Center of Dermatovenereology and Cosmetology 107076, Moscow, Russia;

²The V.A. Engelhardt Institute of Molecular Biology, 119991, Moscow, Russia

For correspondence: Shpilevaya M.V., Ph.D., senior researcher; e-mail: Aniram1970@list.ru

The aim of the study was to characterize the dynamics of immunoglobulin IgG and IgM level in syphilis patients serum at different stages of the disease before and after the therapy towards 12 diagnostic antigens of *T. pallidum* in an microarray assay and to evaluate these data as possible prognostic markers. The dynamics of immunoglobulin IgG and IgM level was measured in the reaction of indirect immunofluorescence using microarray and compared to the results of non-treponemal RPR test and treponemal tests as EIA and reaction of passive hemagglutination. In microarray assay diagnostically high level of IgM in patients with primary, secondary and early latent and late latent syphilis decreased dramatically to zero after the successful therapy. Continuously high level of IgM after the therapy proposes the persistence of infection agents in the organism and points out the need of additional antimicrobial treatment. In most of the cases anti-treponemal IgG level also declined after the successful therapy and this confirms the appropriate treatment. The results of microarray assay coincide with the results of other mentioned laboratory tests for syphilis diagnostics. Microarray assay with the recombinant *T. pallidum* antigens gives the perspective for creating methods with wider spectrum of diagnostic and therapy control options using the IgM immunoglobulin level as a marker for successful syphilis treatment.

Key words: microarray; immunofluorescence; serological test; immunoglobulins; *T. pallidum*.

For citation: Runina A.V., Shpilevaya M.V., Filippova M.A., Katunin G.L., Kubanov A.A. Diagnostic immunoarray assay for characterization of immunoglobulin igg and igm level in syphilis patients serum towards 12 recombinant antigens of *t. pallidum* before and after the therapy. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64(9): 546-552. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-9-546-552>

Information about authors:

Runina A.V., <http://orcid.org/0000-0003-3177-2823>

Shpilevaya M.V., <https://orcid.org/0000-0002-9957-4009>

Filippova M.A., <https://orcid.org/0000-0002-9454-5938>

Katunin G.L., <https://orcid.org/0000-0003-0599-6305>

Kubanov A.A., <https://orcid.org/0000-0002-7625-0503>

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The work was supported by Grant of Russian Science Foundation (№ 17-75-20039).

Received 25.06.2019
Accepted 25.07.2019

Введение. Сифилис - венерическое инфекционное заболевание, возбудителем которого является бледная трепонема (*Treponema pallidum*, ssp. *pallidum*), имеет характерную периодизацию в течении. Наряду с другими инфекциями, передаваемыми половым путём, сифилис относится к группе социально значимых и представляющих опасность для здоровья окружающих заболеваний¹. Согласно Приказу Минздрава Российской Федерации № 87 от 26.03.2001 г.², для серологической диагностики сифилиса в России применяются два вида тестов: нетрепонемные – реакция микропреципитации (РМП) или её аналоги, такие как RPR-тест быстрых плазменных реагинов, и трепонемные – иммуноферментный анализ (ИФА), реакция пассивной гемагглютинации (РПГА), реакция иммунофлюоресценции (РИФ) в модификациях РИФ_{абс} и РИФ₂₀₀, реакция иммобилизации бледных трепонем (РИБТ). Выбор сочетания серологических тестов в каждом случае определяется целью проводимого исследования. Регламентированными серологическими реакциями для контроля эффективности лечения больных сифилисом являются нетрепонемные тесты (РМП, RPR)³. Негативация нетрепонемных тестов или четырёхкратное снижение титров антител, определяемых в данных серологических реакциях в течение года после окончания специфической терапии по поводу ранних форм сифилиса, подтверждает её эффективность, стойкое сохранение положительных результатов без тенденции к снижению титров антител служит основанием для диагностики серологической резистентности. Негативация трепонемных тестов (ИФА, РПГА, РИФ) наблюдается исключительно редко.

В последние годы сформулирована и обоснована концепция определения активности инфекционного процесса по наличию специфических противотрепонемных антител, в частности IgM [1]. Снижение уровня, затем исчезновение противотрепонемных IgM-антител после лечения является показателем его эффективности. В большинстве случаев после лечения раннего приобретённого сифилиса специфические IgM-антитела исчезают в течение 3-12 мес, после лечения позднего сифилиса – в течение 12-24 мес [2-7]. Ряд исследователей акцентировали внимание на значимости выявления в

крови IgM как маркёров присутствия в организме активного возбудителя заболевания в случаях реинфекции или неудач в проведении антибактериальной терапии [2, 9-11]. Противотрепонемные IgG антитела, в отличие от IgM, сохраняются в сыворотке больных многие годы, несмотря на снижение титров после адекватного лечения, при этом скорость снижения пропорциональна длительности клинических симптомов: чем короче продолжительность заболевания, тем более транзиторны IgG [1]. Определение уровня противотрепонемных IgG для контроля за терапией показывает, как правило, противоречивые результаты [12] и их обнаружение в сыворотке больных спустя многие годы не является свидетельством неэффективности лечения [3,13,14].

Технология иммуночипа даёт возможность единовременно диагностировать трепонема-специфические антитела разных классов (IgG, IgM) к панели рекомбинантных антигенов *T. pallidum* в реакции непрямой иммунофлюоресценции (нРИФ) [15]. Иммуночип с панелью из 12 антигенов *T. pallidum*, применён для исследования парных образцов сыворотки от больных сифилисом до и после проведённого лечения.

Цель исследования - использование иммуночипа для изучения динамики профиля иммуноглобулинов у больных сифилисом в процессе клинко-серологического контроля и оценка прогностической значимости полученных результатов.

Материал и методы. Уровень антител классов IgG и IgM исследовали в сыворотке крови больных сифилисом до начала терапии и в период клинко-серологического контроля после её окончания. В исследование включены образцы сыворотки крови больных первичным ($n=2$), вторичным ($n=5$), ранним скрытым ($n=14$), поздним скрытым ($n=9$) сифилисом. Специфическое лечение больных сифилисом проводилось в клинко-диагностическом отделении ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава РФ в соответствии с Федеральными клиническими рекомендациями по ведению больных сифилисом. Эффективность лечения оценивалась лечащим врачом на основании полноценности проведённого специфического лечения сифилиса, отсутствия клинических симптомов заболевания и результатов нетрепонемного (RPR) и трепонемных (ИФА, РПГА) серологических тестов. Сыворотки данных больных исследованы методом нРИФ на иммуночипе с 12 диагностическими антигенами *T. pallidum*, полученные результаты сравнивались с данными стандартных серологических тестов.

нРИФ проводилась на разработанной панели диагностических антигенов *T. pallidum*, которая включала: 1) коммерческие антигены Trp15, Trp17, Trp47, TmpA (ИМ-

¹Приказ Минздрава РФ от 26.03.2001 № 87 «О совершенствовании серологической диагностики сифилиса».

²Приказ Минздрава РФ от 26.03.2001 № 87 «О совершенствовании серологической диагностики сифилиса».

³Федеральные клинические рекомендации. Дерматовенерология; 2015. Болезни кожи. Инфекции, передаваемые половым путём. 5-е изд., перераб. и доп. М.: Деловой экспресс; 2016: 679-720.

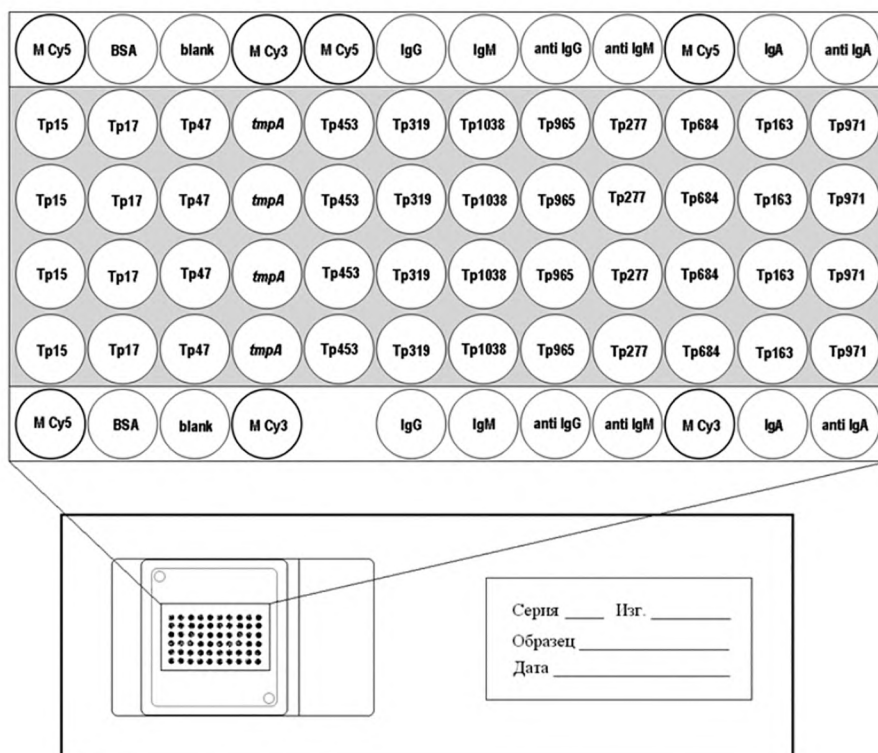


Рис. 1. Схема иммуночипа с панелью из 12 антигенов *T. pallidum*. Сверху — схема расположения антигенов *T. pallidum* и контрольных образцов; снизу — общий вид иммуночипа.

ТЕК, Россия), применяемые в стандартных тестах; 2) клонированные *de novo* рекомбинантные белки Trp0453, Trp0319, Trp1038, Trp0965, Trp0277, Trp0684; 3) коммерческие рекомбинантные белки Trp0163, Trp0971 (*Cusabio*, Китай). Дополнительные антигены отобраны на основе биоинформатического анализа протеома *T. pallidum* [16]. Созданный с их использованием иммуночип состоит из стеклянной подложки и нанесённых на неё полусферических гидрогелевых элементов с рекомбинантными антигенами (по 4 повтора каждый). Область печати для анализа накрывали пластиковой реакционной камерой. Печать иммуночипа проводили с использованием технологии сополимеризационной иммобилизации на базе Института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН. Схема печати иммуночипа и его общий вид приведены на рис. 1.

При проведении исследований на иммуночипе образцы сыворотки крови разводили 1:10 в 1-кратном фосфатно-солевом буфере (1x PBS) с 0,05% Tween-20 и вносили в реакционную камеру. После инкубации в течение 12 ч при 37° С с иммуночипов удаляли реакционную камеру, ополаскивали деионизированной водой, промывали 1x PBS с 0,05% Tween 20 в течение 30 мин на ротационном шейкере при 200 об/мин, вновь ополаскивали деионизированной водой и высушивали в потоке воздуха. Для выявления IgG и IgM, специфически взаимодействующих с антигенами *T. pallidum*, на иммуночип наносили раствор конъюгата антител козы к IgG человека с флуоресцентным красителем Cy5 (*KPL*, США) в разведении 1:2000 в 1x PBS, конъюгата к IgM человека с флуоресцентным красителем Cy3 (*KPL*, США) в таком

же разведении. После повторной инкубации в течение 1 ч при 37° С иммуночипы промывали деионизированной водой и высушивали в потоке воздуха. Визуализацию результатов исследования проводили на аппаратно-программном комплексе для анализа биочипов (ООО «Биочип ИМБ», Россия), регистрирующего интенсивность флуоресцентного сигнала флуорохромов Cy5 и Cy3. Интенсивность флуоресценции рассчитывали как средний сигнал от 4 повторных ячеек с одним антигеном. Пороговый уровень флуоресценции ($FL_{\text{порог}}$) для каждого антигена *T. pallidum* определяли среднее значение образцов сыворотки крови здоровых доноров с поправкой $+3\sigma$ (квадратическое отклонение для данной выборки). Положительными считались значения, превышающие $FL_{\text{порог}}$ более чем на 10%; отрицательными — составляющие менее 90% от $FL_{\text{порог}}$ значения $\pm 10\%$ от $FL_{\text{порог}}$ расценивались как сомнительные («серая зона» диагностического исследования).

Статистическую обработку результатов выполняли с помощью программного пакета *Statistica 13.0*. Для попарного сравнения эффективности теста нРИФ со стандартными тестами применяли критерий Мак-Немара (*McNemar*). Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. По результатам серологических тестов в течение года лечения одного из пациентов с первичным сифилисом, всех пациентов с вторичным сифилисом, 8 из 9 пациентов с ранним скрытым сифилисом оценено как эффективное, и сопровождалось негативацией или снижением титра нетрепонемного теста (*RPR*), преимущественным снижением уровня специфических антител в реакциях ИФА и разнонаправленными изменениями в тесте РПГА. Негативация результата нетрепонемного теста отмечена у одного из 9 пациентов с поздним скрытым сифилисом (№ 30). 5 случаев раннего скрытого сифилиса (образцы № 17-21) характеризовались сохранением позитивности и уровня титра антител как в нетрепонемном, так и в трепонемных тестах, что явилось основанием установления серологической резистентности.

Образцы сыворотки этих же пациентов, взятые до лечения и через 12 мес исследованы на содержание антител классов IgG и IgM к 12 антигенам *T. pallidum*. Обобщённые результаты стандартных тестов, нРИФ на иммуночипе парных образцов сыворотки пациентов с различными формами сифилиса, полученные до лечения и в процессе клинко-серологического контроля, приведены в табл. 1.

Флуоресцентные изображения и соответствующие им значения флуоресценции при детекции эмиссии флуорофоров Cy5 (определение IgG) и Cy3 (определение IgM) сыворотки крови пациента с вторичным сифилисом представлены на рис. 2. В приведённом примере (пациент №

Таблица 1

Результаты регламентированных лабораторных тестов сыворотки крови больных сифилисом, использованных для исследования уровня антител IgG и IgM к 12 рекомбинантным антигенам *T. pallidum* на иммуночипе.

Код образца	Период, месяцы	ИФА	РПГА	RPR	IgG		IgM	
					Положительных реакций из 12	Динамика изменений	Положительных реакций из 12	Динамика изменений
Первичный сифилис								
1	0	2,83	1+ 1:80	отр	1		4	
	12	1,81	2+ 1:80	отр	3	+2	1	-3
2	0	4,64	2+ 1:160	2+ 1:2	5		2	
	12	1,4	2+ 1:160	отр	5	0	0	-2
Вторичный сифилис								
3	0	12,72	4+ 1:640	4+ 1:8	8		2	
	12	7,63	4+ 1:640	отр	7	-1	0	-2
4	0	12,56	4+ 1:1280	4+ 1:16	7		2	
	12	4,49	4+ 1:640	отр	2	-5	0	-2
5	0	11,61	4+ 1:2560	4+ 1:16	8		0	
	12	14,83	-	отр	7	-1	0	0
6	0	17,71	4+ 1:2560	4+ 1:64	8		0	
	12	10,64	4+ 1:2560	отр	6	-2	0	0
7	0	15,91	4+ 1:1280	4+ 1:16	5		0	
	12	5,43	3+ 1:320	отр	3	-2	0	0
Ранний скрытый сифилис								
8	0	10,22	4+ 1:1280	4+ 1:16	2		1	
	12	4,46	-	отр	2	0	0	-1
9	0	4,58	3+ 1:320	2+ 1:2	6		1	
	12	1,32	2+ 1:160	отр	5	-1	0	-1
10	0	15,14	-	4+ 1:16	5		3	
	12	1,82	2+ 1:160	отр	8	+3	0	-3
11	0	5,22	4+ 1:2560	4+ 1:16	9		0	
	12	6,28	-	отр	7	-2	0	0
12	0	6,81	2+ 1:80	2+ 1:2	5		1	
	12	3,03	3+ 1:320	отр	5	0	1	0
13	0	17,82	4+ 1:2560	4+ 1:16	7		0	
	12	10,35	4+ 1:1280	отр	5	-2	0	0
14	0	7,77	4+ 1:1280	2+ 1:2	2		6	
	12	9,35	4+ 1:640	2+ 1:2	0	-2	0	-6
15	0	15,08	4+ 1:2560	4+ 1:16	8		0	
	12	10,25	3+ 1:4	3+ 1:4	8	0	0	0
16	0	12,93	4+ 1:2560	4+ 1:64	8		0	
	12	10,28	4+ 1:2560	3+ 1:4	8	0	0	0
Образцы с серорезистентностью								
17	0	13,65	4+ 1:8	4+ 1:8	9		11	
	12	13,06	4+ 1:640	4+ 1:8	9	0	11	0
18	0	11,72	4+ 1:2560	4+ 1:32	9		4	
	12	15,16	4+ 1:2560	4+ 1:32	9	0	4	0
19	0	18,55	4+ 1:640	2+ 1:2	6		0	
	12	12,77	4+ 1:1280	2+ 1:2	6	0	0	0
20	0	16,08	4+ 1:2560	4+ 1:8	8		0	
	12	16,93	4+ 1:2560	3+ 1:4	7	-1	0	0
21	0	14,50	4+ 1:1280	2+ 1:2	7		0	
	12	14,58	4+ 1:640	3+ 1:4	7	0	0	0
Поздний скрытый сифилис								
22	0	6,19	2+ 1:160	отр	1		0	
	12	8,69	2+ 1:160	отр	0	-1	0	0
23	0	7,02	2+ 1:160	отр	0		9	
	12	7,91	2+ 1:160	отр	1	+1	0	-9
24	0	10,53	2+ 1:160	отр	1		6	
	12	10,45	3+ 1:320	отр	0	-1	0	-6
25	0	13,55	4+ 1:1280	отр	0		6	
	12	8,97	4+ 1:1280	отр	1	+1	0	-6
26	0	7,68	2+ 1:160	отр	0		1	
	12	5,63	3+ 1:320	отр	3	+3	3	+2
27	0	8,84	3+ 1:320	отр	2		0	
	12	4,12	4+ 1:640	отр	0	-2	0	0
28	0	12,00	3+ 1:320	отр	1		1	
	12	13,33	4+ 1:640	отр	2	+1	0	-1
29	0	1,79	2+ 1:80	отр	3		0	
	12	3,33	3+ 1:320	отр	0	-3	4	+4
30	0	12,15	3+ 1:320	2+ 1:2	0		0	
	12	7,67	3+ 1:320	отр	4	+4	0	0

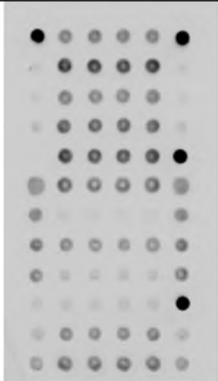
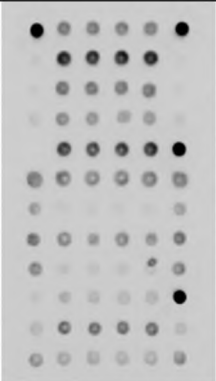
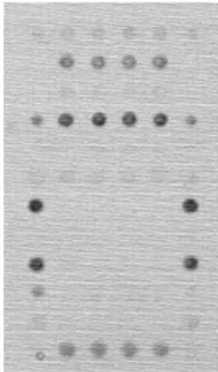
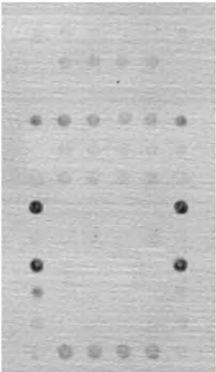
До лечения	Значения ФЛ (о.е.ф)	После лечения	Значения ФЛ (о.е.ф)
IgG			
	Trp15 1562 Trp17 3127 Trp47 1396 TmpA 2181 Trp0453 2755 Trp0319 1774 Trp1038 0 Trp0965 1077 Trp0277 225 Trp0684 168 Trp0163 1330 Trp0971 1794		Trp15 1668 Trp17 3955 Trp47 1835 TmpA 1077 Trp0453 3181 Trp0319 1504 Trp1038 37 Trp0965 1242 Trp0277 133 Trp0684 441 Trp0163 1995 Trp0971 589
IgM			
	Trp15 88 Trp17 233 Trp47 58 TmpA 407 Trp0453 61 Trp0319 77 Trp1038 0 Trp0965 26 Trp0277 21 Trp0684 43 Trp0163 14 Trp0971 248		Trp15 0 Trp17 32 Trp47 3 TmpA 72 Trp0453 0 Trp0319 26 Trp1038 0 Trp0965 0 Trp0277 0 Trp0684 0 Trp0163 0 Trp0971 114

Рис. 2. Результат исследования на иммуночипе с 12 антигенами *T. pallidum* сыворотки крови пациента с диагнозом вторичный сифилис до и через 12 мес после проведённого лечения. Жирным шрифтом выделены значения флуоресцентного сигнала, оцененные как «положительные».

3) при первичном обследовании и через 12 мес после проведённого лечения детектированы антитела классов IgG, IgM, взаимодействующие с рядом рекомбинантных антигенов *T. pallidum*. При исследовании иммуноглобулинов класса IgG в сыворотке крови данного пациента до начала лечения обнаружено специфическое взаимодействие с иммунодоминантными антигенами Trp15, Trp17, Trp47, TmpA, антигенами Trp0453, Trp0319, Trp0163, Trp0971. После эффективного лечения флуоресцентный сигнал в отношении антигена Trp0971 снижался от 1794 о.е.ф. до 589 о.е.ф., что в последнем случае оценивало результат реакции как «отрицательный». Количество определения диагностически значимого уровня иммуноглобулинов классов IgG к рекомбинантным антигенам *T. pallidum* в сыворотке крови данного пациента после терапии снизилось с 8 до 7. Исследование антител класса IgM до начала лечения обнаруживало положительные результаты реакции с антигенами TmpA, Trp0971. Через 12 мес (после проведённого лечения) диагностически значимого уровня антител класса IgM в сыворотке крови не обнаружено.

В группе первичного сифилиса у одного пациента после лечения выявлено повышение уровня IgG против антигенов Trp17, Trp0965. У всех пациентов детектировано понижение уровня IgM против Trp15, Trp17, TmpA, Trp0453, у одного - незначительное повышение уровня IgM к Trp0453 и Trp0277.

В группе вторичного сифилиса 4 пациента после лечения показали снижение уровня антител IgG к TmpA, 3 – против антигена Trp0277, 2 – против антигенов Trp47, Trp0319, Trp0971. Уровень IgG против антигенов Trp15, Trp17, Trp0453, Trp0163 при этом оставался конститутивно положительным. IgM антитела к большинству представленных антигенов *T. pallidum* у пациентов этой группы отсутствовали. Исключение - положительный уровень IgM у двух пациентов против Trp0971, у одного против Trp17, и у одного против TmpA, которые после лечения негативировались.

Группа пациентов с ранним скрытым сифилисом отличалась стабильно высоким уровнем IgG к антигенам Trp15, Trp17, Trp0453, и более чем половина группы, - к антигенам Trp0163, Trp47. Снижение количества прореагировавших антител данного класса отмечено для антигенов TmpA, Trp0971. Понижение титра антител класса IgM наблюдалось преимущественно в отношении антигенов Trp17, Trp0277, Trp0971, в единичных случаях – в отношении Trp47, Trp0453, Trp1038, Trp0684, Trp0163. У 5 пациен-

тов с установленной серорезистентностью конститутивно высоким оставалось количество положительных реакций IgG против антигенов Trp15, Trp17, Trp47, TmpA, Trp0453, Trp0163, у 4 из них положительными были реакции против антигенов Trp0319, Trp0277. После проведения терапии только в одном случае наблюдалась негативация IgG к антигену Trp0277. Титр антител класса IgM, положительный для 2-х пациентов и отрицательный для остальных, после терапии не изменился.

Для группы позднего скрытого сифилиса характерен общий низкий титр иммуноглобулинов класса IgG с единичными положительными реакциями отдельных антигенов. Исключением можно считать антиген Trp17, антитела против которого определены у всех пациентов (до и/или после лечения). Титр иммуноглобулинов класса IgM был низким практически во всех образцах сыворотки пациентов в данной группе.

Согласно полученным результатам, после окончания специфического лечения количество диагностически значимых противотрепонемных IgG в образцах сыворотки больных изменяется разнонаправленно – преимущественно уменьшается у больных ранними формами сифилиса и увеличивается у больных с поздней формой. Изменение количества антител класса IgM носит более определённый характер. В парных сыворотках у 2 пациентов с первичным сифилисом, 2 пациентов с вторич-

Таблица 2

Таблица сопряжённости для определения связи между тестами *RPR* и нРИФ(IgM)

<i>RPR</i>	нРИФ(IgM)		Сумма по строке
	нет	да	
нет	2 (A)	1 (B)	3
да	1 (C)	7 (D)	8
Всего	3	8	11

Таблица 3

Уровни статистической значимости попарных различий эффективности тестов нРИФ(IgG) и нРИФ(IgM) с регламентированными трепонемными и нетрепонемным тестом у больных с разными формами сифилиса в процессе клинико-серологического контроля

Группы сравнения	Количество больных в выборке	Уровень статистической значимости (p)
ИФА – нРИФ(IgG)	30	0,2673
РПГА – нРИФ(IgG)	24	0,1306
<i>RPR</i> – нРИФ(IgG)	22	0,1139
ИФА – нРИФ(IgM)	17	0,3711
РПГА – нРИФ(IgM)	14	0,0412
<i>RPR</i> – нРИФ(IgM)	11	1,0000

ным сифилисом (№ 3, 4) и 4 пациентов с ранним скрытым сифилисом (№ 8, 9, 10, 14) в нРИФ на иммуночипе отмечена негитивация титров антител данного класса. У двух пациентов с ранней скрытой формой сифилиса (№ 17, 18) через 12 мес после окончания специфической терапии в нРИФ на иммуночипе отмечено стойкое сохранение положительных реакций IgM при отсутствии динамики со стороны других серологических тестов.

У всех пациентов с поздней скрытой формой сифилиса через 12 мес после лечения клинические проявления заболевания отсутствуют. Методом нРИФ у 5 из них (№ 23-26, 28) до начала лечения определены антитела класса IgM. Через 12 мес после терапии у 4 из них отмечена негитивация титров антител данного класса, у одного - количество положительных реакций IgM антител возросло (№ 26). У пациента № 29 появление IgM антител констатируется после лечения и сопровождалось двукратным ростом серореактивности в ИФА и четырёхкратным в РПГА.

Проведено статистическое сравнение эффективности метода нРИФ и стандартных тестов при исследовании динамики серологических показателей в процессе лечения. Изменение (уменьшение или увеличение) количества прореагировавших в тесте нРИФ(IgG) или нРИФ(IgM) антител попарно сопоставляли с соответствующими изменениями титров антител в ИФА, РПГА, *RPR*. Исследование проводилось на группе больных из 30 человек. Для сравнения качественных признаков зависимость групп использовали критерий Мак-Немара. Данные для статистического анализа выражены в номинальной шкале: метод зафиксировал снижение титра антител после лечения (=да); метод не зафиксировал снижение уровня антител (=нет). Для проверки гипотезы о наличии связи между двумя видами серологических тестов использованы таблицы сопряжённости (табл. 2).

В качестве индикатора эффективности лечения выбрано количество снижения уровня антител, зафик-

сированное одним методом, но не зафиксированное другим, т. е. сравнивали ситуации «да-нет» и «нет-да». Нулевая гипотеза формулировалась следующим образом: показатели эффективности методов равны, т. е. $H_0: P(A)=P(D)$. Различия считали статистически значимыми при $p>0,05$.

Рассчитанное по таблице сопряжённости методом Мак-Немара значение вероятности $p=1,0000$ ($>0,05$), поэтому нулевая гипотеза не отвергается. На уровне значимости 0,05 можно считать, что эффективности характеризовать динамику терапии для методов *RPR* и нРИФ(IgM) очень близки. Вычисленные описанным выше способом значения вероятности (p) при попарном сравнении эффективности тестов нРИФ(IgG) и нРИФ(IgM) со стандартными трепонемными и нетрепонемным серологическими тестами у больных с различными формами сифилиса в процессе клинико-серологического контроля представлены в табл. 3.

Попарное сравнение эффективности методов нРИФ(IgG) с методами ИФА и РПГА с использованием критерия Мак-Немара не выявило между ними статистически значимых различий. Оценка методом нРИФ(IgG) парных сывороток, полученных от больных сифилисом до и после проведённого лечения, показала сходное со стандартными трепонемными тестами изменение регистрируемого профиля трепонема-специфических антител класса IgG.

При сравнении эффективности нРИФ(IgM) и *RPR* определён максимальный уровень значимости ($p=1,000$). Большая степень сходства двух тестов представляет особый интерес, поскольку определяемое в реакции *RPR* четырёхкратное снижение титров антител является подтверждением эффективности терапии. Высокий уровень антител к кардиолипину у больных сифилисом (особенно поздними формами) до лечения встречаются нечасто [17], что вызывает трудности в трактовке результатов при динамическом обследовании. В таких случаях снижение количества реагирующих IgM антител в тесте нРИФ может служить дополнительным, а иногда и единственным показателем результативности лечения. Уменьшение титра IgM антител в тесте нРИФ при отсутствии или низкой активности теста *RPR* до лечения отмечено у больных первичным сифилисом, у трёх больных поздним скрытым сифилисом (№ 23, 24, 28), у которых *RPR* тест не применялся. Лечение всех пациентов признано эффективным, и результат нРИФ(IgM) является дополнительным серологическим подтверждением данного факта. У пациента с поздней скрытой формой сифилиса № 26 увеличение количества положительных реакций IgM антител, у пациента № 29 появление IgM антител в период наблюдения после лечения может рассматриваться как неблагоприятный прогностический признак и может расцениваться как реактивация инфекции. Определение противотрепонемных IgM антител у пациентов с установлением серологической резистентности (№ 17, 18) при отсутствии динамики со стороны других серологических тестов может свидетельствовать о персистенции в организме бледных трепонем и служить показанием к проведению дополнительного специфического лечения [3, 4, 14].

При сравнении нРИФ(IgM) с РПГА значение вероятности $p=0,0412 < 0,05$, т. е., при определении серологических изменений в процессе терапии сифилиса данные методы обладают разной эффективностью. Полученный результат согласуется с информацией о незначительном снижении позитивности реакции РПГА у переболевших сифилисом даже спустя многие годы после полноценно-

го лечения, хотя имеются отдельные наблюдения по возможности негативации РПГА в динамике сероконтроля терапии сифилиса [18].

Статистический анализ констатировал сходную эффективность стандартных серологических тестов и метода нРИФ на иммуночипе с 12 диагностическими антигенами при оценке излеченности. Высокая степень соответствия результатов определяется общностью используемых в постановке серологических реакций антигенов бледной трепонемы - Trp15, Trp17, Trp47, TmpA. нРИФ позволяет охарактеризовать роль каждого из участвующих антигенов в динамике иммунного ответа в процессе лечения. Среди антигенов *T. pallidum*, индуцирующих негативацию иммунного ответа IgG антител при адекватном лечении ранних форм сифилиса, преобладают TmpA, Trp47, Trp971, в случае позднего скрытого сифилиса - Trp453, Trp971. Стимуляция выработки IgM антител к большинству антигенов, присутствующих на иммуночипе, в случае эффективной терапии в течение года прекращается. У пациентов с сохранившимися после полноценного лечения положительными серологическими реакциями поддерживается высокая активность антител обоих классов к большинству анализируемых рекомбинантных белков *T. pallidum*. Случаи предполагаемой реинфекции сопровождаются появлением IgM антител к Trp971 и Trp47.

Заключение. Серологические тесты остаются основными методами лабораторного подтверждения диагноза сифилиса, при этом использование данных методов для контроля эффективности лечения не всегда позволяет определить активность течения инфекции. Одновременное определение трепонема-специфических антител разных классов (IgG, IgM) к расширенной панели рекомбинантных антигенов *T. pallidum* методом нРИФ может расширить возможности стандартных серологических тестов для оценки эффективности проведенной антибактериальной терапии больных сифилисом, позволит определить тактику ведения пациентов с серологической резистентностью, серологическим рецидивом и реинфекцией.

В работу включена небольшая выборка сывороток крови больных сифилисом, поэтому более корректная оценка диагностической чувствительности и эффективности метода нРИФ и возможность его применения для определения трепонема-специфических антител разных классов (IgG, IgM) к расширенной панели рекомбинантных антигенов *T. pallidum*, нуждается в проведении дальнейших исследований.

Финансирование. Работа была выполнена при поддержке гранта РНФ № 17-75-20039.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп.3-14 см. REFERENCES)

1. Красносельских Т.В., Соколовский Е.В. Достижения и перспективы совершенствования серологической диагностики сифилиса и оценки излеченности *Современные проблемы дерматовенерологии, иммунологии и врачебной косметологии*. 2010; 4: 69-75.
2. Ляхов В.Ф., Борисенко К.К., Потекаев Н.С., Борисова Т.К., Сидорова Е.В. Динамика трепонемоспецифической иммуноглобулинемии при ранних формах сифилиса. *Вестник дерматологии и венерологии*. 1990; 8: 38-42.
15. Рунина А.В., Катунин Г.Л., Филиппова М.А., Затевалов А.М., Кубанов А.А., Дерябин Д.Г. Иммуночип для серологической диагностики сифилиса с использованием расширенной панели рекомбинантных антигенов *T. pallidum*. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2018; 165(6):726-73.

16. Хайруллин Р.Ф., Ротанов С.В., Фриго Н.В., Белоусова А.В. Биоинформатический анализ специфических антигенов *T. pallidum*. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2012; 5: 56-64.
17. Негашева Е.С., Ротанов С.В. Клинико-серологическое наблюдение пациентов, получивших лечение по поводу ранних форм сифилиса. *Клиническая дерматология и венерология*. 2015; 4: 42-9.
18. Дмитриев Г.А., Аковбян В.А., Тихонова Л.И. Эволюция лабораторной диагностики сифилиса. *Инфекции, передаваемые половым путем*. 2001; 6: 35-7.

REFERENCES

1. Krasnosel'skikh T.V., Sokolovskiy E.V. Achievements and prospects of syphilis serology diagnostics improvement and evaluation cure. *Sovremennye problemy dermatovenerologii, immunologii i vrachebnoy kosmetologii*. 2010; 4: 69-75. (in Russian)
2. Lyahov V.F., Borisenko K.K., Potekaev N.S., Borisova T.K., Sidorova E.V. Dynamics pallidum specific immunoglobulins in early syphilis. *Vestnik dermatologii i venerologii*. 1990; 8: 38-42. (in Russian)
3. Baker-Zander SA, Roddy RE, Handsfield HH, Lukehart SA. IgG and IgM antibody reactivity to antigens of *Treponema pallidum* after treatment of syphilis. *Sexually Transmitted Diseases*. 1986; 13(4):214-20.
4. O'Neill P, Nicol CS. IgM class antitreponemal antibody in treated and untreated syphilis. *British Journal of Venereal Diseases*. 1972; 48: 460-3.
5. Wilkinson AE, Rodin P. IgM-FTA test in syphilis in adults: its relation to clinical finding. *British Journal of Venereal Diseases*. 1976; 52: 219-23.
6. Merlin S., Andre J., Alacoque B., Paris-Hamelin A. Importance of specific IgM antibodies in 116 patients with various stages of syphilis. *Genitourinary Medicine*. 1985; 61 (2): 82-7.
7. Isinaga M., Sasaki E. Clinical survey of syphilis at the Dermatological Clinic of Nippon Medical School Hospital from 1984 to 1988, with special reference to the recent clinical manifestation and evaluation of IgM antibodies to *Treponema pallidum*. *The Journal of Dermatology*. 1990; 17: 618-29.
8. Muller F., Moskopidhis M. Evaluation of an enzyme immunoassay for IgM antibodies to *Treponema pallidum* in syphilis in man. *British Journal of Venereal Diseases*. 1984; 60: 288-92.
9. Egglestone S.I., Turner A.J.L. Serological diagnosis of syphilis. *Communicable disease and public health*. 2000; 3: 158-62.
10. Castro R., Prieto E.S., Santo I. et al. Evaluation of enzyme immunoassay technique for detection antibodies against *Treponema pallidum*. *Journal Clinical Microbiology*. 2003; 41: 250-3.
11. McMillan A., Young H. Qualitative and quantitative aspects of serologic diagnosis of syphilis. *International Journal of STD & AIDS*. 2008; 19: 620-4.
12. Bosshard P. P., Graf N., Knaute D. F. et al. Response of *Treponema pallidum* particle agglutination test titers to treatment of syphilis. *Clinical Infectious Diseases*. 2013; 56 (3): 463-4.
13. Baughn RE, Jorizzo JL, Adams CB, Musher DM. IgG class and IgG subclass responses to *Treponema pallidum* in patients with syphilis. *Journal of Clinical Immunology*. 1988; 8(2):128-39.
14. Moskopidhis M, Muller F. Molecular analysis of immuno-globulins M and G immune response to protein antigens of *Treponema pallidum* in human syphilis. *Infection and Immunity*. 1984; 43(1):127-32.
15. Runina A.V., Katunin G.L., Filippova M.A., Zatevalov A.M., Kubanov A.A., Deryabin D.G. Immuno-chip for serological diagnosis of syphilis using an extended panel of recombinant antigens *T. pallidum*. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2018; 165(6):726-73. (in Russian)
16. Hayrullin R.F., Rotanov S.V., Frigo N.V., Belousova A.V. Bioinformatic analysis of *T. pallidum* specific antigens. *Vestnik dermatologii i venerologii*. 2012; 5: 56-64. (in Russian)
17. Negasheva E.S., Rotanov S.V. Clinical and serological surveillance of patients treated for early syphilis forms. *Klinicheskaya dermatologiya i venerologiya*. 2015; 4: 42-9. (in Russian)
18. Dmitriev G.A., Akovbyan V.A., Tihonova L.I. Evolution of laboratory testing for syphilis. *Infektsii, peredavaemye polovym putem*. 2001; 6: 35-7. (in Russian)

Поступила 25.06.19

Принята к печати 25.07.19

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Рудаков Н. В.^{1,2}, Штрек С. В.^{1,2}, Блох А. И.^{1,2}, Пенъевская Н. А.^{1,2}, Щучинова Л. Д.³

ВОЗМОЖНОСТИ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ВЕРИФИКАЦИИ СИБИРСКОГО КЛЕЩЕВОГО ТИФА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К *RICKETTSIA CONORII*

¹ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора, 644080, г. Омск, Россия;

²ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 644099, Омск, Россия;

³Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Республике Алтай, 649002, Горно-Алтайск, Россия

Реальная эпидемическая значимость риккетсиозов группы клещевой пятнистой лихорадки (КПЛ), включая сибирский клещевой тиф (СКТ), в России недостаточно изучена. Одна из причин – фактическое отсутствие сертифицированных отечественных диагностических и доказательной базы использования зарубежных тест-наборов для лабораторной верификации этой группы клещевых трансмиссивных инфекций в условиях медицинской практики. Цель работы: изучение диагностической информативности применения тест-системы ИФА на основе антигенов *R. conorii* для серологической верификации СКТ.

По результатам обследования двух сопоставимых по полу и возрасту групп пациентов (34 больных с патогномичными признаками СКТ и 76 здоровых) проведен ROC-анализ и рассчитаны операционные характеристики (чувствительность, специфичность, точность, отношения правдоподобия положительного и отрицательного результатов) теста серологической верификации СКТ по выявлению IgM к риккетсиям в разные сроки от начала заболевания с применением тест-системы для выявления антител к *Rickettsia conorii*. Показано, что выявление IgM-антител к риккетсиям с помощью тест-системы «*Rickettsia conorii* ELISA IgM/IgG» (Vircell) позволяет осуществить верификацию заболевания на 10-14 день от начала появления клинических симптомов у 72% (56÷88%) больных СКТ.

Обоснованы рекомендации по интерпретации результатов ИФА при использовании тест-системы «*Rickettsia conorii* ELISA IgM/IgG» для серологической верификации СКТ, отличающиеся от рекомендаций производителя в отношении верификации средиземноморской лихорадки, вызываемой *R. conorii*: При индексе IgM-антител (ИАТ), превышающем 8,0, можно считать диагноз СКТ лабораторно подтвержденным. Если ИАТ меньше 5,0, необходимо повторное обследование больного через 10-14 дней. При ИАТ в пределах 5,0-8,0 следует повторно исследовать образец и/или обследовать пациента через 10-14 дней.

Использование тест-системы «*Rickettsia conorii* ELISA IgM/IgG» (Vircell) перспективно для лабораторной диагностики и сероэпидемиологического изучения клещевых риккетсиозов группы КПЛ на территории России.

Ключевые слова: риккетсии и риккетсиозы, группа клещевой пятнистой лихорадки, иммуноферментный анализ, лабораторная диагностика, *Rickettsia sibirica*, *Rickettsia conorii*.

Для цитирования: Рудаков Н. В., Штрек С. В., Блох А. И., Пенъевская Н. А., Щучинова Л. Д. Возможности серологической верификации сибирского клещевого тифа с использованием тест-системы для выявления антител к *Rickettsia conorii*. Клиническая лабораторная диагностика. 2019;64(9): 553-559. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-9-553-559>

Rudakov N. V.^{1,2}, Shtrek S. V.^{1,2}, Blokh A. I.^{1,2}, Penjevskaya N. A.^{1,2}, Shchuchinova L. D.³

POSSIBILITY OF SEROLOGICAL VERIFICATION OF SIBERIAN TICK TYPHUS WITH THE TEST SYSTEM FOR IDENTIFICATION OF *RICKETTSIA CONORII* ANTIBODIES

¹Omsk Research Institute of natural focal Infections, 644080, Omsk, Russia;

²Omsk State Medical University, 644050, Omsk, Russia;

³Office of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing in the Altai Republic, 649002, Gorno-Altai, Russia

The real epidemiological impact of Spotted Fever Group rickettsioses including Siberian tick-borne typhus (STT) in Russia is not sufficiently studied. One of the reasons is the actual absence of either certified domestic diagnostic kits or the evidence for using foreign test kits for laboratory verification of this group of tick-borne infections in medical practice. Objective of our study was to study the diagnostic accuracy of the ELISA test system based on *Rickettsia conorii* antigens for serological verification of STT.

The ROC analysis was performed and operational characteristics (sensitivity, specificity, accuracy, likelihood ratio of positive and negative results) of the STT serological verification test to identify IgM to rickettsia at different times from the onset of the disease using a test system to detect antibodies to *Rickettsia conorii* were calculated based on the results of a survey of two groups of patients comparable by gender and age (34 patients with pathognomonic signs of STT and 76 clinically healthy people). It was found that the detection of IgM antibodies to rickettsia using the *Rickettsia conorii* IgM/IgG ELISA test system (Vircell) allows the disease to be verified 10-14 days after the onset of clinical symptoms in 72% (56-88%) of STT patients.

We recommend the interpretation of results of the test system “*Rickettsia conorii* ELISA IgM/IgG” for serological verification of STT which differ from the manufacturer’s recommendations regarding verification of Mediterranean fever caused by *R. conorii* in the following way: the diagnosis of STT should be considered laboratory confirmed when the index of IgM antibodies (IAT) exceeds 8.0; if the IAT is less than 5.0 then a repeated examination of the patient after 10-14 days will be necessary; if the IAT is

in the range of 5.0-8.0 then the sample should be re-examined and / or the patient should be examined after 10-14 days. The use of the test system "Rickettsia conorii ELISA IgM / IgG" is promising for laboratory diagnosis and seroepidemiological studies of Spotted Fever Group rickettsioses in Russia.

Key words: *rickettsiae and rickettsioses; spotted fever group; laboratory diagnostics; enzyme-linked immunosorbent assay; Rickettsia sibirica; Rickettsia conorii.*

For citation: Rudakov N. V., Shtrek S. V., Blokh A. I., Penjevskaia N. A., Shchuchinova L. D. Possibilities of serological verification of siberian tick borne type with use of test system for identification of antibodies to *Rickettsia conorii*. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (9): 553-559 (in Russ.)

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-9-553-559>

For correspondence: Rudakov N. V., e-mail: rickettsia@mail.ru

Information about authors:

Rudakov N. V., <http://orcid.org/0000-0001-9566-9204>

Shtrek S. V., <http://orcid.org/0000-0002-4509-1212>

Penjevskaia N. A., <http://orcid.org/0000-0002-7220-4366>

Conflict of interests. *The authors declare the absence of conflict of interests.*

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 15.08.2019
Accepted 22.08.2019

За последние 20 лет в России наметился тренд на снижение регистрируемой заболеваемости сибирским клещевым тифом (СКТ, этиологический агент – *Rickettsia sibirica*), несмотря на высокий лоймопотенциал природных очагов в большинстве эндемичных регионов. В ряде субъектов РФ, начиная с 2013 г. регистрация заболеваемости СКТ полностью прекратилась [1]. На территории РФ и Казахстана, кроме *R. sibirica*, циркулирует не менее семи других видов риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки (КПЛ), в том числе *R. conorii subs. Caspii* – этиологический агент Астраханской пятнистой лихорадки (Астраханская область и смежные территории России и Казахстана) и *R. conorii subs. conorii* – этиологический агент средиземноморской лихорадки (Крым). Реальная эпидемическая значимость клещевых риккетсиозов (КР) группы КПЛ в России, включая СКТ, недостаточно изучена. Одна из причин – отсутствие сертифицированных отечественных диагностикумов и доказательной базы использования зарубежных тест-наборов для лабораторной верификации этой группы клещевых трансмиссивных инфекций в условиях медицинской практики [2, 3].

В лабораторной диагностике инфекционных заболеваний существенное место занимают серологический (иммуноферментный анализ – ИФА) и молекулярно-биологический (полимерная цепная реакция – ПЦР) методы [4,5]. Лабораторная диагностика КР включает определение ДНК риккетсий и антител (АТ) к ним [6]. Среди методов выявления АТ наибольшей чувствительностью обладает ИФА [7,8], не позволяющий, однако, дифференцировать вид риккетсий, вызвавший заболевание [9]. Указанное связано с наличием группоспецифических антигенов у представителей группы КПЛ, обуславливающих наличие перекрестных серологических реакций, в том числе при выявлении АТ к риккетсиям в ИФА [10]. Более точная этиологическая верификация КР возможна с применением молекулярно-биологического метода (ПЦР-секвенирование), который в ряде случаев по диагностической эффективности уступает ИФА [11,12]. Это связано с различным, в зависимости от вида материала (цельная кровь, лейкоцитарная фракция крови, биоцитат, смыв с первичного аффекта), и часто незначительным содержанием риккетсий в анализе; нарушением правил и поздними сроками забора материала; резким снижением

количества риккетсий в организме в результате приема химиотерапевтических препаратов и пр. [13, 14].

В РФ зарегистрирована тест-система ИФА для серологической диагностики КР, вызываемого *R. conorii*, «*Rickettsia conorii ELISA IgM/IgG*» (Viracell, Spain, рег. уд. № ФСЗ 2009/05430), успешно апробированная для изучения серопревалентности *R. conorii* и лабораторной диагностики средиземноморской лихорадки в различных регионах мира [15-18]. Имеются отдельные публикации о применении указанной тест-системы в очагах Астраханской пятнистой лихорадки [19] и сибирского клещевого тифа [14,20,21], которые не содержат анализа эффективности применения данной тест-системы для лабораторной диагностики СКТ.

Цель работы – изучение клинической (диагностической) информативности применения тест-системы ИФА на основе антигенов *R. conorii* для серологической верификации сибирского клещевого тифа.

Материал и методы. В наборе для ИФА «*Rickettsia conorii ELISA IgM/IgG*» используются антигены *R. conorii* (штамм Moroccan, ATCCVR-141). В инструкции по применению указано, что относительно тест-наборов, выявляющих АТ к *R. conorii* методом непрямой иммунофлюоресценции, чувствительность ИФА для обнаружения IgM составляет 94%, специфичность – 95%, для IgG – 85% и 100% соответственно. Учитывая межвидовые антигенные различия, логично предположить, что эффективность применения данной тест-системы для серодиагностики других риккетсиозов может быть иной.

Проведено сопоставление результатов ИФА, полученных при исследовании сывороток крови двух групп пациентов. Первая группа состояла из 34 больных с патогномичными признаками СКТ, находившихся на лечении в инфекционных отделениях ЛПУ Республики Алтай в эпидемический сезон с марта по сентябрь 2017 г. По степени эпидемической опасности этот регион относится к территориям с очень высоким уровнем заболеваемости СКТ (82,7 на 100 тыс. населения). Кроме *R. sibirica*, классического возбудителя СКТ, в природных очагах в Республике Алтай циркулируют и другие виды риккетсий: *R. heilongjiangensis*, *R. raoultii* [22]. Клещевой риккетсиоз, этиологическим агентом которого является *R. heilongjiangensis*, имеет схожую симптоматику с рик-

кетсиозом, обусловленным *R. sibirica*, поэтому данное заболевание в официальной статистике регистрируется как СКТ [23]. Для клинической картины заболевания СКТ в Республике Алтай характерны острое начало с синдромом интоксикации, макуло-папулёзная сыпь, наличие первичного аффекта (80,3%), преимущественно среднетяжёлое течение болезни. Основной контингент заболевших составляют дети в возрасте 3-14 лет [24]. Риккетсиоз, вызываемый *R. raoultii*, отличается от «классического» СКТ тем, что генерализация процесса, клинические проявления и выработка АТ могут быть менее выражены [13,25].

В обследуемой группе больных СКТ по возрастному составу преобладали дети в возрасте от 1 до 12 лет – 29 человек (15 девочек, 14 мальчиков). Всем больным поставлен диагноз СКТ на основании типичной клинической картины (лихорадка, наличие первичного аффекта, сыпь) и эпидемиологических данных (пребывание в природном очаге, присасывание или напозание клеща). Инкубационный период длился от 1 до 13 дней (в среднем 5-6 дней). Средняя максимальная температура: $38,9 \pm 0,6^\circ \text{C}$. Наличие первичного аффекта отмечено у 16, кожной сыпи – у 30 больных. Срок появления сыпи варьировал от 1 до 13 дня болезни.

У 30 больных исследованы пробы сывороток крови, взятые на 2-5-й день после появления клинических симптомов заболевания (1-я сыворотка). У 25 больных исследованы пробы крови, взятые на 10-14-й день после начала заболевания (2-я сыворотка).

Вторая (контрольная) группа состояла из 76 клинически здоровых жителей г. Омска, обследованных вне эпидемического сезона КР. Обе группы сопоставимы по возрастному и половому составу.

Постановку и валидацию ИФА для выявления специфических антител классов IgM и IgG осуществляли согласно инструкции производителя тест-системы. Для учёта результатов ИФА рассчитывали индекс АТ (ИАТ) по рекомендуемой в инструкции формуле: [оптическая плотность (ОП) образца / ОП контроля cut off] $\times 10$.

Диагностическую информативность (ценность) теста оценивали по следующим критериям: диагностическая чувствительность (Se), диагностическая специфичность (Sp), диагностическая эффективность – точность (assiguasu – Acc), отношение правдоподобия положительного результата тест (positive likelihood ratio – LR+) и отношение правдоподобия отрицательного результата (negative likelihood ratio – LR-). Расчёты проведены по ГОСТ Р 53022.3-2008 с использованием пакета прикладных программ Excel 2010, Statistica 6.0 и открытых интернет-ресурсов.

Для описания полученных данных применены стандартные приёмы непараметрической статистики по схеме Me (Q1; Q3), где Me – медиана вариационного ряда,

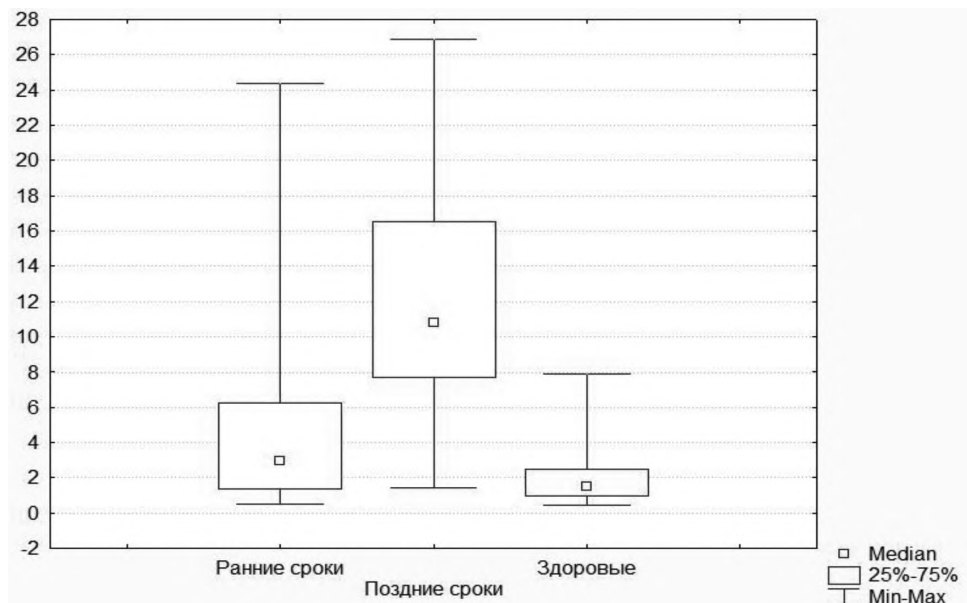


Рис. 1. Распределение значений ИАТ IgM в сыворотках крови здоровых пациентов и больных СКТ на 2-5 день (ранние сроки) и 10-14 день (поздние сроки) от начала заболевания.

Q1 и Q3 – нижний и верхний квартили вариационного ряда соответственно. Для установления референтного предела значений ИАТ у клинически здоровых лиц определяли 97,5%-й и 95%-й уровни (процентили) вариационного ряда¹. Доверительные интервалы (ДИ₉₅) рассчитывали по методу Вальда.

С целью выбора точки разделения положительных и отрицательных результатов (порога клинического решения), а также для сравнительной оценки информативности выявления IgM и IgG в 1-й и 2-й сыворотках для серодиагностики СКТ проведён ROC²-анализ с использованием программы easyRoc (<http://www.biosoft-hacettepe.edu.tr/easyROC/>) [26].

Результаты и обсуждение. Характеристика распределения всех значений ИАТ IgM и IgG в сравниваемых группах проиллюстрирована диаграммами размаха – box-and-whiskers diagram (рис. 1 и 2). Медианное значение ИАТ IgM в 1-й сыворотке, полученной от больных СКТ, составило 2,9 (1,4; 6,2), во второй сыворотке – 10,8 (7,7; 16,5), в сыворотке здоровых – 1,5 (1,0; 2,5). Референтные пределы значений ИАТ IgM у здоровых лиц: 97,5%-уровень (процентиль) – 6,3; 95%-уровень (процентиль) – 5,5.

Медианное значение ИАТ IgG в 1-й сыворотке, полученной от больных СКТ, составило 1,8 (1,2; 5,6), во второй сыворотке – 3,0 (1,9; 3,9), в сыворотке здоровых – 1,2 (1,0; 1,5). Референтные пределы значений ИАТ IgG у здоровых лиц: 97,5%-уровень (процентиль) – 5,5; 95%-уровень (процентиль) – 4,0.

Результаты оценки диагностической значимости показателя ИАТ-IgM и ИАТ-IgG в первой и второй сыво-

¹ГОСТ Р 53022.3-2008 «Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3» от 18 декабря 2008 № 557-ст.

²Receiver operator characteristic – ROC.

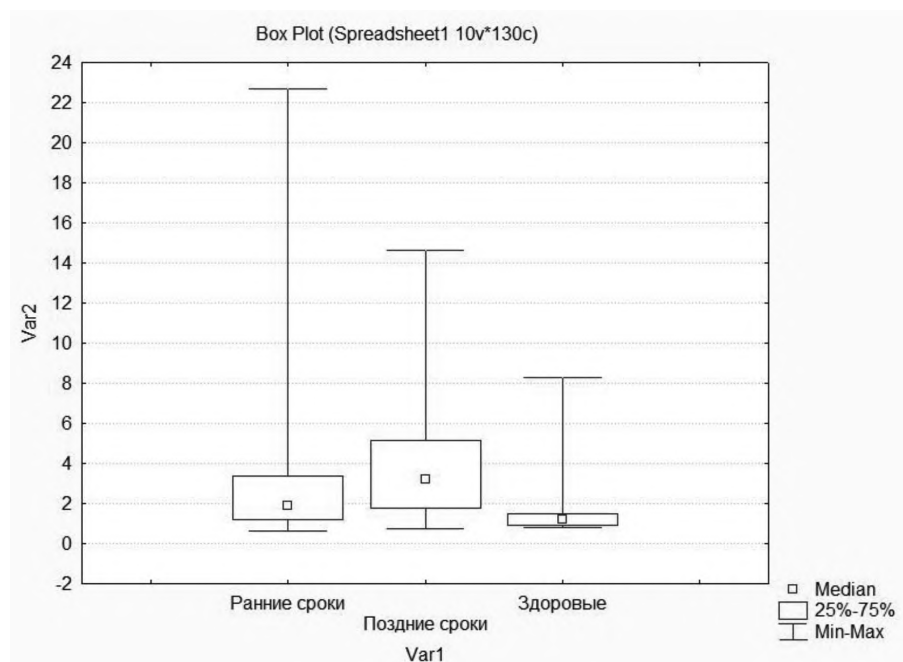


Рис. 2. Распределение значений ИАТ IgG в сыворотках крови здоровых пациентов и больных СКТ на 2-5 день (ранние сроки) и 10-14 день (поздние сроки) от начала заболевания.

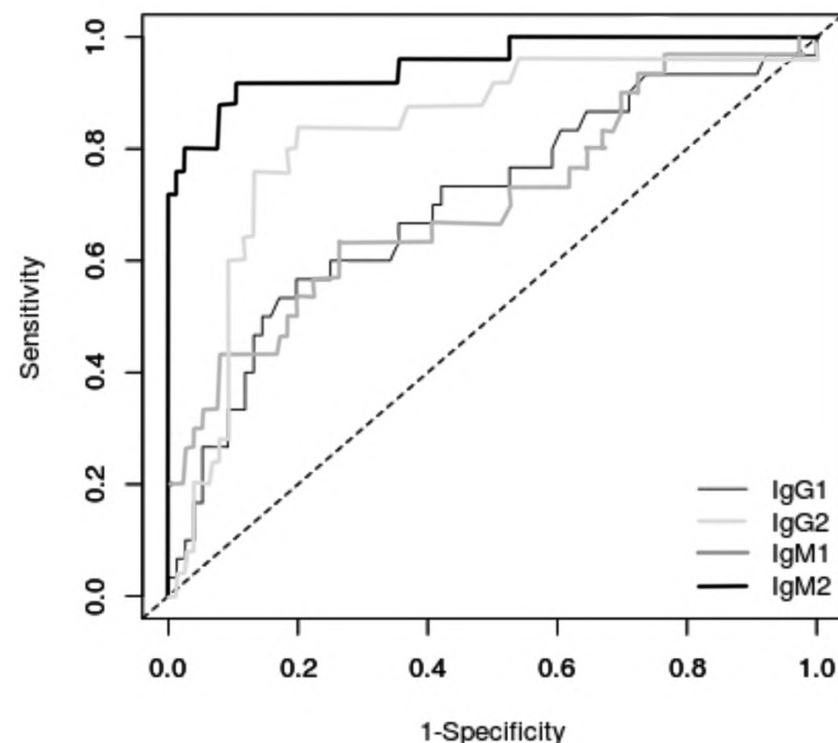


Рис. 3. Соотношение между чувствительностью (Se) и специфичностью (Sp) серологической верификации СКТ по обнаружению IgM и IgG к риккетсиям с применением тест-системы «Rickettsia conorii ELISA IgM/IgG» (Viracell).

ротке (тесты IgM1, IgM2, IgG1, IgG2) для серологической верификации СКТ представлены на рис. 3 в виде характеристических кривых (ROC-curve, ROC-C), отражающих соотношение между чувствительностью (Se) и специфичностью (Sp) каждого теста.

По оси ординат обозначена частота истинно положительных результатов (Sensitivity - чувствительность), по оси абсцисс - частота ложноположительных результатов (1 минус Specificity - специфичность) по всему диапазону показателей ИАТ (точек разделения). Значения по осям соответствуют вероятностям от 0 до 1 (т.е. от 0 до 100%). Диагональ отражает соотношение частот истинно и ложноположительных результатов для абсолютно неинформативного теста, когда выбор между диагнозами делают путём подбрасывания монеты [27]. Общая точность тестов представлена в виде площади под ROC-кривой (AU-ROC-C - Area Under Receiver Operator Characteristic Curve): чем больше площадь (чем ближе её значение к 1), тем точнее тест.

Площадь под ROC-кривой (рис. 3) для индекса IgM в первой сыворотке составила 0,70 (95% ДИ 0,58÷0,82; $p<0,001$); для индекса IgM во второй сыворотке составила 0,95 (95% ДИ 0,90÷1,00; $p<0,001$); для индекса IgG в первой сыворотке 0,70 (95% ДИ 0,59÷0,82; $p<0,001$); для индекса IgG во второй сыворотке составила 0,82 (95% ДИ 0,73÷0,93; $p<0,001$).

IgM.1 - результаты обнаружения антирикеттсioзных IgM в 1-й сыворотке,

IgM.2 - во 2-й сыворотке; IgG.1 - результаты обнаружения антирикеттсioзных IgG в 1-й сыворотке, IgG.2 - во 2-й сыворотке.

Наиболее информативно определение индекса AT IgM во второй сыворотке, наименее - индекса AT IgG в первой сыворотке.

Учитывая наибольшую диагностическую информативность определения ИАТ IgM во 2-й сыворотке (через 10-14 дней от начала заболевания), необходимость усложнения процесса использования данного варианта ИФА для определения сероконверсии специфических IgG в парных сыворотках, представляется целесообразным основное внимание уделить оценке операционных характеристик ИФА для серологической верификации СКТ по выявлению противориккеттсioзных IgM как коррелятов острого инфекционного процесса.

С целью определения порога клинического решения, то есть величины ИАТ, которое позволяет с достаточной долей вероятности верифицировать заболевание СКТ, рассчитаны показатели диагностической информативности (Se, Sp, LR+, LR-, Acc) для различных индексов антител IgM сыворотках крови, взятых на 2-5-й и 10-14-й дни от начала заболевания (табл. 1).

Таблица 1

Операционные характеристики серологической верификации СКТ по выявлению IgM к риккетсиям в разные сроки от начала заболевания с применением тест-системы «Rickettsia conorii ELISA IgM/IgG»

Специфичность (Sp), % (ДИ ₉₅)	Точка разделения (+) и (-) результатов*	Индикация специфических IgM в сыворотке крови на 2-5-й день заболевания (тест IgM.1)				Индикация специфических IgM в сыворотке крови на 10-14-й день заболевания (тест IgM.2)			
		Чувствительность (Se), % (ДИ ₉₅)	LR+	LR-	Асс, %	Чувствительность (Se), % (ДИ ₉₅)	LR+	LR-	Асс, %
75 (65 ÷ 85)	2,5	56 (39 ÷ 74)	2,27	0,58	65,8	92 (82 ÷ 100)	3,68	0,11	83,5
82 (73 ÷ 90)	3,0	47 (29 ÷ 64)	2,53	0,65	64,1	92 (82 ÷ 100)	4,99	0,10	86,8
90 (83 ÷ 96)	3,5	43 (26 ÷ 61)	4,11	0,63	66,4	88 (76 ÷ 100)	8,36	0,13	88,7
92 (86 ÷ 98)	4,1	40 (22 ÷ 57)	5,07	0,65	66,1	84 (71 ÷ 97)	10,65	0,17	88,1
93 (88 ÷ 99)	5,4	33 (16 ÷ 50)	5,07	0,71	63,4	80 (66 ÷ 94)	12,16	0,21	86,7
95 (90 ÷ 100)	6,0	30 (14 ÷ 46)	5,70	0,74	62,4	80 (66 ÷ 94)	15,21	0,21	87,4
97 (94 ÷ 100)	6,3	27 (11 ÷ 42)	6,75	0,76	61,4	80 (66 ÷ 94)	30,40	0,21	88,7
97 (94 ÷ 100)	7,0	20 (6 ÷ 34)	7,60	0,82	58,7	76 (61 ÷ 91)	28,90	0,25	86,7
99 (96 ÷ 100)	7,9	20 (6 ÷ 34)	15,15	0,81	59,3	72 (56 ÷ 88)	54,55	0,28	85,3
100	9,0	20 (6 ÷ 34)	∞	0,80	59,0	70 (54 ÷ 86)	∞	0,30	85,0
100	10,5	20 (6 ÷ 34)	∞	0,80	60,0	60 (42 ÷ 78)	∞	0,40	80,0
100	Более 11	Менее 20 (6 ÷ 34)	∞	Более 0,80	Менее 60,0	Менее 48 (30 ÷ 66)	∞	Более 0,52	Менее 74,0

Примечание. * - точка разделения (+) и (-) результатов – это порог клинического решения, то есть величина ИАТ, которое позволяет верифицировать заболевание СКТ; чувствительность – доля лиц с положительным результатом теста в группе больных; специфичность – доля лиц с отрицательным результатом теста в группе здоровых; отношение правдоподобия – отношение вероятности данного результата у больных к вероятности того же результата у здоровых (LR показывает, во сколько раз выше (или ниже) вероятность получить данный результат теста у больных, нежели у здоровых); точность (Асс - эффективность) – доля правильных результатов теста в общем количестве результатов, как положительных, так и отрицательных.

Специфичность и чувствительность теста находятся в обратной зависимости по отношению друг к другу: при увеличении специфичности снижается чувствительность, и наоборот. Выбор точки отсечения (разделения) зависит от цели исследования. Если поставлена задача полностью исключить вероятность ошибочного лабораторного подтверждения диагноза (специфичность = 100%), то точкой разделения будет значение ИАТ, равное 9,0. При этом чувствительность теста IgM.1 составит 20% (ДИ₉₅ 6÷34%), а теста IgM.2 – 70% (ДИ₉₅ 54÷86%), то есть при исследовании крови на 2-5-й день появления клинических симптомов в среднем только у 20% (ДИ₉₅ 6÷34%) пациентов можно верифицировать заболевание как СКТ, тогда как при исследовании крови на 10-14 день - у 70% (ДИ₉₅ 54÷86%) пациентов. При этом диагностическая точность верификации СКТ (доля правильных результатов теста в общем количестве результатов, как положительных, так и отрицательных) для теста IgM.1 составляет 59%, для теста IgM.2 – 85%.

Если в качестве точки разделения принять значение ИАТ, равное 97,5-перцентильному пределу для здоровых лиц (6,3), то специфичность обоих тестов составит 97% (ДИ₉₅ 94÷100%), чувствительность для IgM.1 – 27% (ДИ₉₅ 11÷42%), для IgM.2 – 80% (ДИ₉₅ 66÷94%), точность – 61,4% и 88,7% соответственно. При этом вероятность правильной верификации заболевания у больных СКТ по 1-й сыворотке (2-5-й день заболевания), в 6,75 раз выше, а по 2-й сыворотке (10-14-й день заболевания) – в 30,4 раза выше, чем вероятность ошибочного лабораторного подтверждения диагноза.

Если считать допустимой 95%-ю специфичность, то точкой разделения будет значение ИАТ, равное 6,0;

чувствительность для IgM.1 – 30% (ДИ₉₅ 14÷46%), для IgM.2 – 80% (ДИ₉₅ 66÷94%), точность – 62,4% и 87,4% соответственно, вероятность правильной верификации заболевания у больных СКТ по 1-й сыворотке (2-5-й день заболевания), в 5,7 раз выше, по 2-й сыворотке (10-14-й день заболевания) – в 15,2 раза выше, чем вероятность ошибочного лабораторного подтверждения диагноза.

Сложно определить компромисс между чувствительностью и специфичностью, которые классифицируют результаты теста упрощённо (грубо) – либо норма, либо патология. Правильный диагноз заболевания более вероятен при крайнем отклонении результата теста от нормы, чем в случае результата, близкого к границе нормы. Отношение вероятности конкретного результата у лиц с заболеванием к вероятности этого же результата у лиц без заболевания позволяет оценивать показатель LR (отношение правдоподобия). Согласно ГОСТ Р 53022.3-2008, значения LR+>10 служит основой для окончательного диагностического решения. Значение LR+ от 5 до 10 даёт умеренные основания для диагностического решения. LR+ от 2 до 5 мало даёт для изменения оценки вероятности болезни у пациента.

Можно считать заболевание СКТ серологически подтверждённым при значении ИАТ IgM, превышающем 8 (LR+ для сыворотки крови, взятой на 2-5 день от начала заболевания, превышает 15; для сыворотки крови, взятой на 10-14 день от начала заболевания, превышает 54,5). Интервал значений ИАТ IgM от 5 до 8 можно отнести к «сомнительным» результатам, что означает необходимость их повторного тестирования и/или получения нового образца крови, взятой в более поздние сроки. Значение ИАТ IgM ниже 5 не позволяет серологически

Интерпретация результатов ИФА с применением тест-системы «*Rickettsia conorii* ELISA IgM/IgG» (Vircell)
для серологической верификации СКТ

Интерпретация результата ИФА	ИАТ IgM		Клиническое решение
	<i>R. conorii</i>	<i>R. sibirica</i>	
Отрицательный	<9	<5	Необходимо повторное обследование пациента через 10-14 дней
Сомнительный	9-11	5-8	Необходимо повторное тестирование образца и/или обследование пациента через 10-14 дней
Положительный	>11	>8	Диагноз подтвержден

верифицировать заболевание СКТ и требует повторного обследования больного через 10-14 дней.

При использовании теста IgG не удалось дополнительно верифицировать заболевание СКТ у пациентов с отрицательными результатами выявления IgM. В целом наличие антириккетсиозных IgG-АТ установлено (по критериям производителя) только в 4-х пробах сывороток крови. Возможно тест IgG более информативен при обследовании пациентов в более поздние сроки заболевания, чем в нашем наблюдении. В практическом здравоохранении получение реконвалесцентных сывороток затруднено в связи с ограниченной длительностью пребывания больных на стационарном лечении.

Нами обоснованы рекомендации по интерпретации результатов ИФА при использовании тест-системы «*Rickettsia conorii* ELISA IgM/IgG» для серологической верификации сибирского клещевого тифа, отличающиеся от рекомендаций производителя в отношении верификации средиземноморской лихорадки, вызываемой *R. conorii* (табл. 2). Указанный подход позволяет проводить серологическую верификацию СКТ (вызываемого *R. sibirica*) с помощью тест-системы, отработанной для выявления антител к *R. conorii*.

Выявление IgM к риккетсиям с помощью тест-системы «*Rickettsia conorii* ELISA IgM/IgG» (Vircell) позволяет осуществить верификацию заболевания на 10-14 день от начала появления клинических симптомов у 72% (56÷88%) пациентов с диагнозом СКТ, поставленным на основании клинико-эпидемиологических данных. Исследование крови в более поздние сроки вероятно могло бы повысить эффективность лабораторного подтверждения диагноза.

Использование тест-системы «*Rickettsia conorii* ELISA IgM/IgG» (Vircell) перспективно для лабораторной диагностики и сероэпидемиологического изучения клещевых риккетсиозов группы КПЛ на территории России.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 9, 15-18, 26 см. REFERENCES)

1. Рудаков Н.В., Шпынов С.Н., Транквиловский Д.В., Пакскина Н.Д., Савельев Д.А., Самойленко И.Е. и др. Особенности эпидемической ситуации по сибирскому клещевому тифу и другим клещевым риккетсиозам в Российской Федерации, прогноз на 2019 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 1: 89-97.
2. Рудаков Н.В., Самойленко И.Е., Решетникова Т.А. Проблемы лабораторной диагностики риккетсиозов группы клещевой пятнистой лихорадки в России. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 1(60): 50-2.
3. Рудаков Н.В., Абрамова Н.В., Штрек С.В., Шаламова Е.В., Пеневская Н.А., Рудакова С.А. и др. Клинико-лабораторная диа-

- гностика клещевых риккетсиозов на территориях низкого риска инфицирования *Rickettsia sibirica*. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63(11): 717-21.
4. Воробьев А.А. *Микробиология и иммунология: учебник для студентов высшего сестринского образования. 2-е изд., перераб. и доп.* М.: Медицина; 2005.
5. Зверев В.В., Бойченко М.Н. *Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. В 2-х томах.* М.: ГЭОТАР-Медиа; 2016.
6. Рудаков Н.В., Шпынов С.Н., Самойленко И.Е., Кумпан Л.В., Решетникова Т.А. Современные подходы к изучению *Rickettsiales*. *Бюллетень сибирской медицины*. 2006; 6, S.1: 111-5.
7. Абрамова Н.В., Рудаков Н.В., Пеневская Н.А., Седых Н.Н., Кумпан Л.В., Самойленко И.Е. и др. Апробация иммуноферментного анализа для серологической диагностики инфекций, вызываемых риккетсиями группы клещевой пятнистой лихорадки. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2010; 1 (50): 17-21.
8. Пеневская Н.А., Рудаков Н.В., Абрамова Н.В., Рудакова С.А., Коломенский А.П. Клинико-эпидемиологический анализ результатов выявления антител к различным видам риккетсий у больных с подозрением на клещевую нейроиновую инфекцию в северных районах Омской области. *Сибирский медицинский журнал*. 2009; 8: 48-53.
10. Рудаков Н.В., Шпынов С.Н., Самойленко И.Е., Оберт А.С. Клещевой риккетсиоз и риккетсии группы клещевой пятнистой лихорадки в России. Омск: «Омский научный вестник»; 2011.
11. Карташов М.Ю., Микрюкова Т.П., Терновой В.А., Москвитина Н.С., Локтев В.Б. Высокоэффективная детекция ДНК риккетсий методом ПЦР в реальном времени. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 12: 39-43.
12. Бондаренко Е.И., Мокрецова Е.В., Здановская Н.И., Высочина Н.П., Пухова Н.М., Тимофеев Д.И. и др. Выявление возбудителей клещевого риккетсиоза в клещах и крови пациентов на Дальнем Востоке с помощью ПЦР-анализа в режиме реального времени. *Поликлиника*. 2014; 4: 44-8.
13. Иголкина Я.П., Рар В.А., Епихина Т.И., Тикунов А.Ю., Краснова Е. И., Проворова В.В. и др. Выявление ДНК *Rickettsia raoultii* и *Rickettsia sibirica* в крови и ликворе пациентов в Западной Сибири. *Национальные приоритеты России*. 2016; 4 (22): 85-8.
14. Григорьева Я.Е., Карань Л.С., Мокрецова Е.В., Щучинова Л.Д., Федорова М.В., Журенкова О.Б. и др. Сравнительный анализ ПЦР- и ИФА-методов в лабораторной диагностике риккетсиозов группы КПЛ на примере трехлетних исследований в республике Алтай и Хабаровском крае. *Молекулярная диагностика*. 2017; 2: 192-4.
19. Чеканова Т.А., Неталиева С.Ж., Шпынов С.Н., Бабаева М.А., Костарной А.В. Ретроспективная серологическая диагностика риккетсиозов группы клещевой пятнистой лихорадки на территории высокого риска инфицирования *Rickettsia conorii subsp. caspia*. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64 (6): 354-9.
20. Бесхлебцова О.В., Гранитов В.М., Шпынов С.Н., Дедков В.Г., Арсеньева И.В., Пантюхина А.Н. Риккетсиозы группы клещевой пятнистой лихорадки в Алтайском крае. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2017; 2(19): 73-8.
21. Бесхлебцова О.В., Гранитов В.М., Дедков В.Г. Лабораторная диагностика клещевых инфекций с природной очаговостью (клещевой риккетсиоз, иксодовый клещевой боррелиоз). *Бюллетень медицинской науки*. 2017; 4: 50-4.
22. Шпынов С.Н., Арсеньева И.В., Гранитов В.М., Рудаков Н.В.

Клещевой риккетсиоз в Алтайском крае: эпидемиологические аспекты, молекулярно-биологическая верификация. *Сибирский медицинский журнал*. 2008; 82(7): 43-4.

23. Гранитов В.М., Арсеньева И.В., Бесхлебова О.В., Дедков В.Г., Карань Л.С., Васильева О.А. Первый клинический случай клещевого риккетсиоза, вызванного *R. heilongangensis*, на территории Сибири. *Инфекционные болезни*. 2014; 12(3): 91-4.
24. Рудаков Н.В. *Риккетсии и риккетсиозы: руководство для врачей*. Омск: «Омский научный вестник»; 2016.
25. Рудаков Н.В., Самойленко И.Е., Рудакова С.А., Кумпан Л.В., Белан Ю.Б., Решетникова Т.А. и др. О роли *Rickettsia raoultii* в эпидемиологии клещевых риккетсиозов в России. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 2015; 3: 17-21.
27. Флетчер Р., Флетчер С., Флетчер Э. *Клиническая эпидемиология. Основы доказательной медицины*. Москва: Медиа Сфера; 1998.

REFERENCES

1. Rudakov N.V., Shpynov S.N., Trankvilevsky D.V., Pakskina N.D., Savel'ev D.A., Samoylenko I.E., Features of the Epidemiological Situation on Siberian Tick Typhus and other Tick-Borne Rickettsioses in the Russian Federation, Prognosis for 2019. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2019; 1: 89-97. (in Russian)
2. Rudakov N.V., Samoylenko I.E., Reshetnikova T.A. The problems of laboratory diagnostic of rickettsiosis of group spotted tick-bite fever in Russia. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2015; 1 (60): 50-2. (in Russian)
3. Rudakov N.V., Abramova N.V., Shtrek S.V., Shalamova E.V., Pen'yevskaya N.A., Rudakova S.A. et al. Clinical and laboratory diagnosis of tick-borne rickettsioses in areas of low risk of infection *Rickettsia sibirica*. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* 2018; 63(11): 717-21. (in Russian)
4. Vorob'yov A.A. *Microbiology and Immunology: a textbook for students of higher nursing education. 2nd edition revised and enlarged*. Moscow: Meditsina; 2005. (in Russian)
5. Zverev V.V., Boychenko M.N. *Medical Microbiology, Virology and Immunology. In 2 volumes*. [Meditsinskaya mikrobiologiya, virusologiya i immunologiya]. Moscow: GEOTAR-Media; 2016. (in Russian)
6. Rudakov N.V., Shpynov S.N., Samoylenko I.E., Kumpan L.V., Reshetnikova T.A. Modern approaches to the study of Rickettsiales. *Byulleten' sibirskoy meditsiny*. 2006; 6, S.1: 111-5. (in Russian)
7. Abramova N.V., Rudakov N.V., Pen'yevskaya N.A., Sedih N.N., Kumpan L.V., Samoylenko I.E. Approbation of Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Serologic Diagnostics of the Infections Caused Spotted Fever Group Rickettsiae. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika*. 2010; 1 (50): 17-21. (in Russian)
8. Pen'yevskaya N.A., Rudakov N.V., Abramova N.V., Kolomensky A.P. The Clinicoepidemiological Analysis of Results of Revealing of Antibodies to Various Species Rickettsiae in Patients with Suspicion to Tick-borne Neuroinfection in Northern Areas of Omsk Region. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal*. 2009; 8: 48-53. (in Russian)
9. Kollipara R., Tying S.K. *Rickettsial Infections*. In: Tying S.K., Hengge U.R., Lupi O. *Tropical Dermatology (Second Edition)*. Elsevier; 2017: 280-96.
10. Rudakov N.V., Shpynov S.N., Samoylenko I.E., Obert A.S. Tick-borne rickettsiosis and rickettsiae of spotted fever group in Russia. Омск: Омский научный вестник; 2011. (in Russian)
11. Kartashov M.Yu., Mikryukova T.P., Ternovoi V.A., Moskvitina N.S., Loktev V.B. The highly effective detection of DNA rickettsia using technique of polymerase chain Reaction in real-time. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* 2015; 12: 39-43. (in Russian)
12. Bondarenko E.I., Mokrecova E.V., Zdanovskaya N.I., Vysochina N.P., Puxovskaya N.M., Timofeev D.I. Identification of tick-borne rickettsiosis pathogens in ticks and patients' blood in real time. *Poliklinika*. 2014; 4: 44-8. (in Russian)
13. Igolkina Y.P., Rar V.A., Epihina T.I., Tikunov A.Y., Krasnova E.I., Provorova V.V. et al. Revealing of *Rickettsia raoultii* and *Rickettsia sibirica* DNA in blood and cerebrospinal fluid in the patients of Western Siberia. *Natsionalnye priority Rossii*. 2016; 4 (22): 85-8. (in Russian)
14. Grigoreva Y.A.E., Karan L.S., Mokrecova E.V., Shhuchinova L.D., Fedorova M.V., Zhurenkova O.B. et al. Comparative analysis of PCR and ELISA methods in laboratory diagnostics of rickettsioses of the KPL group using the example of three-year studies in the Altai Republic and the Khabarovsk Territory. *Molekulyarnaya diagnostika*. 2017; 2: 192-4. (in Russian)
15. Mane A., Kamble S., Singh M.K., Ratnaparakhi M., Nirmalkar A., Gangakhedkar R. Seroprevalence of spotted fever group and typhus group rickettsiae in individuals with acute febrile illness from Gorakhpur, India. *Journal of Infectious Diseases*. 2019; 79: 195-8.
16. Field-Cortazares J., Escárcega-Ávila A.M., López-Valencia G., Barreras-Serrano A., Tinoco-Gracia L. Seroprevalence of risk factors associated with rickettsiosis (*Rickettsia rickettsii*) in humans in Baja California, Mexico. *Gaceta medica de Mexico*. 2015; 151: 38-42.
17. Baymakovaa M., Pekovab L., Plocheva K., Paroushevav P. Severe clinical forms of Mediterranean Spotted Fever: A case series from an endemic area in Bulgaria. *International Journal of Infectious Diseases*. 2016; 53S: 150-1.
18. Tripathi C.D.P., Singh M., Agarwal J., Kanta C., Atam V. Seroepidemiology of Spotted Fever Rickettsiosis in Uttar Pradesh: A Prospective Study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2017; 11(6): 4-9.
19. Chekanova T.A., Netalieva S.Zh., Shpynov S.N., Babaeva M.A., Kostamoy A.V. Retrospective serological diagnostics of spotted fever group rickettsioses in high risk areas of *Rickettsia conorii subsp. caspia* infection. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2019; 64: 354-9. (in Russian)
20. Beskhlebova O.V., Granitov V.M., Shpynov S.N., Dedkov V.G., Kosten'yeva I.V., Pantyukhina A.N. Rickettsioses of spotted fever group in the Altai region. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie*. 2017; 2(19): 73-8. (in Russian)
21. Beskhlebova O.V., Granitov V.M., Dedkov V.G. Laboratory diagnostics of tissue infections with natural focus (tick-borne rickettsiosis, ixodic tick-borne borreliosis). *Byulleten' meditsinskoy nauki*. 2017; 4: 50-4. (in Russian)
22. Shpynov S.N., Arseneva I.V., Granitov V.M., Rudakov N.V. Tick-borne rickettsiosis in Altai region: epidemiological aspects, molecular-biological verification. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal*. 2008; 82(7): 43-4. (in Russian)
23. Granitov V.M., Arseneva I.V., Beskhlebova O.V., Dedkov V.G., Karan' L.S., Vasifeva O.A. The first clinical case of tick-borne rickettsiosis associated by *Rickettsia heilongjiangensis* in Siberia. *Infektsionnye bolezni*. 2014; 12(3): 91-94. (in Russian)
24. Rudakov N.V. *Rickettsia and rickettsioses: a guide for physicians*. Омск: «Омский научный вестник». 2016. (in Russian)
25. Rudakov N.V., Samoylenko I.E., Rudakova S.A., Kumpan L.V., Belan Y.B., Reshetnikova T.A. et al. On the role of *Rickettsia raoultii* in the epidemiology of tick-borne rickettsioses in Russia. *Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni*. 2015; 3: 17-21. (in Russian)
26. Goksuluk D., Korkmaz S., Zararsiz G., Karaagaoglu E. Easy ROC: An Interactive Web-tool for ROC Curve Analysis Using R Language Environment. *The R Journal*. 2016; 8/2: 213-30. Available at: <https://journal.r-project.org/archive/2016/RJ-2016-042/RJ-2016-042.pdf> (accessed 16 July 2019).
27. Fletcher R., Fletcher S., Fletcher E. *Clinical epidemiology. Basics of evidence-based medicine* [Klinicheskaya epidemiologiya. Osnovy dokazatel'noy meditsiny]. Moscow: Media Sphere. 1998. (in Russian)

Поступила 15.08.19

Принята к печати 22.08.19

Кукина И.В.¹, Зеля О.П.¹, Карань Л.С.²

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА БАБЕЗИОЗА ЧЕЛОВЕКА

¹ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет)» Минздрава РФ, 119991, Москва, Россия;

²ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора», 111123, Москва, Россия

Бабезиоз человека, вызываемый паразитическими простейшими *Babesia spp.* - трансмиссивная болезнь, регистрируемая спорадически, зооноз. Течение бабезиоза и прогноз зависят от вида возбудителя и иммунного статуса пациента. Значимость болезни определяется крайне тяжелым течением у иммунокомпрометированных пациентов, сходным с таковым осложненной тропической малярии, часто со смертельным исходом. В Европейских странах к настоящему времени описано более 50 случаев подтвержденного бабезиоза человека в большинстве случаев, вызванного *Babesia divergens*. Некоторые исследователи считают, что есть нераспознанные случаи. Возбудители бабезиоза - это облигатные внутриэритроцитарные паразиты позвоночных животных. Заражение человека происходит через укус клеща *Ixodes*. В организме позвоночного происходит бесполое размножение паразитов. Патогенез бабезиоза обусловлен массовым разрушением клеток хозяев. Интенсивный гемолиз эритроцитов приводит к развитию гемолитической анемии, гематурии, появляется желтуха, может развиться полиорганная недостаточность. Клинические проявления заболевания неспецифичны, часто первый диагноз - малярия, но лечение противомалярийными препаратами неэффективно. Основным методом, подтверждающим предполагаемый диагноз, является обнаружение внутриэритроцитарных паразитов в мазках крови, окрашенных по методу Романовского. Исследованы препараты крови, поступившие в референс-центр ИМПТиТЗ им. Е.И. Марциновского и проанализированы предоставленные сведения о больных. Приводятся оригинальные микрофотографии. Показаны основные морфологические формы эритроцитарного цикла развития паразита. Отмечена необычайно высокая (до 14 паразитов) множественная инвазия эритроцитов. Впервые показано паразитирование трофозоитов бабезий в нормобластах. Помимо известных тетрад паразитов «Мальтийский Крест», впервые обнаружены фигуры паразитов «секстет», образованные не разошедшимися после деления 6-ю трофозоитами, соединенными друг с другом острыми концами. Подробно описаны этапы дифференциальной диагностики бабезий с малярийными паразитами. Приводятся сведения по изменению ведущих неспецифических лабораторных показателей в общем и биохимическом анализах крови и в моче. Вид паразита - *B. divergens* определяли на основании классических морфологических признаков и также верифицировали с использованием ПЦР метода с детекцией в режиме реального времени и секвенированием фрагмента гена 18S рРНК гена. Обсуждаются молекулярно-биологические и серологические методы лабораторной диагностики болезни.

Ключевые слова: бабезиоз человека; трансмиссивная болезнь; заболевания, передаваемые клещами; паразитические простейшие; *Babesia spp.*; *Babesia divergens*; лабораторная диагностика.

Для цитирования: Кукина И.В., Зеля О.П., Карань Л.С. Лабораторная диагностика бабезиоза человека. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (9): 560-564. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-9-560-564>

Kukina I.V.¹, Zelya O.P.¹, Karan L.S.²

LABORATORY DIAGNOSTIC OF HUMAN BABESIOSIS

¹Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 119991, Moscow, Russia;

²Central Research Institute of Epidemiology, 111123, Moscow, Russia

Human babesiosis caused by parasitic protozoan *Babesia spp.* is sporadic zoonotic vector-borne infection. The course of babesiosis and prognosis depend on the type of pathogen and on the patient's immunological status. Significance this disease is a severe, often fatal course with immunocompromised patients resembling complicated falciparum malaria. In Europe to date, more than 50 cases of confirmed human babesiosis have been reported in most cases caused by *Babesia divergens*. Possible there are unrecognized cases. Pathogen is an obligate intraerythrocyte parasite of vertebrate animals. The organism is transmitted from animal to man through bite of Ixodidae tick. Asexual reproduction of the parasite occurs in a vertebrate host. The pathogenesis of babesiosis is caused by the destruction of host cells. Intensive haemolysis of red blood cells leads to the development of haemolytic anemia, haematuria, jaundice, and polyorgan failure may develop. The clinical manifestations of the disease are nonspecific. Detection of intraerythrocyte parasites in blood smears stained Gimsa-Romanovsky confirms the proposed diagnosis. Blood smears and some laboratory signs from fatal cases were analyzed in the Reference-centre of E. I. Martsinovskii Institute. Original microphotographs *B. divergens* are shown. The main morphological forms of the parasite are shown. In addition to the well-known tetrads of parasites «Maltese Cross», for the first time, the parasites dividing into 6 interconnected trophozoites - «sextet» - were found. Originally, the invasion of *Babesia* in a normoblast is shown. An unusually high multiple invasion (14 parasites) of erythrocytes is noted. Because the patients, initially, were incorrectly diagnosed with malaria, the differential diagnosis of *Babesia* with *Plasmodium* is described step-by-step. It is important, since the treatment with antimalarial drugs is ineffective. Deviation laboratory signs are discussed. Complex morphological characteristics allowed us to speciated the parasites as *B. divergens*. DNA was detected in the sample with specific primers Bab di hsp70F/Bab di hsp70R and the probe Bab di hsp70P. The sequence demonstrated 99–100% and 98% similarity to the 18S rRNA gene fragment of *B. divergens* and *Babesia venatorum*, respectively. Molecular biological and serological methods of laboratory diagnosis of babesiosis are considered.

Key words: human babesiosis; vector-borne infection; tick-borne disease; parasitic protozoa; *Babesia divergens*, *Babesia spp.*, laboratory diagnostics.

For citation: Kukina I.V., Zelya O.P., Karan L.S. Laboratory diagnostic of human babesiosis. *Klinicheskaya laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (9): 553-559. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-9-553-559>

For correspondence: Kukina I.V., PhD, assistant professor of the Chair of Tropical Medicine and Parasitic Diseases; e-mail: i.v.kukina1184@gmail.com

Information about authors:

Kukina I.V. - <http://orcid.org/0000-0003-1806-5841>

Zelya O.P. - <http://orcid.org/0000-0002-5030-1691>

Karan L.S. - <http://orcid.org/0000-0002-5927-460X>

Conflict of interest. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 20.05.2019
Accepted 25.06.2019

Введение. Бабезиоз (пироплазмоз) – один из самых распространенных в мире протозоозов животных – становится все чаще встречающейся болезнью человека, угрожающей жизни. Значимость бабезиоза человека определяется тяжелым течением у иммунокомпрометированных пациентов, часто со смертельным исходом. В Европейских странах к настоящему времени описано более 50 случаев подтвержденного бабезиоза человека, вызванного в большинстве случаев *Babesia divergens* [1], и 3 случая инвазии человека *B. venatorum* [2, 3]. На северо-востоке США ежегодно регистрируется до 2000 случаев заражения человека *Babesia microti* [4]. На территории России и бывшего Советского Союза описаны 3 случая бабезиоза, вызванного *B. divergens*, закончившиеся смертью больных [5-7].

Бабезиоз – трансмиссивное заболевание, передающееся человеку от животного через укус клеща р. *Ixodes*. Описаны единичные случаи вертикальной передачи бабезиоза от матери плоду [8, 9] и при трансплантации органов [10]. В США зарегистрировано более 200 случаев инвазии *B. microti* с донорской кровью, 12 из которых закончились смертельно [11].

Возбудителями болезни являются простейшие рода *Babesia* (Babesiidae: Apicomplexa). Это облигатные внутриэритроцитарные паразиты позвоночных животных. Бабезии имеют гетероксанный цикл развития с чередованием полового и бесполого размножения и сменой хозяев: беспозвоночных – клещей и различных позвоночных. В позвоночном хозяине происходит бесполой цикл развития паразита – мерогония. Разрушением клеток хозяев обусловлен патогенез бабезиоза.

Течение бабезиоза и прогноз зависят от вида возбудителя и иммунного статуса пациента. Заболевание, вызываемое *B. divergens*, у людей с удаленной селезенкой, как правило, протекает злокачественно [4, 12]. В нескольких случаях острое течение бабезиоза, вызванного *B. divergens*, наблюдали у пациентов с сохранной селезенкой [7, 13-15].

Длительность инкубационного периода составляет 1-3 недели после укуса зараженным клещом. Прдромальные признаки могут отсутствовать. Болезнь начинается внезапно с повышения температуры до 40°C, озноба, сменяющегося профузным потоотделением, гемоглобинурии, олигонурии с переходом в анурию. Интенсивный гемолиз эритроцитов приводит к развитию гемолитической анемии, появляется желтуха, может развиваться полиорганная недостаточность, протрация [1, 16, 17]. Пациента, как правило, госпитализируют в

тяжелом состоянии. Смерть больного может наступить к концу первой недели болезни. Даже при проведении этиотропного, патогенетического, симптоматического лечения летальность превышает 50% [18]. Клинические проявления бабезиоза неспецифичны, могут быть приняты за признаки вирусной инфекции или малярии. Диагноз устанавливается на основании лабораторного подтверждения – обнаружения паразитов в крови при микроскопическом исследовании препаратов крови, окрашенных по методу Романовского.

Цель настоящей работы расширить знания о бабезиозе и обратить внимание специалистов КДЛ на специфические и неспецифические лабораторные показатели, позволяющие распознать кровепаразитов и провести дифференциальную диагностику плазмодиев и бабезий.

Материал и методы. В референс-центре по малярии ИМПТиТЗ им. Е.И. Марциновского 1 МГМУ им. И.М. Сеченова исследованы препараты крови (толстая капля и тонкий мазок) и проанализированы предоставленные сведения о больных.

Пациентка К., женщина, 49 лет, проживавшая в сельской местности в Абхазии, работница чайной плантации, в личном хозяйстве содержала корову. За 15 лет до болезни перенесла спленэктомию, причина неизвестна. Присасывания клеща пациентка не заметила. Заболела 01.06, внезапно почувствовала озноб, слабость, тошноту, подъем температуры тела до 40°C. Отметила появление мочи темно-коричневого цвета. Появились желтушность склер, рвота, боли в пояснице. Госпитализирована в тяжелом состоянии. В крови обнаружены паразиты, которых, предположительно, определили как *P. falciparum*. Смерть наступила на 7-й день болезни. Диагноз «бабезиоз» установлен посмертно.

Пациент П., мужчина 58 лет, проживавший в деревне в Краснодарском крае, егерь. За 12 лет до болезни перенес спленэктомию в связи с травмой. Присасывания клеща пациент не заметил. Заболел 01.09, появились озноб, тошнота, рвота. Температура повысилась до 40°C. Моча окрасилась в бурый цвет, и резко уменьшилось ее количество. Больной был госпитализирован в тяжелом состоянии. Паразиты, обнаруженные в эритроцитах, определены как *P. falciparum*. Число пораженных эритроцитов достигало 23%. Диагноз «бабезиоз» установлен на 7-й день заболевания. Смерть наступила на 10-й день.

Пациентка Т., женщина 75 лет с сохранной селезенкой, жительница Москвы. На даче в Тверской области заметила присосавшегося клеща, но не удалила его. Заболела 06.08 с подъемом температуры до 38,5°C и

кашлем. В течение недели самостоятельно принимала жаропонижающие препараты. На 10-й день появилась одышка, желтуха, снизился диурез. Состояние при госпитализации тяжелое. В общем анализе крови обнаружены паразиты, предположительно определенные как *P. falciparum*. Число пораженных эритроцитов достигало 17%. Диагноз «бабезиоз» установлен на 12-й день заболевания. В результате проведенного лечения паразиты исчезли на 5 день, однако пациентка оставалась в тяжелом состоянии. У нее развился синдром системного воспалительного ответа инфекционного происхождения с органическими нарушениями R65.1. Смерть наступила через 3 месяца.

Для постановки лабораторного диагноза использовали основной унифицированный метод выявления кровепаразитов - микроскопию препаратов крови больного (толстой капли и тонкого мазка), окрашенных по методу Романовского. Вид, обнаруженных в «толстой капле» паразитов, определяли по «тонкому мазку».

В последнем случае диагноз также верифицировали с использованием ПЦР метода с детекцией в режиме реального времени и секвенированием фрагмента гена 18S рРНК гена. У пациентки Т. экстрагировали ДНК из препарата толстой капли крови, используя коммерческий набор Амплисенс Рибо-преп (ЦНИИЭ, Москва, Россия), в соответствии с инструкцией производителя. Дифференциальная диагностика *Babesia divergens* проводилась с *Babesia venatorum* (EU1), с использованием праймеров и зондов: Bab di hsp70F CTCATTGGTGACGCCGCTA, Bab di hsp70R CTCCTCCCGATAAGCCTCTT, Bab di hsp70P R6G-AGAACCAGGAGCCCCGTAACCCAGA-BQH, и Bab EU RNA18S F GCGCGCTACACTGATGCATT, Bab EU RNA18S R CAAAAATCAATCCCCGTCACG, Bab EU RNA18S P FAM-CATCGAGTTTAATCCTGTCCGAAAGG-BQH1 [19]. Участок гена 18S рРНК секвенировали с праймерами BS5 CGAGGCAGCAACGGG-TAACGB и BS4 AGGGACGTAGTCGGCACGAG [20] на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500 (Biosystems, США); сравнительный анализ полученной последовательности (MK510929, GenBank, NCBI) с геномами *Babesia* spp, депонированными в международную базу данных GenBank, NCBI, проводили в программе Mega 7.0.

Результаты. В препаратах крови больных, внутри эритроцитов обнаружены многочисленные паразиты, имеющие оксифильно окрашенное ядро и базофильно окрашенную цитоплазму. В тонком мазке крови выявлен полиморфизм паразитов, характерный для бабезий. Трофозоиты имели грушевидную, кольцевидную, булавовидную, безвакуольную, амебовидную форму (рис. 1, а, б, в, г, см.обложку). Грушевидные паразиты располагались поодиночке или были соединены попарно острыми концами относительно друг друга под тупым углом, приближающимся к 180°. Такая конфигурация, образованная в результате бинарного деления тропозоитов, часто именуемая как «фигура 8», нашла отражение в названии вида (рис. 1, а, рис. 2, в, см.обложку). Встречались и характерные тетрады тропозоитов - фигуры «Мальтийский Крест» (рис.1, а, д, ж). Благодаря вакуоли, окруженной по периферии тонким ободком бледно окрашенной цитоплазмы с более темным ядром, некоторые тропозоиты имели кольцевидную форму, характерную для плазмодиев (рис. 1, б, д, е, з; рис. 3, а, б, см. обложку). Однако в отличие от плазмодиев, кольцевидные формы бабезий претерпевали бинарное деление (рис. 1, е). Наблюдалась вытянутые формы (рис. 3, в). На осно-

вании морфологических признаков во всех трех случаях вид паразита определен как *B. divergens*.

У пациентки Т. (с сохранной селезенкой), обратившейся на 12-й день болезни, в мазках обнаружены помимо перечисленных выше форм фигуры паразитов «секстет», не описанные ранее, образованные не разошедшимися после деления 6-ю тропозоитами, соединенными друг с другом острыми концами (рис. 2, з). Число паразитов в одном эритроците часто достигало 6-8 тропозоитов (рис. 1 д, з; 2 б, в), при этом они располагались как по периферии эритроцита, так и хаотично (рис. 2, а, б, в, д). Впервые показана необычно интенсивная множественная инвазия эритроцитов (до 14 паразитов) при умеренном уровне пораженных эритроцитов (17 %) и обнаружены паразиты в цитоплазме нормобластов (рис. 2, а, е). Кроме этого, присутствовали свободные мерозоиты (рис. 2, д).

Положительный результат методом ПЦР в режиме реального времени был получен с праймерами Bab di hsp70F/Bab di hsp70R и зондом Bab di hsp70P, специфичными для *B. divergens*. При сравнительном анализе участка гена 18S рРНК была получена гомология 99–100% с *B. divergens* и 98% с *B. venatorum*.

Обсуждение. В последнее время бабезиоз человека стали диагностировать чаще, возможно, благодаря возросшему интересу к этой болезни и улучшению методов диагностики. Хотя некоторые исследователи считают, что часть случаев остаются нераспознанными [21].

По клинике бабезиоз похож на злокачественную тропическую малярию. Быстрое развитие болезни требует срочной постановки диагноза. Задержка в постановке диагноза приводит к неадекватному лечению и увеличению риска смертельного исхода заболевания. В литературе часто сообщают об ошибочной диагностике бабезиоза как малярии [22, 23]. Лечение бабезиоза противомалярийными препаратами неэффективно.

Определение видовой принадлежности бабезий имеет в основном научное значение, так как тактика лечения определяется тяжестью течения заболевания. Лабораторно дифференциальный диагноз бабезий проводится с плазмодиями:

1. В толстой капле обнаруживаем кровепаразитов (рис. 3, д, е). Дифференциальную диагностику бабезий и плазмодиев проводим по тонкому мазку.

2. Бабезии в эритроцитах образуют характерные фигуры бинарного деления, в отличие от плазмодиев, размножающихся путем шизогонии. При бабезиозе в периферической крови выражен **полиморфизм паразитов**, тогда как для *P.falciparum* характерна мономорфная картина. При неосложненном течении тропической малярии в мазках периферической крови паразит присутствует, преимущественно, на стадии кольца и, если заболевание длится более 12 дней, зрелых гаметоцитов. Окраска вакуоли юных кольцевидных стадий малярийных паразитов близка к таковой цитоплазмы клетки-хозяина. Вакуоль содержит остатки не полностью метаболизированного гемоглобина и строму эритроцита, окрашенную в розовый цвет. У бабезий метаболизм цитоплазмы клетки-хозяина полный, гемозоин не образуется, поэтому вакуоль кольцевидных форм выглядит пустой или прозрачной (рис. 1, б, д, е) [24].

3. Для дифференциальной диагностики бабезий и плазмодиев также важно, что в цитоплазме бабезий **отсутствует пигмент**, характерный для малярийных паразитов. Кольцевидные тропозоиты *P. falciparum* также не

имеют различных гранул малярийного пигмента. Однако в мазках крови при малярии встречаются пигментофаги - нейтрофилы и моноциты, в цитоплазме которых виден фагоцитированный малярийный пигмент. Кроме этого, при осложненном течении тропической малярии в периферической крови на фоне большого количества кольцевидных трофозоитов, появляются взрослые трофозоиты, шизонты и юные гаметоциты, содержащие в цитоплазме малярийный пигмент (рис. 3, е).

4. Дифференциальную диагностику бабезий и плазмодиев могут затруднять атипичные формы паразитов, возникающие как при медленном высыхании мазка, так и под действием лекарственных препаратов (рис. 3, в, з).

Микроскопическое исследование крови достаточно субъективный метод, результат исследования зависит от квалификации и опыта микроскописта, качества приготовления и окраски мазка крови и тщательности исследования. При отрицательном результате просмотра толстой капли (что возможно, если численность паразитов низка; чувствительность метода - 5-10 паразитов в мкл крови), но положительном анамнезе и изменениях неспецифических лабораторных показателей, указывающих на гемолиз, необходимы повторные взятия крови и просмотр серийных мазков, что повышает вероятность выявления паразитов¹.

В последнее время в лабораториях для проведения общего анализа крови применяются гематологические анализаторы и, если показатели не выходят за пределы референсных значений, то исследования мазков под микроскопом не проводят. Поэтому возможность обнаружения кровепаразитов как случайной находки при подсчете лейкоформулы исключается. При автоматическом подсчете эритроцитов как при малярии, так и при бабезиозе, анализатор не показывает различия между инфицированными и неинфицированными эритроцитами, и кровепаразиты будут пропущены [25, 26]. Однако эритроциты, инфицированные кровепаразитами, за счет окраски ядерного вещества паразитов, подсчитываются анализатором как ретикулоциты, (что имеет следствием так называемый псевдоретикулоцитоз) [27]. Таким образом, превышение ожидаемого ретикулярного ответа на анемию и/или аномальная скаттерограмма ретикулоцитов может подсказать наличие эритроцитов с включениями и делает необходимым просмотр мазка под микроскопом для уточнения информации и предотвращения неправильного диагноза.

Из неспецифических лабораторных показателей в общем анализе крови при бабезиозе, как и при малярии, в начале заболевания гемоглобин (Hb) и эритроциты (RBC) могут быть в норме, а МСНС – средняя концентрация Hb в эритроците выше насыщенной концентрации (37 г/л), что, в данном случае, свидетельствует о гемолизе. Далее Hb и RBC будут снижаться (в течение недели Hb может снизиться до 65 г/л, RBC - до $2,0 \times 10^{12}/л$). Анемия нормохромная, нормоцитарная, эритроцитарные индексы (содержание Hb в эритроците - МСН и средний объем эритроцита - MCV) остаются в норме.

Число лейкоцитов может варьироваться, чаще бывает в норме. В лейкоформуле может быть нейтрофилез с левым сдвигом до миелоцитов. В периферических мазках

видны признаки дисэритропоэза – нормобласты, анизоцитоз, пойкилоцитоз (мишеневидные клетки). У пациентов после спленэктомии, либо вследствие функционального гипоспленизма могут обнаруживаться тельца Жолли и повышенное количество шизоцитов.

Тромбоциты резко снижены. Однако наличие фрагментов эритроцитов – шизоцитов - может привести к завышению анализатором числа тромбоцитов, к так называемому «псевдотромбоцитозу».

В сыворотке обнаруживают маркеры внутрисосудистого гемолиза и нарастающей почечной недостаточности: свободный Hb, повышаются билирубин за счет несвязанного, трансаминазы, щелочная фосфатаза, лактатдегидрогеназа, креатинин, мочевины, уровень С-реактивного белка.

В общем анализе мочи - протеинурия, гемоглобинурия.

Другие методы лабораторной диагностики. Генодиагностика (ПЦР). Для ПЦР диагностики *B. microti* в США применяют коммерческие наборы. В Европе для генодиагностики *B. divergens* и *B. venatorum* нет сертифицированных коммерческих наборов, которые можно было бы применять в рутинной практике. В России ПЦР применяют в научно-исследовательских институтах в научных целях, с праймерами, разработанными для исследовательских задач, а в диагностических центрах могут использовать только зарегистрированные наборы реагентов. С помощью этого метода можно дифференцировать морфологически сходные виды, а также подтвердить сомнительный диагноз [19]. Для этого метода характерна высокая видоспецифичность. Чувствительность метода – 5-10 паразитов в микролитре крови, что сопоставимо с чувствительностью метода толстой капли [28].

При проведении требуется особая осторожность, так как тест может давать ложноположительные результаты. Кроме этого, ложноположительные результаты могут быть в течение месяца после излечения за счет остаточной антигенемии [1].

Серологические тесты. Тесты, основанные на обнаружении Ат, неприменимы для диагностики острого бабезиоза. Ат появляются только к концу первой недели заболевания, поэтому результат будет отрицательным в начале заболевания. А болезнь, вызванная *B. divergens*, протекает, как правило, остро и требует срочной постановки диагноза. В США применяют коммерческие ИФА тесты на присутствие IgM и/или IgG антител против *B. microti*, часто вызывающей болезнь с латентным течением. Эти коммерческие наборы неприменимы для диагностики бабезиоза в Европе из-за высокой видоспецифичности, где возбудителями являются *B. divergens*, *B. venatorum*. Для этих видов возбудителей коммерческие наборы не разработаны.

Серологические тесты не рекомендуют использовать у людей с ослабленным иммунитетом, так как могут быть ложноотрицательные результаты. Ложноположительные ответы могут быть у пациентов с бактериальными, вирусными инфекциями, аутоиммунными нарушениями, в случаях инфекции *Plasmodium* и *Toxoplasma* [29].

Заключение. Клиническая симптоматика бабезиоза неспецифична, ошибочно легко может быть принята за признаки вирусной инфекции или малярии.

Обнаружение в мазках крови внутриэритроцитарных паразитов, многие из которых имеют кольцевидную

¹Лабораторная диагностика малярии и бабезиозов. МУК 4.2.3222-14. М.: ФБУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора; 2015.

форму, нередко приводит к неверному заключению о присутствии возбудителя тропической малярии. Факт проживания пациента в умеренной климатической зоне (большинство случаев заражения бабезиями человека в Европе произошло именно в ней), где тропическая малярия не эндемична, и отсутствие поездок в страны с тропическим климатом, вызывают сомнения в диагнозе «тропическая малярия».

Наличие в анамнезе больного факта присасывания клеща дает возможность врачу заподозрить бабезиоз, хотя это может остаться и незамеченным. Для умеренной зоны характерна сезонность заболевания с апреля по сентябрь (сезон активности клещей).

Бабезиоз человека в Европе встречается крайне редко. Врачи-клиницисты и специалисты КДЛ не имеют достаточных знаний и опыта в выявлении кровепаразитов. Следствием этого является не правильная и/или поздняя диагностика и задержка проведения специфического лечения, что увеличивает риск смерти больного.

Окончательный диагноз «бабезиоз» ставят на основании соответствующих клинических проявлений и лабораторного подтверждения – обнаружения паразитов в крови при микроскопическом исследовании препаратов крови, окрашенных по методу Романовского.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-4, 6-25, 27-29 см. REFERENCES)

5. Рабинович С.А., Воронина З.К., Степанова Н.И., Маруашвили Г.М., Баградзе Т.Л., Одишария М.С. и др. Первое обнаружение бабезиоза человека в СССР и краткий анализ случаев, описанных в литературе. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 1978; 47(3): 97-107.
26. Кукина И.В. Случайная находка возбудителя трехдневной малярии в общем анализе крови. *Вестник ФСВОК*. 2017: 36 – 7.

REFERENCES

1. Rożej-Bielicka W., Stypułkowska-Misiurewicz H., Gołąb E. Human babesiosis. *Przegl. Epidemiol.* 2015; 69(3):489-94.
2. Herwaldt B.L., Cacciò S., Gherlinzoni F., Aspöck H., Slemenda S.B., Piccaluga P. et al. Molecular characterization of a non-*Babesia divergens* organism causing zoonotic babesiosis in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 2003; 9(8):942-8.
3. Häselbarth K., Tenter A.M., Brade V., Krieger G., Hunfeld K.P. First case of human babesiosis in Germany - Clinical presentation and molecular characterisation of the pathogen. *Int. J. Med. Microbiol.* 2007; 297(3):197-204.
4. Vannier E., Krause P.J. Human babesiosis. *N. Engl. J. Med.* 2012; 366 (25):2397-407.
5. Rabinovich S.A., Voronina Z.K., Stepanova N.I., Maruashvili G.M., Bakradze T.L., Odishariya M.S. et al. 1st detection of human babesiosis in the USSR and a short analysis of the cases described in literature. *Meditsinskaya parazitologiya*. 1978; 47(3): 97-107. (in Russian)
6. Kukina I.V., Guzeeva T.M., Zelya O.P., Ganushkina L.A. Fatal human babesiosis caused by *Babesia divergens* in an asplenic host. *IDCases*. 2018; 30; 13:e00414.
7. Kukina I.V., Zelya O.P., Guzeeva T.M., Karan L.S., Perkovskaya I.A., Tymoshenko N.I. et al. Severe babesiosis caused by *Babesia*

- divergens* in a host with intact spleen, Russia. *Ticks Tick Borne Dis.* 2019; 10(6):101262.
8. Aderinboye O., Syed S.S. Congenital babesiosis in a four-week-old female infant. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2010; Feb 29(2):188.
9. Yager P.H., Luginbuhl L.M., Dekker J.P. Case records of the Massachusetts General Hospital. Case 6-2014. A 35-day-old boy with fever, vomiting, mottled skin, and severe anemia. *N. Engl. J. Med.* 2014; Feb 20; 370(8):753–62.
10. Brennan M.B., Herwaldt B.L., Kazmierczak J.J., Weiss J.W., Klein C.L., Leith C.P. et al. Transmission of *Babesia microti* Parasites by Solid Organ Transplantation. *Emerg. Infect. Dis.* 2016 Nov; 22(11):1869-76.
11. Villatoro T., Karp J.K. Transfusion-Transmitted Babesiosis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2019; Jan; 143(1):130-4.
12. Gray J.S., Zintl A., Hildebrandt A., Hunfeld K.P., Weiss L. Zoonotic babesiosis: overview of the disease and novel aspects of pathogen identity. *Ticks Tick Borne Dis.* 2010; 1: 3–10.
13. Gonzalez L.M., Rojo S., Gonzalez-Camacho F., Luque D., Lobo C.A., Montero E. Severe babesiosis in immunocompetent man, Spain, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; Apr; 20 (4):724-6.
14. Martinot M., Zadeh M.M., Hansmann Y., Grawey I., Christmann D., Aguilon S. et al. Babesiosis in immunocompetent patients. *Europe. Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(1): 114-6.
15. O'Connell S., Lyons C., Abdou M., Patowary R., Aslam S., Kinsella N. et al. Splenic dysfunction from celiac disease resulting in severe babesiosis. *Ticks Tick Borne Dis.* 2017; 8:537-9.
16. Ruebush T.K. 2nd, Juranek D.D., Chisholm E.S., Snow P.C., Healy G.R., Sulzer A.J. Human babesiosis on Nantucket Island. Evidence for self-limited and subclinical infections. *N. Engl. J. Med.* 1977 Oct 13; 297(15):825-7.
17. Krause P.J., Gewurz B.E., Hill D., Marty F.M., Vannier E., Foppa I.M. et al. Persistent and relapsing babesiosis in immunocompromised patients. *Clin. Infect. Dis.* 2008; Feb 1; 46(3): 370-6.
18. Brasseur P., Gorenflot A. Human babesial infections in Europe. *Rocz. Akad. Med. Białymst.* 1996; 41(1): 117-22.
19. Michelet L., Delannoy S., Devillers E., Umhang G., Aspan A., Juremalm M., et al. High-throughput screening of tick-borne pathogens in Europe. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2014; Jul 29; 4:103.
20. Rar VA, Epikhina TI, Livanova NN, Panov VV. Genetic diversity of *Babesia* in *Ixodes ricinus* and small mammals from north Ural and west Siberia, Russia. *Parasitology*. 2011; 138(2):175-182.
21. Hildebrandt A., Gray J.S., Hunfeld K.P. Human babesiosis in Europe: what clinicians need to know. *Infection*. 2013; 41(6):1057-72.
22. Clark I.A., Jacobson L.S. Do babesiosis and malaria share a common disease process? *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1998; Jun; 92(4):483-8.
23. Homer M.J., Aguilar-Delfin I., Telford S.R. 3rd, Krause P.J., Persing D.H. Babesiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000; 13(3):451-69.
24. Garnham P.C. Human babesiosis: European aspects. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1980; 74(2): 153-5.
25. Bruckner D.A., Garcia L.S., Shimizu R.Y., Goldstein E.J., Murray P.M., Lazar G.S. Babesiosis: problems in diagnosis using autoanalyzers. *Am. J. Clin. Pathol.* 1985 Apr; 83(4): 520-1.
26. Kukina I.V. Accidental finding of the causative organism of tertian malaria in the clinical blood analysis. *Vestnik FSVOK*. 2017: 36 – 7. (in Russian)
27. Hoffmann J.J., Pennings J.M. Pseudo-reticulocytosis as a result of malaria parasites. *Clin. Lab. Haematol.* 1999; Aug; 21(4):257-60.
28. Teal A.E., Habura A., Ennis J., Keithly J.S., Madison-Antenucci S. A new real-time PCR assay for improved detection of the parasite *Babesia microti*. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(3):903–8.
29. Vannier E., Krause P.J. Update on babesiosis. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2009; 2009:984568.

Поступила 20.05.19

Принята к печати 25.06.19

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Останкова Ю. В.¹, Семенов А. В.^{1,2,3}, Тотолян Арег А.^{1,2}

МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ КОЛЬЦЕВОЙ КОВАЛЕНТНО-ЗАМКНУТОЙ ДНК ВГВ В ПУНКЦИОННЫХ БИОПТАТАХ ПЕЧЕНИ

¹ ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 197191, Санкт-Петербург, Россия;

² ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени акад. И. П. Павлова» Минздрава РФ, 197022, Санкт-Петербург, Россия;

³ ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Минздрава РФ, 191015, Санкт-Петербург, Россия

Цель - проанализировать метод количественного определения кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК ВГВ в пункционных биоптатах печени и оценить его значимость при идентификации HBsAg-негативного вирусного гепатита В.

В работе были использованы образцы биопсийного материала ткани печени 128 больных, проживающих на территории Санкт-Петербурга, в различных регионах РФ, а также в Республике Узбекистан.

Для количественного анализа кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК ВГВ в биопсийном материале на базе методики выявления ккз ДНК ВГВ Pollicino T. и др. был разработан метод, основанный на ПЦР с детекцией в режиме реального времени с использованием TaqMan зондов для целевого фрагмента и для эндогенного референсного гена.

При количественной оценке ккз ДНК ВГВ в ткани печени 18 больных ХВГВ умеренной активности с положительным результатом ПЦР ДНК ВГВ и 16 неактивных носителей HBsAg, содержание ккз ДНК ВГВ достоверно отличалось между группами ($p < 0,034$) и в пересчете на 1 копию гена β -глобина у больных ХВГВ умеренной активности составило $1,71 \pm 1,32$ копий/кл, а у неактивных носителей HBsAg $0,15 \pm 0,14$ копий/кл. В группе больных с выраженным фиброзом и циррозом печени количество ккз ДНК ВГВ в ткани печени у пациентов с ХВГВ составило в среднем $2,5 \pm 0,4$ копии/клетку, у пациентов с ХВГВ + Д в среднем $0,7 \pm 0,25$ копий/клетку, у пациентов с коинфекцией ВГС + ВГВ $0,45 \pm 0,07$ копий/клетку, у пациентов с предварительным диагнозом ХВГС в среднем $0,12 \pm 0,04$ копий/клетку, у пациентов с криптогенным гепатитом $0,2 \pm 0,05$ копий/клетку. Показано значимое отличие между группой больных ХВГВ с выраженным фиброзом и циррозом печени со всеми группами пациентов, кроме группы из 18 больных ХВГВ умеренной активности. Значения t -критерия Стьюдента при сравнении с остальными группами составили соответственно: для пациентов с предварительным диагнозом ХВГС $t = 5,92$ $p < 0,05$ $f = 19$, пациентов с криптогенным гепатитом $t = 5,71$ $p < 0,05$ $f = 18$, с «неактивным носительством HBsAg» $t = 5,55$ $p < 0,05$ $f = 29$, с коинфекциями ВГС + ВГВ $t = 5,05$ $p < 0,05$ $f = 15$ и ХВГВ + Д $t = 3,82$ $p < 0,05$ $f = 17$.

Метод количественной оценки кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК ВГВ в пункционных биоптатах печени позволяет идентифицировать HBsAg-негативную форму хронического вирусного гепатита В, а также отражает активность репликации вируса, что, в свою очередь, дает возможность предполагать дальнейшее прогрессирование заболевания и оценивать эффективности антивирусной терапии.

Ключевые слова: хронический вирусный гепатит В, скрытый гепатит В, кольцевая ковалентно-замкнутая ДНК ВГВ.

Для цитирования: Останкова Ю. В., Семенов А. В., Тотолян Арег А. Метод количественной оценки кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК ВГВ в пункционных биоптатах печени. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (9):565-570

DOI: [http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-9-](http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-9-565-570)

Ostankova Yu. V.¹, Semenov A. V.^{1,2,3}, Totolian Areg A.^{1,2}

THE QUANTITATIVE DETERMINATION METHOD OF COVALENTLY CLOSED CIRCULAR DNA HBV IN PUNCTURE BIOPSY SPECIMENS OF THE LIVER

¹Saint-Petersburg Pasteur Institute, 197191, Saint Petersburg, Russia;

²Saint-Petersburg State Medical University n.a. acad. I. P. Pavlov, 197022, Saint Petersburg, Russia;

³North-West State Medical University n.a. I. I. Mechnikov, 191015, Saint Petersburg, Russia

To analyze the method HBV covalently closed circular DNA quantitative determination in liver puncture biopsies and evaluate its significance in identifying HBsAg-negative viral hepatitis B. In this work, samples of liver tissue biopsy material were used from 128 patients living in St. Petersburg, in various regions of the Russian Federation, as well as in the Republic of Uzbekistan. For quantitative analysis of HBV covalently closed circular DNA in a biopsy material a method was developed based on real-time PCR using TaqMan probes for the target fragment and for the endogenous reference gene, based on the detecting ccc HBV DNA method of Pollicino T. et al.

When quantifying ccc DNA HBV in liver tissue of 18 moderately HBV activity with HBV DNA PCR positive results patients and 16 inactive HBsAg carriers, the ccc DNA HBV content was significantly different between groups ($p < 0.034$) and in terms 1 copy of the β -globin gene among moderate activity HBV patients amounted to 1.71 ± 1.32 copies/cell, and for inactive HBsAg carriers 0.15 ± 0.14 copies/cell. In the group of patients with severe liver fibrosis and cirrhosis, the amount of ccc DNA HBV in liver tissue in

patients with HBV averaged 2.5 ± 0.4 copies/cell, in patients with HBV + D on average 0.7 ± 0.25 copies/cell, in patients with HCV + HBV co-infection 0.45 ± 0.07 copies/cell, in patients with a preliminary diagnosis of chronic hepatitis C hepatitis, on average 0.12 ± 0.04 copies/cell, in patients with cryptogenic hepatitis 0.2 ± 0.05 copies/cell. A significant difference was shown between the group of patients with chronic hepatitis B with marked fibrosis and cirrhosis of the liver with other patients groups, except for the group of 18 moderate activity chronic hepatitis B patients. The values of Student's t-test when compared with other groups were respectively: for patients with a HCV preliminary diagnosis $t=5.92$ $p<0.05$ $f=19$, patients with cryptogenic hepatitis $t=5.71$ $p<0.05$ $f=18$, with «inactive HBsAg carriage» $t=5.55$ $p<0.05$ $f=29$, with HCV + HBV co-infection $t=5.05$ $p<0.05$ $f=15$ and HBV + D co-infection $t=3.82$ $p<0.05$ $f=17$.

The covalently closed circular DNA HBV quantitative assessment method in liver puncture biopsies allows identifying HBsAg-negative chronic viral hepatitis B forms and also reflects the virus replication activity, which, in turn, makes it possible to assume further disease progression and evaluate the antiviral therapy effectiveness.

Key words: chronic hepatitis B, occult hepatitis B, covalently closed circular DNA HBV.

For citation: Ostankova Yu. V., Semenov A. V., Totolian Areg A. The quantitative determination method of covalently closed circular DNA HBV in puncture biopsy specimens of the liver. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika* (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (9): 565-570 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-9-565-570>

For correspondence: Ostankova Yu. V., PhD researcher at the Laboratory of Molecular Immunology; e-mail: shenna1@yandex.ru

Information about authors:

Ostankova Yu. V. <http://orcid.org/0000-0003-2270-8897>

Semenov A. V. <https://orcid.org/0000-0003-3223-8219>

Totolian Areg A. <https://orcid.org/0000-0003-4571-8799>

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Received 25.05.2019
Accepted 25.06.2019

Введение. Согласно ВОЗ количество инфицированных вирусом гепатита В в мире составляет почти 2 млрд человек, у более чем 240 миллионов из них развивается хронический вирусный гепатит В (ХВГВ) - диффузно-воспалительное заболевание, связанное с персистенцией вируса гепатита В. Ежегодно умирают 686 000 человек, инфицированных вирусом гепатита В, в том числе от цирроза и рака печени в результате осложнения хронической инфекции [1].

Согласно классификации Европейской ассоциации изучения печени (European Association for the Study of the Liver, EASL), естественное течение ХВГВ проходит 5 стадий, при этом для хронической инфекции характерно устойчивое присутствие HBsAg в течение не менее 6 месяцев (при наличии или отсутствии сопутствующего HBeAg) за исключением HBsAg-негативной (скрытой) формы течения заболевания [2].

Особый интерес (и наибольшие трудности) с точки зрения клинической лабораторной диагностики представляет собой пятая стадия развития ХВГВ – скрытый гепатит В (СкГВ). Консенсусной группой экспертов на совещании в г. Таормина (Испания) в 2008 г. дано следующее определение скрытому гепатиту В: это стадия ХВГВ, при которой в ткани печени выявляется ДНК ВГВ при неопределяемом уровне HBsAg в сыворотке периферической крови, вне зависимости от того, выявляется или нет ДНК ВГВ методом ПЦР в периферической крови [3].

В абсолютном большинстве случаев, при СкГВ вирус генетически не отличается от вируса, вызывающего HBsAg-позитивную форму ХГВ [4]. Таким образом, очевидно, что основную роль в иммунопатогенезе СкГВ играет не генетическая структура вируса, а эпигенетическое регулирование, опосредованное иммунным ответом организма. При этом следует отметить, что более часто встречается серопозитивный СкГВ, ассоциированный с образованием антител к основным белкам ВГВ (HBsAg IgG и HBs IgG против core- и S-антигенов, соответствен-

но), однако в 20% случаев обнаружение ДНК ВГВ в ткани печени не сопровождается обнаружением каких-либо маркеров инфицирования ВГВ [5, 6].

Генетическая эволюция ВГВ определяется двумя важными особенностями жизненного цикла вируса. Во-первых, высокая генетическая стабильность ВГВ достигается за счет чрезвычайно эффективного использования короткого генома. Наличие перекрывающихся рамок считывания, многочисленных регуляторных, репликативных и морфогенетических элементов, а также отсутствие некодирующих областей ограничивает формирование жизнеспособных мутаций ВГВ. Во-вторых, использование обратной транскриптазы без 3'→5'-корректирующей функции при репликации ВГВ определяет высокую частоту мутаций (более 2×10^{-5} замен оснований/сайт в год) [7, 8]. Контроль достигается за счет того, что только успешно транскрибируемые и обработанные геномы, т.е. частично двунитевые ДНК упаковываются в секретируемый вирусный капсид.

Репликация ВГВ протекает через стадию обратной транскрипции прегеномной РНК (пгРНК). Основной стадией этого процесса является связывание белка Р со шпилькой на 5'-конце пгРНК, которая функционально является сигналом энкапсидации (ε). Затем комплекс полимеразы-РНК упаковывается в капсидную оболочку. В этом процессе немаловажную роль играет клеточный шаперон Hsp90, который поддерживает идеальную для образования комплекса с ε конформацию полимеразы. Последовательность, содержащая ε, на пгРНК находится и на 5'- и на 3'-конце. Хотя для репликации необходима одна копия, функции второй неизвестны. Кроме энкапсидации пгРНК, ε активно участвует в инициации синтеза вирусной ДНК. Интересной особенностью этого процесса является то, что полимеразы выступают как затравка (остаток тирозина на N-конце полимеразы, является субстратом для образования фосфодиэфирной связи с 5'-концевым нуклеотидом минус-цепи ДНК).

Сначала производится короткий (3-4 нуклеотида) праймер, матрицей для синтеза которого является выпуклая область между стеблями шпильки. Затем комплекс полимеразы с праймером переносится к комплементарной области 3'-DR1. После этого праймер достраивается до полноразмерной минус-цепи ДНК и, благодаря РНКазной активности все того же белка Р, РНК-матрица деградирует. Остается лишь короткая последовательность на 5'-конце прРНК, размером 15-18 нуклеотидов (DR1), которая переносится к комплементарному участку DR2 для синтеза плюс-цепи ДНК. Рост плюс-цепи ДНК прекращается при достижении 5'-конца минус-цепи и синтез ведется с 3'-конца минус-цепи. Таким образом, образуется кольцевая частично двухцепочечная ДНК. Фактически ккзДНК собирается из линейной двухцепочечной ДНК, которая, в свою очередь, образуется при синтезе плюс-цепи ДНК от изначального местоположения праймера в 3'-конце минус-цепи (без переноса от DR1 к DR2). Этот процесс был назван иллегитимной репликацией. Линейная форма ДНК ВГВ также участвует в негомологичной рекомбинации с клеточной ДНК, в результате существуют различные формы интегрированной вирусной ДНК [9-11].

Развитие СкГВ обусловлено подавлением внутриядерной транскрипции субгеномных РНК ВГВ с матрицы кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК ВГВ (ккзДНК), способной становиться матрицей для субгеномных и пре-геномных копий РНК, на основе которых синтезируется вирусный геном и вирусные белки [12]. Причем подавление это может быть обусловлено целым рядом не до конца изученных факторов, в том числе генетическими особенностями самого вируса и/или его хозяина. При этом ккзДНК в ядре гепатоцита находится в виде минихромосомы, где НК связана с гистоновыми и гистоноподобными белками, а транскрипционная активность регулируется по эукариотическому механизму [13] и способна существовать долгое время. В большинстве случаев, репликация вируса и экспрессия генов могут быть подавлены настолько, что вирусная нагрузка в периферической крови больного крайне низка, вплоть до невозможности выявить ДНК ВГВ стандартными методами, но элиминации вируса при подавлении репликации не происходит. Сохранение ккзДНК в виде минихромосомы остается ключевым фактором, ответственным за невозможность полной элиминации вируса и за рецидивы вирусной репликации после прекращения противовирусной терапии [14, 15].

Значительным представляется тот факт, что даже после нескольких лет сероконверсии у реконвалесцентов острого гепатита В, сопровождающейся появлением «маркеров выздоровления» (HBsAg-, HBsIgG+, HBcorIgG+, HBcorIgM-, HBeAg-, HBeAg+, ДНК ВГВ-), методом проточной цитометрии определяется активный ответ CD4+ и CD8+-клеток против антигенов. Возможная причина этого феномена может заключаться в продолжающемся внутрипеченочном синтезе минимальных количеств антигенов ВГВ во время HBsAg-негативной стадии инфекции, которые невозможно определить современными методами лабораторной диагностики, но которых достаточно для поддержания ВГВ-специфического Т-клеточного ответа [16]. Кроме того по некоторым данным высокий уровень ккз ДНК в тканях печени являются фактором риска рецидива ВГВ, несмотря на профилактическую терапию [17].

Целью нашей работы являлся анализ метода количественного определения кольцевой ковалентно-замкнутой

ДНК ВГВ в функциональных биоптатах печени и оценка его значимости при идентификации HBsAg-негативного вирусного гепатита В.

Материал и методы. В работе были использованы образцы биопсийного материала ткани печени 128 больных, проживающих на территории Санкт-Петербурга, в различных регионах РФ, а также в Республике Узбекистан. В обследуемой группе были представлены 16 пациентов с первичным диагнозом «неактивное носительство HBsAg»; 18 пациентов с ХВГВ умеренной активности; 29 больных ХВГВ в фазе иммунного контроля; 26 больных ХВГВ в фазе реактивации; 17 пациентов с ХВГВ с выраженным фиброзом и циррозом печени; 6 пациентов с ХВГВ с сопутствующими инфекциями с выраженным фиброзом и циррозом печени, в том числе 4 пациента с ХВГВ + Д, в крови которых выявлена РНК ВГД и/или антитела к ВГД при отрицательной ДНК ВГВ и 2 пациента с коинфекцией ВГС + ВГВ с выявленными в крови антителами к ВГС и HBsAg; 16 пациентов с выраженным фиброзом и циррозом печени иной этиологии, в том числе 11 больных с первичным диагнозом ХВГС и 5 с гепатитом неясной этиологии.

Выявление кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК ВГВ проводили согласно методике Т. Pollicino Т. и соавт. [18] методом гнездовой ПЦР с использованием последовательно пар праймеров fp23/rp24 HBV и fp25b/rp26b HBV.

Для количественного анализа ккз ДНК ВГВ в биопсийном материале был разработан метод, основанный на ПЦР с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием TaqMan зондов для целевого фрагмента и для эндогенного референсного гена. При этом использовали следующий состав амплификационной смеси: 15 пМ каждого олигопраймера, 1,0 мМ каждого нуклеозидтрифосфата, 6,7 мМ MgCl₂, 1 ед. рекомбинантной Taq ДНК-полимеразы (Fermentas), буфер для Taq ДНК-полимеразы (750 мМ Трис-НСl, (рН 8,8), 200 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,1% (v/v) твин 20), глицерин и DMSO в количестве 5% и 10% от конечного объема, соответственно, 1 мкг матрицы, вода без нуклеаз до конечного объема 30 мкл.

Последовательности использованных олигонуклеотидов приведены в таблице.

Результаты и обсуждение. Хотя современные противовирусные препараты способны качественно подавлять репликацию ВГВ и способствовать снижению риска развития различных осложнений заболевания печени, ведутся активные поиски по разработке терапевтического курса, конечной целью которого будет полная элиминация ккз ДНК ВГВ для предотвращения возможной реактивации вируса [19].

В связи с вышесказанным введение в практическую лабораторную диагностику метода выявления и количественной оценки ккз ДНК ВГВ в функциональных биоптатах печени как способа идентификации заболевания и оценки репликации вируса имеет большое значение для обнаружения СкГВ и для определения стратегии лечения пациентов с ХВГВ.

Для количественной оценки ккз ДНК ВГВ в функциональных биоптатах печени был разработан метод, основанный на ПЦР с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ) на базе методики, предложенной Т. Pollicino с соавт. [18] для выявления ккз ДНК ВГВ.

Выделенную из образцов ДНК для удаления одноцепочечных НК и расщепления частично-кольцевой геномной ДНК ВГВ предварительно обрабатывали эн-

Нуклеотидные последовательности праймеров, использованные для анализа ккз ДНК ВГВ

Праймер	Нуклеотидная последовательность
fp23 HBV	5'-CTGAATCCTGCGGACGACCC-3'
rp24 HBV	5'-CCCAAGGCACAGCTTGGAGG-3'
fp25b HBV	5'-GTCTGTGCCTTCTCATCTGCC-3'
rp26b HBV	5'-AGAGATGATTAGGCAGAGGTG-3'
TaqManHBV	5'-ROX-TGTGCACTTCGCTTCACTCTGC-BHQ2-3'
fp GAPDH	5'-ATCTTCCAGGAGTGAGCGAG-3'
rp GAPDH	5'-GACTCCACGACGTACTCAGC-3'
TaqManGAPDH	5'-FAM-TCCAAAATCAAGTGGGGCGATG-BHQ1-3'
fp β-глобин	5'-GTGCATCTGACTCCTGAGGA-3'
rp β-глобин	5'-GCTTGTACAGTGCAGCTC-3'
TaqManβ-глобин	5'-FAM-AAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTGG-BHQ1-3'
fp β-актин	5'-ACTGTGCCCATCTACGAGG-3'
rp β-актин	5'-CAGGCAGCTCGTAGCTCTT-3'
TaqManβ-актин	5'-FAM-CGGGAAATCGTGCTGAC-BHQ1-3'

донуклеазой MungBean («Сибэнзим») из расчета 1 ед. фермента на 1 мкг ДНК, согласно протоколу производителя, после чего положительный сигнал регистрировался только от ккз ДНК ВГВ. В ходе работ использовали различные дополнительные компоненты «присадки» для амплификации, в том числе DMSO и глицерин, способствующие увеличению эффективности ПЦР и препятствующие образованию вторичных структур за счет стабилизации Taq ДНК-полимеразы и влияния на температуру отжига праймеров. Введение эмпирически подобранного количества DMSO и глицерина в амплификационную смесь привело к стабильной регистрации сигнала с парой праймеров fp25/rp26 HBV без предварительного этапа гнездовой ПЦР с внешними праймерами. Для оценки специфичности праймеров проводили прямое секвенирование соответствующих фрагментов. Для количественного анализа помимо данной пары праймеров использовали зонд TaqManHBV (см. таблицу). Уровень ккз ДНК ВГВ нормировали на количество ДНК референсного гена. В качестве референсных генов были опробованы β-глобин, β-актин и глициральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа (GAPDH). Для количественной стандартизации амплификации с олигонуклеотидами для ВГВ использовали образцы ДНК ВГВ, предварительно охарактеризованные с помощью набора «АмплиСенс HBV – Монитор – FRT» для количественной амплификации. Для количественной стандартизации амплификации с праймерами генов β-глобина, β-актина и GAPDH использовали предварительно количественно охарактеризованные лейкоцитарные взвеси, полученные из образцов периферической крови. Для каждого образца реакцию проводили в трех параллелях, далее усредняли значение St для них. Анализ результатов проводился по методу относительного подсчета (метод дельта Ct) с нормализацией по эндогенному референс гену. Несмотря на сходные после пересчета количественные результаты при использовании всех референсных генов, в основной работе было решено использовать в качестве эндогенного контроля β-глобин, для которого была показана лучшая эффективность реакции. Для оценки эффективности реакции для каждого гена делали серию разведений образца. Эффективность реакции автоматически рассчитывалась прибором. Во всех случаях при использовании олигонуклеотидов для целевого фрагмента и для β-глобина E=2, что подтверждает

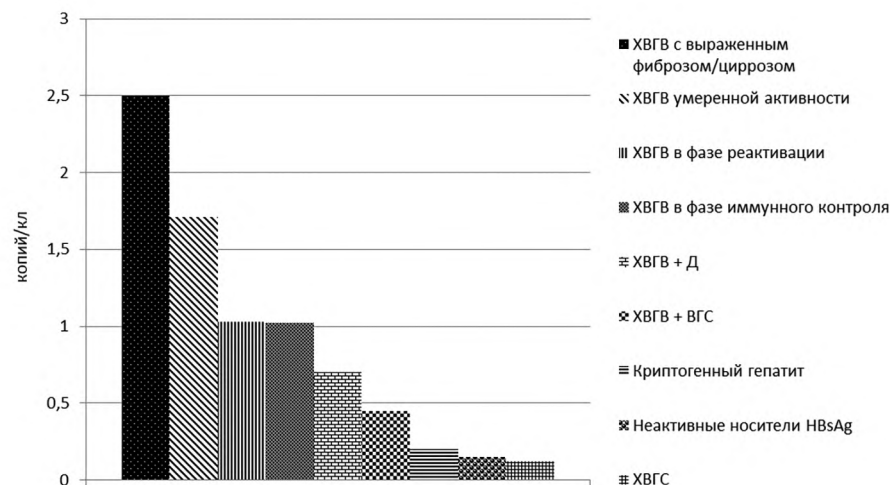
специфичность данных реакций без образования побочных продуктов или димеров праймеров. Отсутствие побочных продуктов также было подтверждено анализом кривых плавления для данных ПЦР продуктов. Подбор условий и выполнение исследования проводили на приборе CFX96 (Bio-Rad). Разработанный метод обладает высокой специфичностью и позволяет проводить количественную оценку ккз ДНК ВГВ в пункционных биоптатах печени.

При количественной оценке ккз ДНК ВГВ в ткани печени 18 больных ХВГВ умеренной активности с положительным результатом ПЦР ДНК ВГВ и 16 неактивных носителей HBsAg, содержание ккз ДНК ВГВ достоверно отличалось между группами ($p<0,034$) и в пересчете на 1 копию гена β-глобина у больных ХВГВ умеренной активности составило $1,71\pm 1,32$

копий/кл, а у неактивных носителей HBsAg $0,15\pm 0,14$ копий/кл. У пациентов с ХВГВ в фазах иммунного контроля и реактивации содержание ккз ДНК ВГВ составило $1,02\pm 0,01$ копий/клетку и $1,03\pm 0,03$ копий/клетку, соответственно, при этом достоверных отличий между фазами естественного течения ХВГВ не обнаружено ($p=0,72$). В группе больных с выраженным фиброзом и циррозом печени количество ккз ДНК ВГВ в ткани печени у пациентов с ХВГВ составило в среднем $2,5\pm 0,4$ копии/клетку, у пациентов с ХВГВ + Д в среднем $0,7\pm 0,25$ копий/клетку, у пациентов с коинфекцией ВГС + ВГВ $0,45\pm 0,07$ копий/клетку, у пациентов с предварительным диагнозом ХВГС в среднем $0,12\pm 0,04$ копий/клетку, у пациентов с криптогенным гепатитом $0,2\pm 0,05$ копии/клетку (см. рисунок).

При расчете t-критерия Стьюдента при сравнении средних величин показано значимое отличие между группой больных ХВГВ с выраженным фиброзом и циррозом печени со всеми группами пациентов, кроме группы из 18 больных ХВГВ умеренной активности. Значения t-критерия Стьюдента при сравнении с остальными группами составили соответственно: для пациентов с предварительным диагнозом ХВГС $t=5,92$ $p<0,05$ $f=19$, пациентов с криптогенным гепатитом $t=5,71$ $p<0,05$ $f=18$, с «неактивным носительством HBsAg» $t=5,55$ $p<0,05$ $f=29$, с коинфекциями ВГС + ВГВ $t=5,05$ $p<0,05$ $f=15$ и ХВГВ + Д $t=3,82$ $p<0,05$ $f=17$.

Среди пациентов, обследованных на уровень ккз ДНК ВГВ в печени, были выбраны четыре группы больных (пациенты с ХВГВ умеренной активности, больные с «неактивным носительством HBsAg», больные в ХВГВ в фазе иммунного контроля и фазе реактивации), у которых проводили количественную оценку HBsAg и ДНК ВГВ в периферической крови. У «неактивных носителей HBsAg» уровень HBsAg был, как и ожидалось, наиболее низким (940 ± 259 МЕ/мл, $p<0,05$), достоверно отличающимся от других групп по возрастной: ХВГВ умеренной активности, ХВГВ в фазе иммунного контроля и ХВГВ в фазе реактивации - 2559 ± 982 МЕ/мл, 6117 ± 2562 МЕ/мл, 35979 ± 6177 МЕ/мл, соответственно. При измерении вирусной нагрузки результаты были схожими – то есть 540 ± 230 МЕ/мл у больных ХВГВ умеренной активности, 4171 ± 2330 МЕ/мл у больных в фазе иммунного контроля и 1936190 ± 873741 МЕ/мл у больных в фазе реактивации. Вирусная нагрузка, состав-



Количественная оценка содержания кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК ВГВ в пункционных биоптатах печени.

вившая в среднем 540 ± 230 МЕ/мл у пациентов с ХВГВ умеренной активности при значительно более высоком уровне у больных с фиброзом и циррозом печени и при отсутствии ДНК ВГВ у неактивных носителей с низким уровнем HBsAg в крови, согласуется с данными, указывающими на тесную зависимость между уровнями HBsAg и ДНК HBV, предполагающую высокую виремию у пациентов с высоким уровнем HBsAg. Несмотря на очевидную тенденцию отражения различия в степени инфицированности гепатоцитов ВГВ в количественном содержании HBsAg и ДНК ВГВ в периферической крови, только для больных в фазе иммунного контроля показана прямая корреляция между количественным содержанием HBsAg в сыворотке крови и уровнем ккз ДНК ВГВ (количество копий на клетку) в ткани печени ($r=0,53$, $p=0,03$), а также репликативной активностью ДНК ВГВ ($r=0,79$, $p=0,0001$) [20].

Корреляция высоких уровней HBsAg и ДНК ВГВ на ранних стадиях ХВГВ, а также диссоциация после сероконверсии HBeAg, свидетельствует о различии элементов управления, отвечающих за репликацию ВГВ и за продукцию HBsAg. Следует отметить, что ранее были показаны различия между уровнем ккз ДНК ВГВ в клетках печени у больных в фазе иммунной толерантности и фазе иммунного клиренса [21], однако при низком содержании ккз ДНК ВГВ в клетках печени должен понижаться синтез специфических вирусных белков, что совпадает с полученными результатами по количественному определению HBsAg и соответствует данным из литературных источников. Отсутствие достоверной корреляции между уровнем ккз ДНК ВГВ в тканях печени и морфологическими характеристиками ХВГВ может быть связано с малым объемом выборки, тем не менее, значительно более высокий уровень содержания ккз ДНК ВГВ в гепатоцитах у больных с выраженным фиброзом и циррозом печени по сравнению с больными в фазах иммунного контроля и реактивации также может служить подтверждением значимости оценки репликативной активности в гепатоцитах для оценки развития патологий печени.

Для четырех изолятов (два HBsAg-положительных изолята из группы пациентов с ХВГВ с выраженным фиброзом/циррозом и группы с неактивным носитель-

ством HBsAg, а также два HBsAg-негативных из группы с криптогенным гепатитом и с диагнозом ХВГС) провели секвенирование полных геномов вируса. Все четыре изолята относились к ВГВ субгенотипа D2, при этом мы не выявили каких-либо мутаций вакцинного избегания, мутаций лекарственной устойчивости или иных, которые могли бы стать причиной низкой репликативной активности вируса. Нуклеотидные последовательности полных геномов данных изолятов ВГВ депонированы в международную базу данных GenBank под номерами MK956106-MK956109.

По всей видимости, полученные нами и другими исследователями данные означают, что на уровень ккз ДНК ВГВ существенное влияние оказывает не столько сам вирус в зависимости от его генетических особенностей, сколько различные факторы хозяина [22-24], а отсутствие корреляции соответствующих показателей у больных ХВГВ в фазе реактивации может являться следствием снижения иммунной резистентности [12]. Например, на активность репликации и регуляцию транскрипции ккз ДНК ВГВ могут оказывать различные факторы транскрипции, корепрессоры, коактиваторы, модифицирующие хроматин ферменты клетки хозяина, а также может влиять положение нуклеосом и модификация гистонов, связанных с минихромосомами, которые образуют молекулы ккз ДНК ВГВ в ядрах инфицированных гепатоцитов [25-27]. Так, сообщают об участии в биогенезе ккз ДНК ВГВ фактора репарации тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы-2 [28]. Еще одной причиной может быть такой эпигенетический фактор как метилирование. Недавние исследования показали, что три главных островка CpG, которые содержит ккз ДНК ВГВ подвергаются метилированию в различной степени: островок I CpG метилируется редко, метилирование островка II CpG уменьшает транскрипционную активность ккз ДНК, и в целом метилирование островков II и III связано с низкой вирусной нагрузкой [29-31].

Заключение. Метод количественной оценки кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК ВГВ в пункционных биоптатах печени позволяет идентифицировать HBsAg-негативную форму хронического вирусного гепатита В, а также отражает активность репликации вируса, что, в

свою очередь, дает возможность предполагать дальнейшее прогрессирование заболевания и оценивать эффективности антивирусной терапии.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-14, 16-19, 21-23, 25-30 см. REFERENCES)

6. Останкова Ю.В., Семенов А.В., Буркитбаев Ж.Л., Савчук Т.Н., Тотолян Арег А. Результаты генотипирования вируса гепатита В у HBsAg-негативных доноров крови в г. Астана, Казахстан. *Инфекция и иммунитет*. 2017; 7(4): 383-92.
15. Цинзерлинг В.А., Эсауленко Е.В., Карев В.Е., Бубочкин А.Б., Сухорук А.А., Шibaева Е.О. Клинико-морфологические сопоставления при оккультном гепатите В. *Архив патологии*. 2017; 79(6): 8-13.
20. Габдрахманов И.А., Семенов А.В., Останкова Ю.В., Козлов К.В., Жданов К.В., Гусев Д.А. и др. Взаимосвязи вирусологических и морфологических показателей в фазах иммунного контроля и реактивации у больных хроническим гепатитом В. *Журнал инфектологии*. 2015; 7(4): 37-43.
24. Бацких С.Н., Винницкая Е.В., Сбикина Е.С., Борунова Ж.В., Филиппов С.А., Сандлер Ю.Г. Латентная форма гепатита В у больной с циррозом печени и первичным билиарным холангитом. *Доктор.Ру*. 2018; 7 (151): 30-4.
31. Костюшев Д.С., Зуева А.П., Брезгин С.А., Липатников А.Д., Волчкова Е.В., Малеев В.В. и др. Роль днк-метилтрансфераз в жизненном цикле вируса гепатита В и патогенезе хронического гепатита В. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(1): 19-29.

REFERENCES

1. Global, regional, and national age–sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. *Lancet*. 2015; 385(9963): 117–71.
2. Gish R.G., Given B.D., Lai C.L., Locarnini S.A., Lau J.Y., Lewis D.L. Chronic hepatitis B: virology, natural history, current management and a glimpse at future opportunities. *Antiviral research*. 2015; 121: 47–58.
3. Raimondo G., Allain J. P., Brunetto M. R., Buendia M. A., Chen D. S., Colombo M. et al. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. *J. Hepatol*. 2008; 49: 652–7.
4. Pollicino T., Raffa G., Costantino L., Lisa A., Campello C., Squadrito G. et al. Molecular and functional analysis of occult hepatitis B virus isolates from patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2007; 45: 277–85.
5. Torbenson M., Thomas D.L. Occult hepatitis B. *Lancet Infect. Dis*. 2002; 2: 479–86.
6. Ostandkova Yu. V., Semenov A. V., Burkitbayev Z.K., Savchuk T. N., Totolian Areg A. Results of genotyping hepatitis virus B in HBsAg-negative blood donors in Astana, Kazakhstan. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2017; 7(4): 383–92. (in Russian)
7. Buti M., Rodriguez-Frias F., Jardi R., Esteban R. Hepatitis B virus genome variability and disease progression: the impact of pre-core mutants and HBV genotypes. *J. Clin. Virol*. 2005; 34(1): S79–S82.
8. Lin C.-L., Kao J.-H. Hepatitis B Virus Genotypes and Variants. Cold Spring Harb. *Perspect. Med*. 2015; 5(5): a021436–a021436.
9. Cullen B.R. Nuclear RNA export pathways. *Mol. Cell. Biol*. 2000; 20(12): 4181–7.
10. Huang Z.M., Yen T. S. Role of the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element in export of intronless transcripts. *Mol. Cell. Biol*. 1995; 15(7): 3864–9.
11. Smith G.J., Donello J. E., Lück R., Steger G., Hope T. J. The hepatitis B virus post-transcriptional regulatory element contains two conserved RNA stem-loops which are required for function. *Nucleic Acids Res*. 1998; 26(21): 4818–27.
12. Guo J.T., Guo H. Metabolism and function of hepatitis B virus cccDNA: Implications for the development of cccDNA-targeting antiviral therapeutics. *Antiviral research*. 2015; 122: 91–100.
13. Raffa G., Maimone S., Cargnel A., Santantonio T., Antonucci G., Massari M. et al. Analysis of occult hepatitis B virus infection in liver tissue of HIV patients with chronic hepatitis C. *AIDS*. 2007; 21: 2171–5.
14. Dandri M., Locarnini S. New insight in the pathobiology of hepatitis B virus infection. *Gut*. 2012; 61(1): i6–i17.
15. Tsinslerling V.A., Esaulenko E.V., Karev V.E., Bubochkin A.B., Sukhoruk A.A., Shibaeva E.O. Clinical and morphological correlations in occult hepatitis B. *Arkhiv patologii*. 2017; 79(6): 8–13. (in Russian)
16. Penna A., Artini M., Cavalli A., Levrero M., Bertolotti A., Pilli M. et al. Long-lasting memory T cell responses following self-limited acute hepatitis B. *J. Clin. Invest*. 1996; 98: 1185–94.
17. Song G.W., Ahn C.S., Lee S.G., Hwang S., Kim K.H., Moon D.B. et al. Correlation between risk of hepatitis B virus recurrence and tissue expression of covalently closed circular DNA in living donor liver transplant recipients treated with high-dose hepatitis B immunoglobulin. *Transplant Proc*. 2014; 46(10): 3548–53.
18. Pollicino T., Squadrito G., Cerenzia G., Cacciola I., Raffa G., Craxi A. et al. Hepatitis B virus maintains its pro-oncogenic properties in the case of occult HBV infection. *Gastroenterology*. 2004; 126(1): 102–10.
19. Gane E.J. Future anti-HBV strategies. *Liver Int*. 2017; 37 (Sup.1): 40–4.
20. Gabdrakhmanov I.A., Semenov A.V., Ostandkova Y.V., Kozlov K.V., Zhdanov K.V., Gusev D.A., Sukachev V.S., Shakhmanov D.M., Zhabrov S.S., Peremyshlenko A.S., Bulankov Y.I., Ivanov A.M., Totolian A.A. Virological and morphological relationships in the phases of the immune control and reactivation in patients with chronic hepatitis B. *Zhurnal infekologii*. 2015; 7(4): 37–43. (in Russian)
21. Li W., Zhao J., Zou Z., Liu Y., Li B., Sun Y. et al. Analysis of hepatitis B virus intrahepatic covalently closed circular DNA and serum viral markers in treatment-naïve patients with acute and chronic HBV infection. *PLoS One*. 2014; 9(2): e89046.
22. Levrero M., Pollicino T., Petersen J., Belloni L., Raimondo G., Dandri M. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *J. Hepatol*. 2009; 51: 581–92.
23. Wang Q., Fiel M.I., Luan W., Blank S., Kadri H., Kim K.W. et al. Impact of intrahepatic hepatitis B DNA and covalently closed circular DNA on survival after hepatectomy in HBV-associated hepatocellular carcinoma patients. *Ann. Surg. Oncol*. 2013; 20(12): 3761–70.
24. Batskikh S. N., Vinnitskaya E. V., Sbikina E. S., Borunova Zh. V., Filippov S. A., Sandler Y. G. Occult Hepatitis B in patients with hepatic cirrhosis and primary biliary cholangitis. *Doctor.Ru*. 2018; 7 (151): 30–4. (in Russian)
25. Liu F., Campagna M., Qi Y., Zhao X., Guo F., Xu C. et al. Alpha-interferon suppresses hepadnavirus transcription by altering epigenetic modification of cccDNA minichromosomes. *PLoS pathogens*. 2013; 9(9): 3613.
26. Pollicino T., Belloni L., Raffa G., Pediconi N., Squadrito G., Raimondo G. et al. Hepatitis B virus replication is regulated by the acetylation status of hepatitis B virus cccDNA-bound H3 and H4 histones. *Gastroenterology*. 2006; 130(3): 823–37.
27. Shi L., Li S., Shen F., Li H., Qian S., Lee D.H. et al. Characterization of nucleosome positioning in hepadnaviral covalently closed circular DNA minichromosomes. *Journal of virology*. 2012; 86(18): 10059–69.
28. Königer C., Wingert I., Marsmann M., Rösler C., Beck J., Nassal M. Involvement of the host DNA-repair enzyme TDP2 in formation of the covalently closed circular DNA persistence reservoir of hepatitis B viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014; 111(40): E4244–53.
29. Kim J.W., Lee S.H., Park Y.S., Hwang J.H., Jeong S.H., Kim N. et al. Replicative activity of hepatitis B virus is negatively associated with methylation of covalently closed circular DNA in advanced hepatitis B virus infection. *Intervirology*. 2011; 54(6): 316–25.
30. Zhang Y., Li C., Zhang Y., Zhu H., Kang Y., Liu H. et al. Comparative analysis of CpG islands among BFB genotypes. *PLoS one*. 2013; 8(2): 56711.
31. Kostyushev D. S., Zueva A.P., Brezgin S.A., Lipatnikov A.D., Volchkova E.V., Maleyev V.V., Chulanov V.P. The role of DNA-methyltransferases in the life cycle of hepatitis B virus and pathogenesis of chronic hepatitis B. *Voprosy virusologii*. 2018; 63(1): 19–29. (in Russian)

Поступила 25.05.19

Принята к печати 25.06.19

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Терновой В.А.¹, Кононова Ю.В.¹, Зайковская А.В.¹, Чуб Е.В.¹, Волынкина А.С.², Микрюкова Т.П.¹, Котенев Е.С.²,
Пьянков О.В.¹, Семенцова А.О.¹, Локтев В.Б.¹

РАЗРАБОТКА И ОЦЕНКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ РНК ВИРУСА КРЫМСКОЙ-КОНГО ГЕМОМРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ МЕТОДОМ ПЕТЛЕВОЙ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ С ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИЕЙ

¹ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559,
Новосибирская обл., пгт. Кольцово, Россия;

²ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, 355035, г.
Ставрополь, Россия

В настоящей работе представлены результаты лабораторных испытаний набора реагентов для быстрого обнаружения РНК вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ) методом петлевой изотермической амплификации с обратной транскрипцией (reverse transcription, loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP). Разработанный набор реагентов RT-LAMP был использован для идентификации вируса ККГЛ и показал чувствительность 10^3 ГЭ/мл вирусной РНК, что достаточно для ранней диагностики ККГЛ в начальном периоде заболевания. Набор показал высокую специфичность и отсутствие перекрестной реактивности при тестировании с панелями вирусов из Государственной коллекции вирусов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (арбовирусами и возбудителями вирусных геморрагических лихорадок). Лабораторные испытания показали высокую аналитическую и диагностическую чувствительность, специфичность набора RT-LAMP для обнаружения РНК вируса ККГЛ, высокую скорость постановки анализа (60-70 мин с учетом пробоподготовки) в сравнении с ПЦР в реальном времени. Апробация полевого варианта набора показала возможность постановки реакции RT-LAMP и учёта результатов анализа без использования сложного оборудования.

Ключевые слова: Крымская-Конго геморрагическая лихорадка; петлевая изотермическая амплификация; молекулярная диагностика; мобильная лаборатория.

Для цитирования: Терновой В.А., Кононова Ю.В., Зайковская А.В., Чуб Е.В., Волынкина А.С., Микрюкова Т.П., Котенев Е.С., Пьянков О.В., Семенцова А.О., Локтев В.Б. Разработка и оценка набора реагентов для обнаружения РНК вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки методом петлевой изотермической амплификации с обратной транскрипцией. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (9): 571-577

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-9-571-577>

Ternovoi V.A.¹, Kononova Yu.V.¹, Zaykovskaya A.V.¹, Chub E.V.¹, Volynkina A.S.², Mikryukova T.P.¹, Kotenev E.S.², Pyankov O.V.¹, Sementsova A.O.¹, Loktev V.B.¹

DEVELOPMENT AND ASSESSMENT OF A REAGENT KIT FOR RNA DETECTION OF CRIMEAN-CONGO HEMORRHAGIC FEVER VIRUS WITH USING REVERSE TRANSCRIPTION LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION METHOD

¹FBRI State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Rospotrebnadzor, 630559, Novosibirsk region, Koltsovo, Russian Federation;

²FKUZ Stavropol Antiplague Scientific Research Institute, Rospotrebnadzor, 355035, Stavropol, Russian Federation

This study presents the results of laboratory trials of the reagent kit for the rapid detection of RNA of the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV) using loop-mediated isothermal amplification with reverse transcription (RT-LAMP). The developed RT-LAMP reagent kit was used to detect the CCHFV and showed a sensitivity of 10^3 GE/ml of viral RNA, which is sufficient for detection of the CCHFV in the early stage of human infections. The kit showed high specificity and no cross-reactivity with viral panel from the State collection of viruses of the FBRI SRC VB «Vector» (arboviruses and hemorrhagic fever viruses). Laboratory trials of the RT-LAMP kit are showed a high analytical and diagnostic sensitivity and specificity for RNA detection of the CCHFV and high speed of the analysis (60-70 min with sample preparation) compared to real-time PCR. Approbation of the kit field version has showed the possibility of setting the RT-LAMP reaction and viral RNA detection without the using of analytical equipments.

Key words: Crimean-Congo hemorrhagic fever; loop-mediated isothermal amplification; molecular diagnostics; mobile laboratory.

For citation: Ternovoi V.A., Kononova Yu.V., Zaykovskaya A.V., Chub E.V., Volynkina A.S., Mikryukova T.P., Kotenev E.S., Pyankov O.V., Sementsova A.O., Loktev V.B. Development and assessment of a reagent kit for RNA detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus with using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (9): 571-577. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-9-571-577>

For correspondence: Ternovoi V.A., PhD., Head of Laboratory for Molecular Epidemiology of Particularly Dangerous Infections, Department for Molecular Virology of Flaviviruses and Viral Hepatitis; e-mail: tern@vector.nsc.ru

Information about authors:

Ternovoi V.A., <http://orcid.org/0000-0003-1275-171X>

Mikryukova T.P., <http://orcid.org/0000-0003-4350-4260>

Kononova Yu.V., <http://orcid.org/0000-0002-3677-3668>

Kotenev E.S., <https://orcid.org/0000-0002-8036-8926>

Для корреспонденции: Терновой Владимир Александрович, канд. биол. наук, зав. лаб. мол. эпидемиологии особо опасных инфекций отд. мол. вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов; e-mail: tern@vector.nsc.ru

Zaykovskaya A.V., <https://orcid.org/0000-0002-0450-5212>
Chub E.V., <http://orcid.org/0000-0003-1521-897X>
Sementsova A.O., <https://orcid.org/0000-0002-7188-5948>

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Conflict of interests. *The authors declare absence of conflict of interests.*

Pyankov O.V., <https://orcid.org/0000-0003-3340-8750>
Volynkina A.S., <https://orcid.org/0000-0001-5554-5882>
Loktev V.B., <http://orcid.org/0000-0002-0229-321X>

Received 05.07.2019
Accepted 26.08.2019

Введение. Крымская-Конго геморрагическая лихорадка (ККГЛ, 1D49 по МКБ 11) – зоонозное природно-очаговое заболевание человека, вызываемое вирусом Крымской-Конго геморрагической лихорадки (Crimean-Congo hemorrhagic fever orthonaviruses, род *Orthonairovirus*, семейство *Nairoviridae*, порядок *Bunyavirales*). Вирус ККГЛ широко распространен в Азии, Африке, Ближнем Востоке и на юге Европы [1], в РФ природные очаги ККГЛ зарегистрированы на территории Южного и Северо-Кавказского федеральных округов [2]. Вирус передается человеку при присасывании клеща, при контакте с насосавшимися клещами, кровью и тканями инфицированных животных, а также при контакте с кровью и выделениями больных людей, что приводит к возникновению внутрисемейных и внутрибольничных вспышек ККГЛ. Течение ККГЛ у человека включает инкубационный период (1-13 дней), пре-геморрагическую (1-7 дней) и геморрагическую фазы (2-3 дня), период выздоровления (15-20 дней). В тяжелых случаях уровень летальности составляет 5-50% [1, 3, 4]. При этом выделение вируса происходит, в большинстве случаев, в течение 5 дней от начала болезни, при появлении симптомов, характерных для многих инфекционных заболеваний вирусной, бактериальной или паразитарной этиологии, что снижает настороженность при ранней постановке диагноза ККГЛ, особенно при отсутствии в анамнезе заболевшего присасывания клеща или контакта с установленным больным. Как следствие, невозможность в ряде случаев быстро и надежно диагностировать ККГЛ, особенно в первую неделю болезни, способствует вторичному заражению родственников больного или медицинского персонала независимо от уровня медицинского учреждения [5, 6].

С учётом особенностей течения ККГЛ, тяжести заболевания, способности вируса передаваться от человека к человеку, а также отсутствия в настоящее время средств специфической профилактики и лечения, особенно актуальной является ранняя диагностика маркеров вируса ККГЛ. К наиболее чувствительным и специфичным в настоящее время относятся молекулярно-генетические методы детекции вирусной РНК в разных видах клинических образцов. Существующие на сегодняшний день диагностические наборы для обнаружения РНК вируса ККГЛ методом ПЦР в реальном времени (Real-time PCR) позволяют выявлять вирусную РНК в малых количествах (~10 копий РНК в мл) [7], в том числе различных генотипов вируса. С использованием этого метода можно количественно определять вирусную нагрузку в организме больного с целью оценки эффективности лечения и прогноза заболевания [8]. Однако использование этого метода диагностики возможно в специально оборудованных лабораториях персоналом с соответствующей квалификацией, что в ряде случаев недоступно медицинским учреждениям в сельских и отдалённых районах.

Одним из современных методов обнаружения генетического материала различных микроорганизмов является петлевая изотермическая амплификация (Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)), впервые предложенная Т. Notomi с соавт. [9] и широко используемая в настоящее время для идентификации различных патогенов бактериального, вирусного, грибкового и паразитарного происхождения [10]. Метод LAMP характеризуется высокой чувствительностью, быстротой проведения анализа (менее 60 мин) и не требует сложного оборудования, что позволяет использовать его в полевых условиях. В отличие от ПЦР в реальном времени, метод LAMP менее чувствителен к загрязнениям, что снижает требования к пробоподготовке образцов, а также позволяет проводить стадию обратной транскрипции в одной пробирке с последующей амплификацией (вариант RT-LAMP) и визуализацией продуктов реакции. При высокой концентрации в образце вирусной РНК её можно выявлять без предварительной экстракции, как было показано Lamb с соавт. на примере детекции РНК вируса Зика методом RT-LAMP в образцах мочи от больных людей и инфицированных комарах [11], что невозможно при диагностике методом ПЦР в реальном времени. Это может быть особенно актуально при проведении быстрой диагностики во время вспышек и эпидемий, вызванных вирусами 1-2 групп патогенности, большинство из которых имеют РНК-геном.

В Российской Федерации в настоящее время метод LAMP рассматривается, главным образом, применительно для диагностики бактериальных патогенов [12, 13]. Что касается диагностики вирусных инфекций, имеется сообщение об использовании метода LAMP для диагностики вируса мешотчатого расплода пчел (*Picornavirales*, *Ifnaviridae*, *Ifnavirus*) [14], однако в отношении вирусов, патогенных для человека, использование этого метода описано не было.

Целью настоящей работы было создание и лабораторные испытания набора реагентов для выявления РНК вируса ККГЛ методом петлевой изотермической амплификации с обратной транскрипцией (RT-LAMP).

Материал и методы. Образцы сывороток крови 6 больных с диагнозом «Крымская геморрагическая лихорадка», зарегистрированных в Ростовской области в эпидсезон 2016 г. были предоставлены Референс-центром по мониторингу за ГЛЛ на базе ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Пробы сывороток крови отобраны на 1-6 день от начала заболевания. Разрешения на использование сывороток для исследовательских целей были выданы этическими комитетами при медицинских учреждениях, где пациенты проходили лечение. Образцы сывороток крови хранились при температуре -70°C до исследования. Наличие РНК вируса ККГЛ в сыворотках подтверждали при исследовании методом ПЦР с использованием набора реагентов для выявления

```

                                F3                                F1c
1021 CCTTCCCAAC TATCTCACAG TTCCTTTTCG AACTGGGGAA GCAACCGAGG GGGACCAAGA
                                F2
1081 AAATGAAAAA GGCACCTCCTG AGCACTCCAA TGAAGTGGGG GAAGAAACTT TATGAGCTCT
                                B2                                B1c
1141 TTGCTGATGA CTCTTTCCAG CAAAACAGAA TCTACATGCA CCCTGCTGTG TTGACAGCTG
                                B3
1201 GCAGAATCAG TGAAATGGGT GTCTGCTTTG GAACAATCCC TGTGCAAT CCTGATGACG

```

Рис. 1. Схематическое изображение участка S-сегмента генома вируса ККГЛ с расположением праймеров F3 и B3 (выделены серым цветом), FIP (F1c-F2) и BIP (B2-B1c) (подчеркнуты и выделены жирным шрифтом). В качестве прототипа использована последовательность фрагмента S-сегмента генома вируса ККГЛ (изолят CCHF/Russia/Kalmykia/Shch_1/2016, KY982868).

РНК вируса ККГЛ «АмплиСенс® CCHFV-FL» (ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия), а также секвенированием участка кодирующей области S-сегмента генома вируса (538 н.о.), с определением принадлежности вируса к генотипу Европа-1, подгруппам Va – Ставрополь-Ростов-Астрахань и Vb – Волгоград-Ростов-Ставрополь [2].

Праймеры для выявления РНК вируса ККГЛ методом RT-LAMP были рассчитаны для участка S-сегмента вирусного генома на основании выровненных доступных в GenBank нуклеотидных последовательностей изолятов вируса ККГЛ с использованием программного обеспечения MEGA7 и Lasergene 8. Был проведен дизайн четырех праймеров, включающий два внешних (F3 и B3) и два внутренних (FIP и BIP), как показано на рис. 1.

В качестве положительного контрольного образца (ПКО) использовалась плаزمиды, содержащая целевой участок S-сегмента генома вируса ККГЛ. Нарботку вируса ККГЛ проводили на культуре клеток SW-13 (Коллекция культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора) путем последовательных пассажей клинического материала от больного (цельная кровь, CCHF/Russia/Kalmykia/Shch_1/2016), предоставленного В.Г. Дедковым [15]. Культивирование проводили с использованием среды Игла MEM (Gibco, США) с добавлением 2% эмбриональной сыворотки KPC (Gibco, США) и антибиотиков Anti-Anti (Gibco, США) в течение 14 суток при 37°C. Наличие РНК вируса ККГЛ в культуральной жидкости определяли методом ПЦР в реальном времени с использованием набора «АмплиСенс® CCHFV-FL» (ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). После третьего пассажа из вирусосодержащей культуральной жидкости проводили экстракцию РНК с использованием набора Рибо-Преп (ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия), реакцию обратной транскрипции (Реверта-Л, ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия), и далее проводили амплификацию целевого фрагмента S-сегмента вирусного генома. Полученный фрагмент очищали с использованием набора для элюции ДНК из агарозного геля (БиоСилика, Россия), клонировали с использованием набора pCR-2.1 (Invitrogen, США) с последующей наработкой рекомбинантной плазмиды в *E. coli* (штамм TOP10, Invitrogen, США). Концентрацию ДНК определяли на спектрофлуориметре Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, США).

Для определения аналитической чувствительности реакцию LAMP проводили с серией 10-кратных разве-

дений ПКО, в конечном объеме 15 мкл, содержащем реакционный буфер 40 мМ Трис-НСl, 20 мМ KCl, 16 мМ MgSO₄, 20 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,2% Tween 20, 0,6 М бетаин, 2,8 мМ каждого dNTP, смесь праймеров (по 10 пмоль F3 и L3, по 40 пмоль FIP и BIP) и 1 мкл ПКО. В реакционную смесь добавляли ДНК-полимеразу Bst 3.0 (New England BioLabs, Великобритания) в концентрации 6 единиц на реакцию. В качестве красителя использовали EvaGreen (Biotium, США). Образцы анализировали при 63°C в течение 40 мин на амплификаторе Genie II (OptiGene Limited, Великобритания), с детекцией результатов реакции по изменению интенсивности флуоресценции. Продукты LAMP также визуализировались путем электрофореза в 2% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием с использованием системы для фото-документации гелей (Universal Hood II, Bio-Rad, США).

Для сравнения аналитической чувствительности ПЦР и LAMP с теми же образцами ставили ПЦР с использованием набора HS-Screen (Евроген, Россия) с добавлением праймеров F3 и L3 (по 10 пмоль каждого) и 1 мкл ПКО, в присутствии красителя EvaGreen. Режим термоциклирования: 95°C – 5 мин, затем 95°C – 5 с, 52°C – 15 с, 72°C – 30 с (40 циклов); 72°C – 7 мин. Образцы анализировали на амплификаторе Real-time CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories, США).

Для определения аналитической специфичности и исключения перекрестной реактивности проводили проверку используемых праймеров в RT-LAMP с РНК вирусов из Государственной коллекции вирусов при ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора: а) арбовирусы – вирус Венесуэльского энцефалита лошадей (штамм ТС-83), вирус японского энцефалита (Пекин-1, Jagar), вирус клещевого энцефалита (Софьин, Абсеттаров, Глубинное 2004, 205), вирус желтой лихорадки (Кинтамп, 17D, Asibi), вирусы денге 1 и 2 типов (DENV-2/RUS/MX-Novosibirsk 01/2012, DENV-1/RUS/TH-Novosibirsk 02/2012), вирус Западного Нила (Eg-101, Волгоград 28889), вирус лихорадки долины Рифт (ZH-501, RVF-113/09-ПС); б) вирусы-возбудители геморрагических лихорадок – вирус Хантаан (Hantaan 76-188, Amur AP 94-415, FE HTN P-98-87), вирус Ласса (Джозия), вирус Мачупо (Карвалло, 208), эболавирус Заир (Заир 76 Mayinga), Марбургвирус (Porp). Экстракцию РНК из вирусосодержащей культуральной жидкости проводили с использованием набора Рибо-Преп (ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия), выделенную РНК хранили при -70°C до использования.

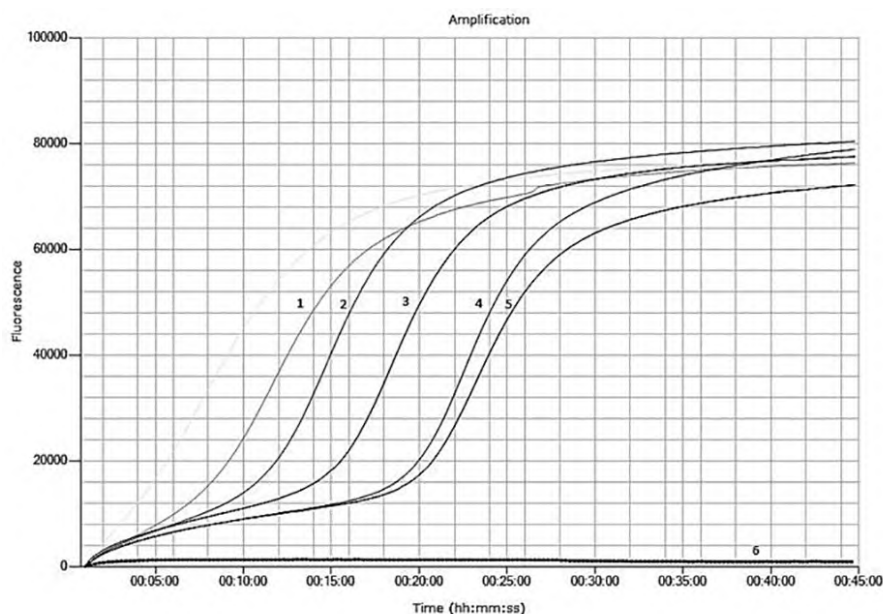


Рис. 2. Аналитическая чувствительность реакции LAMP с серийными 10-кратными разведениями ПКО. 1 – 10^7 ГЭ/мл, 2 – 10^6 ГЭ/мл, 3 – 10^5 ГЭ/мл, 4 – 10^4 ГЭ/мл, 5 – 10^3 ГЭ/мл, 6 – отрицательный контроль (вода).

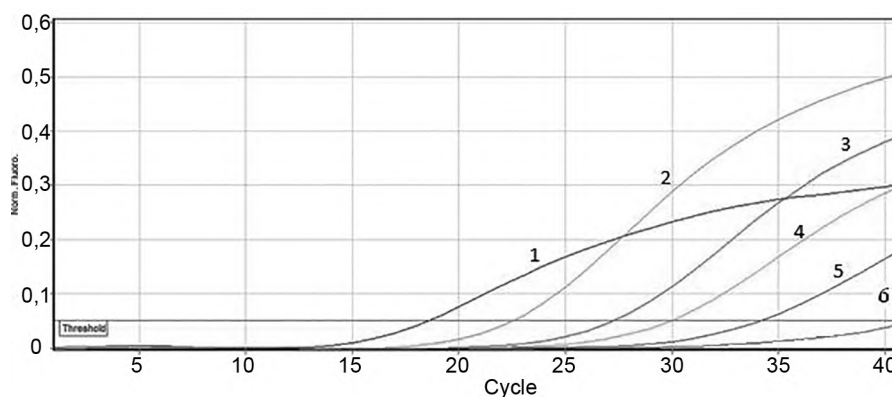


Рис. 3. Аналитическая чувствительность ПЦР в реальном времени с серийными 10-кратными разведениями ПКО. Нумерация кривых соответствует данным для рис. 2.

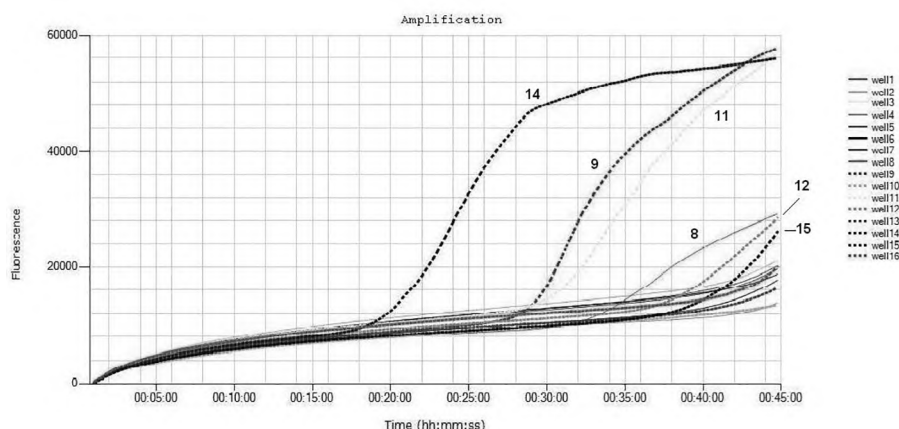


Рис. 4. RT-LAMP с клиническими образцами. №8, 9, 11, 12, 14, 15 – сыворотки больных с диагнозом ККГЛ; №1-7, 13, 16 – сыворотки здоровых доноров; №10 – вода.

Диагностическую чувствительность и специфичность набора реагентов определяли с использованием сывороток крови больных с диагнозом «Крымская геморрагическая лихорадка». В качестве отрицательного контроля использовались донорские человеческие сыворотки. Экстракцию РНК из сывороток проводили с использованием реактива GenePurgeDirect Sample Preparation Reagent (Nimagen, Нидерланды) согласно инструкции производителя. Количество суммарной РНК определяли с использованием спектрофлуориметра Qubit 2.0 и набора реагентов для количественного определения (Invitrogen, США). Выделенную РНК хранили при -70°C до использования. В реакционную смесь LAMP (как описано выше) добавляли 50 ед. фермента обратной транскриптазы (Invitrogen, США) и 1 мкл РНК, выделенной из сывороток крови. Конечный объем реакционной смеси RT-LAMP доводили до 15 мкл водой. RT-LAMP проводили на Genie II: 42°C – 15 мин (обратная транскрипция), 63°C – 40 мин (изотермическая амплификация) с детекцией результатов реакции по изменению интенсивности флуоресценции.

Для апробации полевого варианта набора реагентов проводили RT-LAMP в конечном объеме 50 мкл с добавлением красителя 0,2 ммоль HNB (Hydroxy Naphtol Blue, Fluka, США) согласно методике, описанной X.Wang с соавт. [16]. Реакцию проводили в твердотельном термостате Термит (ДНК-Технология, Россия) в температурно-временном режиме, описанном ранее. Учет результатов реакции проводили визуально, по изменению цвета реакционной смеси в видимом свете (розовая окраска – наличие РНК вируса ККГЛ, фиолетовая – отсутствие) и в ультрафиолетовом излучении с использованием системы для фотодокументации гелей.

Результаты. Аналитическая чувствительность. В результате реакции LAMP с серийными 10-кратными разведениями ПКО чувствительность метода составила 10^3 ГЭ/мл (геном-эквивалент/мл), что соответствует 10 копиям РНК вируса ККГЛ в исследуемом образце (объем до 10 мкл). Учет результатов проводился через 45 мин (рис. 2).

Для сравнения аналитической чувствительности метода LAMP с теми же образцами проводили ПЦР в реальном времени с использованием

ем праймеров F3 и B3, чувствительность при этом составила 10^4 ГЭ/мл (рис. 3), время проведения анализа составило около 2 ч.

Аналитическая специфичность. Постановка RT-LAMP с образцами РНК арбовирусов, вирусом возбудителей геморрагических лихорадок и интактных человеческих сывороток показала отсутствие перекрестной реактивности используемых праймеров с генетическим материалом этих вирусов и человеческой РНК.

Диагностическая чувствительность и специфичность. На рис. 4 представлены результаты RT-LAMP с клиническими образцами – сыворотками больных ККГЛ и сыворотками здоровых доноров (отрицательный контроль).

Как видно из рис. 4, в реакции RT-LAMP уже через 20-30 мин можно успешно регистрировать наличие вирусспецифической РНК у больных (сыворотки №8, 9, 11, 12, 14, 15). Специфичность продуктов реакции можно оценить по температуре плавления 86-89°C (рис. 5).

Электрофоретический анализ продуктов RT-LAMP сывороток больных ККГЛ показал наличие гетерогенных по длине фрагментов, что свидетельствует о протекании изотермической амплификации в реакционной смеси (рис. 6).

Апробация полевого варианта. Результаты RT-LAMP в полевом варианте представлены на рис. 7. Можно видеть, что интенсивность свечения продуктов реакции при ультрафиолетовом облучении для клинического образца, содержащего РНК вируса ККГЛ, сравнима с таковой для ПКО. При визуальном учёте результатов реакции окраска продуктов RT-LAMP в пробирках с вирусосодержащей сывороткой и ПКО была розовая, в остальных пробирках – светло-фиолетовая. Общее время анализа составило 55-60 минут.

Обсуждение. Согласно статистике Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), ежегодно в мире регистрируется 10-15 тыс. случаев заболевания ККГЛ и примерно 500 смертельных случаев [1]. Большая часть эндемичных по ККГЛ территорий приходится на бедные и развивающиеся страны с низким уровнем медицины (значительная часть эндемичных районов Африки и Центральной Азии) и страны с длительными вооруженными конфликтами (Афганистан, Ирак), где может отсутствовать достоверная статистика о заболеваемости ККГЛ и числе смертельных случаев, в связи с чем реальное число заболевших и умерших от ККГЛ может быть существенно выше. Существует также риск интродукции вируса ККГЛ за пределы эндемичных регионов при перемещении людей, сельскохозяйственных животных или инфицированных клещей [17]. Учитывая вышеперечисленные обстоятельства, а также особенности эпидемиологии и патогенеза ККГЛ, ранняя и быстрая диагностика возбудителя является одной из мер, препятствующих возникновению и распространению внутрисемейных и внутрибольничных вспышек этого заболевания.

Вирус ККГЛ характеризуется наибольшим среди арбовирусов генетическим разнообразием [18], что

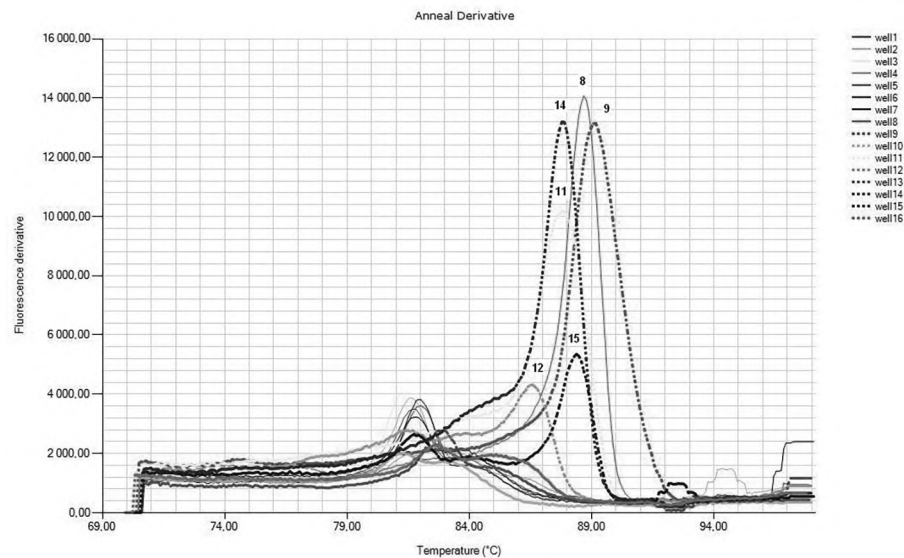


Рис. 5. Температура плавления продуктов RT-LAMP клинических образцов. Обозначение кривых соответствует данным для рисунка 4.

затрудняет разработку диагностических наборов на основе молекулярно-генетических методов. Наиболее предпочтительным для диагностики и генотипирования является S-сегмент генома вируса ККГЛ [3, 7], что было учтено при дизайне используемых в нашем наборе внешних (F3, B3) и внутренних (FIP, BIP) праймеров.

В настоящее время «золотым стандартом» среди методов диагностики ККГЛ у пациентов считается ПЦР в реальном времени [8], однако ее использование суще-

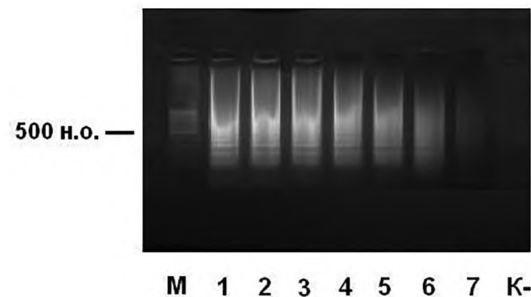


Рис. 6. Электрофорез продуктов RT-LAMP клинических образцов. Сыворотки больных ККГЛ: 1 - №14, 2 - 11, 3 - 9, 4 - 8, 5 - 15, 6 - 12; сыворотка здорового донора: 7 - №2; K- – вода; M – маркер длин фрагментов 100+ (Евроген, Россия).

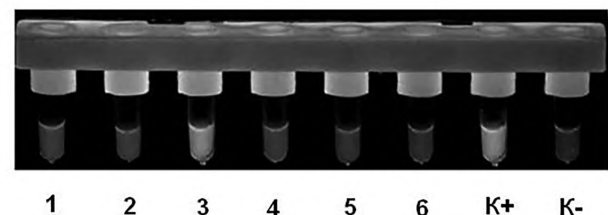


Рис. 7. RT-LAMP в полевом варианте. 1 – вирус денге 1 типа, 2 – вирус желтой лихорадки, 3 – сыворотка больного ККГЛ (№14), 4 – сыворотка здорового донора (№2), 5 – эболавирус Заир, 6 – Марбургвирус; K+ – ПКО; K- – вода.

ственно ограничивается техническими возможностями лаборатории. Впервые использование RT-LAMP для выявления РНК вируса ККГЛ в клиническом материале было описано Н.Осман с соавт. [19], при этом чувствительность метода была в 100 раз выше по сравнению с двухраундовой вложенной ПЦР. В нашем исследовании аналитическая чувствительность метода RT-LAMP составила 10^3 ГЭ/мл, при этом наблюдалась зависимость накопления флуоресцентного сигнала от концентрации ПКО (рис. 2), аналитическая чувствительность ПЦР в реальном времени при использовании тех же внешних праймеров F3 и B3 была на порядок ниже (рис. 3). Отсутствие перекрёстного взаимодействия используемых в наборе RT-LAMP праймеров с РНК арбовирусов и вирусов-возбудителей геморрагических лихорадок является подтверждением аналитической специфичности набора.

При анализе клинических образцов от больных ККГЛ методом RT-LAMP вирусная РНК обнаруживалась в количестве, соответствующем 10^3 - 10^2 ГЭ/мл (рис. 4, сыворотки №8, 12, 15), специфичность флуоресценции была подтверждена при определении температуры плавления (рис. 5) и электрофоретической детекцией продуктов реакции (рис. 6). Полученные результаты свидетельствуют о том, что разработанный набор реагентов для выявления РНК вируса ККГЛ методом RT-LAMP может быть использован как для ранней диагностики ККГЛ в начальном периоде заболевания, так и для подтверждения отсутствия вируса в организме в период выздоровления, исходя из чувствительности метода и значений вирусной нагрузки [7, 20]. Время анализа клинических образцов методом RT-LAMP составило 50 мин, при этом время выделения РНК с использованием реактива GenePurgeDirect Sample Preparation Reagent заняло 5-10 мин. Таким образом, общее время анализа методом RT-LAMP с учётом пробоподготовки в нашем исследовании было 60-70 мин, что позволяет уточнять диагноз ККГЛ при поступлении подозрительного больного в стационар вместе с проведением стандартных анализов и диагностических процедур.

Отдельным достоинством метода LAMP является возможность его использования в полевых условиях. Так, метод показал свою эффективность при анализе клинических образцов на базе мобильной лаборатории в отдалённых районах Гвинеи во время эпидемии болезни, вызываемой вирусом Эбола в 2013-2016 гг. [21]. Согласно результатам нашего исследования, анализ клинических образцов на наличие РНК вируса ККГЛ в полевых условиях можно проводить как на амплификаторе Genie II с учётом результатов по изменению сигнала флуоресценции, так и с постановкой реакции LAMP в микротермостате с визуальным учётом результатов анализа. Используемый в нашей работе экспресс-метод GenePurgeDirect Sample preparation Reagent позволяет проводить выделение РНК из малого объёма вирусосодержащего материала (2,5 мкл согласно инструкции производителя) без стадий экстракции и очистки, для которых необходимы вакуумный насос и центрифуга с охлаждением. Анализ клинического материала на амплификаторе Genie II возможен как при использовании для питания прибора источника переменного тока, так и при отсутствии энергоснабжения с использованием аккумулятора прибора. Таким образом, использование разработанного набора для выявления РНК вируса ККГЛ в клиническом материале методом RT-LAMP может быть альтернативой

широко применяемой для этих целей ПЦР в реальном времени, особенно при необходимости проведения экстренной диагностики в полевых условиях.

Выводы. Лабораторные испытания набора реагентов для выявления РНК вируса ККГЛ методом RT-LAMP показали, что аналитическая и диагностическая чувствительность составила 10^3 ГЭ/мл при 100% аналитической и диагностической специфичности. Скорость проведения анализа клинических образцов составила 60-70 мин с учётом пробоподготовки. Диагностическая чувствительность набора позволяет выявлять вирусную РНК у пациентов с ККГЛ в начальном периоде заболевания. Анализ клинических образцов от больных ККГЛ с использованием разработанного набора реагентов можно проводить как в стационарных лабораториях, оснащённых амплификаторами для ПЦР в реальном времени (программирование в режим термостата), так и на базе мобильных лабораторий с постановкой реакции в портативном амплификаторе Genie II или твердотельном микротермостате.

Финансирование. Исследование проводилось в рамках выполнения государственного задания Федеральной службы в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 3, 4, 6-11, 15-21 см. REFERENCES)

- Онищенко Г.Г., Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Василенко Н.Ф., Манин Е.А., Волынкина А.С., Прислегина Д.А., Семенко О.В.. Крымская геморрагическая лихорадка. Воронеж: Фаворит; 2018.
- Петрова И.Д., Кононова Ю.В., Чаусов Е.В., Шестопалов А.М., Тишкова Ф.Х. Генетические варианты вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, циркулировавшие в 2009 г. в эндемичных районах южного Таджикистана. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2013; 3: 29-36.
- Щит И.Ю., Игнатов К.Б., Кудрявцева Т.Ю., Шишкова Н.А., Миронова Р.И., Маринин Л.И. и др. Использование петлевой изотермической амплификации ДНК для выявления и идентификации сибиреязвенного микроба. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2017; 35(2): 69-76.
- Щит И.Ю., Игнатов К.Б., Бикетов С.Ф. Сравнительный анализ методов LAMP и ПЦР-РВ для обнаружения возбудителей сапа и мелниоза. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63(6): 378-84.
- Тронин А.В., Келин Л.В., Рябова А.А. Диагностика вируса мешотчатого расплода методом ПЦР в полевых условиях. *Пчеловодство*. 2018; 9: 26-8.

REFERENCES

- Introduction to Crimean-Congo Haemorrhagic Fever. Available at: <https://www.who.int/emergencies/diseases/crimean-congo-haemorrhagic-fever/introduction.pdf> (update 27.06.2019)
- Onishchenko G.G., Kulichenko A.N., Maletskaya O.V., Vasilenko N.F., Manin E.A., Volynkina A.S., Prisleghina D.A., Semenko O.V. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever [Krymskaya gemorragicheskaya likhoradka]. Voronezh: Favorit; 2018. (in Russian)
- Shayan S., Bokaeian M., Shahriar M.R., Chinikar S. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever. *Lab Med*. 2015; 46(3):180-9.
- Hawman D.W., Feldmann H. Recent advances in understanding Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *F1000Res*. 2018; 7. pii: F1000 Faculty Rev-1715. doi: 10.12688/f1000research.16189.1.
- Petrova I.D., Kononova Iu.V., Chausov E.V., Shestopalov A.M.,

- Tishkova F.Kh. Genetic variants of the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus circulating in endemic areas of the southern Tajikistan in 2009. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2013; (3):29-36. (in Russian)
6. Conger N.G., Paolino K.M., Osborn E.C., Rusnak J.M., Günther S., Pool J. et al. Health care response to CCHF in US soldier and nosocomial transmission to health care providers, Germany, 2009. *Emerg. Infect. Dis.* 2015; 21(1): 23-31.
 7. Wölfel R., Paweska J.T., Petersen N., Grobbelaar A.A., Leman P.A., Hewson R. et al. Virus detection and monitoring of viral load in Crimean-Congo hemorrhagic fever virus patients. *Emerg. Infect. Dis.* 2007; 13(7):1097-100.
 8. Papa A. Diagnostic approaches for Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2019; doi: 10.1080/14737159.2019.1615450.
 9. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000. 28(12):E63.
 10. Wong Y.P., Othman S., Lau Y.L., Radu S., Chee H.Y. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *J. Appl. Microbiol.* 2018; 124(3): 626-43.
 11. Lamb L.E., Bartolone S.N., Tree M.O., Conway M.J., Rossignol J., Smith C.P. et al. Rapid Detection of Zika Virus in Urine Samples and Infected Mosquitos by Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 3803.
 12. Shchit I.Yu., Ignatov K.B., Kudryavtseva T.Yu., Shishkova N.A., Mironova R.I., Marinin L.I. et al. Application of loop Mediated isothermal DNA Amplification to reveal and identify Bacillus Anthracis. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2017; 35(2): 69-76. (in Russian)
 13. Shchit I.Yu., Ignatov K.B., Biketov S.F. Comparative analysis of LAMP and Real Time PCR methods to detect pathogens of glanders and meliodosis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2018; 63(6): 378-84. (in Russian)
 14. Tronin A.V., Kelin L.V., Ryabova A.A. Diagnosis of sacbrood virus by PCR in field conditions. *Pchelovodstvo*. 2018; 9: 26-8. (in Russian)
 15. Dedkov V.G., Shchelkanov M.Y., Bushkueva B.T., Rudenko T.A., Kurdyukova O.V., Galkina I.V. et al. A neonatal death associated with Crimean-Congo hemorrhagic fever (Republic of Kalmykia, Russia, June 2016). *Antiviral Res.* 2017; 146:146-8.
 16. Wang X., Zhang Q., Zhang F., Ma F., Zheng W., Zhao Z. et al. Visual detection of the human metapneumovirus using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification with hydroxynaphthol blue dye. *Virol. J.* 2012; 9:138.
 17. Spengler J.R., Bergeron É., Spiropoulou C.F. Crimean-Congo hemorrhagic fever and expansion from endemic regions. *Curr. Opin. Virol.* 2019; 34:70-8.
 18. Bente D.A., Forrester N.L., Watts D.M., McAuley A.J., Whitehouse C.A., Bray M. Crimean-Congo hemorrhagic fever: history, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity. *Antiviral Res.* 2013; 100(1):159-89.
 19. Osman H.A., Eltom K.H., Musa N.O., Bilal N.M., Elbashir M.I., Aradaib I.E. Development and evaluation of loop-mediated isothermal amplification assay for detection of Crimean Congo hemorrhagic fever virus in Sudan. *J. Virol. Methods*. 2013; 190(1-2): 4-10.
 20. Hasanoglu I., Guner R., Carhan A., K. Tufan Z., Y. Caglayik D., Yilmaz G.R. et al. Dynamics of viral load in Crimean Congo hemorrhagic fever. *J. Med. Virol.* 2018; 90(4): 639-43.
 21. Kurosaki Y., Magassouba N., Bah H.A., Soropogui B., Doré A., Kourouma F. et al. Deployment of a Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Test for Ebola Virus Surveillance in Remote Areas in Guinea. *J. Infect Dis.* 2016; 214(suppl. 3):S229-S233.

Поступила 05.07.19
Принята к печати 26.08.19

ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

© СУРАНОВА Т.Г., СУВОРОВ Г.Н., 2019

Суранова Т.Г., Суворов Г.Н.

ХРАНЕНИЕ, ДОСТУП И ЗАЩИТА ДАННЫХ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ В РОССИИ И ЗАРУБЕЖНЫХ ГОСУДАРСТВАХ: ПРАКТИЧЕСКИЙ АСПЕКТ

ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», 125371, Москва, Россия

Актуальность избранной темы обусловлена необходимостью разрешения правовых проблем в области соблюдения прав и свобод человека и гражданина при осуществлении хранения, доступа и защиты данных полногеномного секвенирования. Цель настоящего исследования - формирование концептуальных критериев, на основе которых будет построена новая модель нормативно-правового регулирования этой сферы общественных отношений. Для реализации этой цели были решены задачи по исследованию нормативных правовых актов действующих в России и ряде зарубежных государств. Использованы общенаучные, частно-научные и специальные методы научного познания (системно-структурный, формально-юридический). Для формирования концептуальных критериев имеющих практическое значение хранения доступа и защиты данных полногеномного секвенирования в России и зарубежных странах предложено разработать уточняющие характеристики или градацию прав и свобод человека и гражданина в контексте реализации публичных государственных интересов. Также необходимо унифицировать содержание понятийного аппарата нормативных актов с учетом особенностей генетической информации, проработать порядок доступа к данным, предусмотреть систему ее деперсонализации. Авторами впервые обосновывается необходимость трансформации содержания декларированных государством прав человека на жизнь, свободу, личную и семейную тайну и других с развитием новых технологий в области ДНК сканирования. В качестве базовых критериев, имеющих практическое значение для хранения, доступа и защиты данных полногеномного секвенирования, указывается на необходимость совершенствования нормативных понятий, установления категорий лиц, имеющих право доступа к таким данным, нормативно закрепить условия соблюдения анонимного обследования, а также отказа знакомится с полученными результатами, разработать механизмы деперсонализации полученной генетической информации).

Ключевые слова: полногеномное секвенирование; хранение; защита и доступ к информации; персональные данные; правовое регулирование.

Для цитирования: Суранова Т.Г., Суворов Г.Н. Хранение, доступ и защита данных полногеномного секвенирования в России и зарубежных государствах: практический аспект. Клиническая и лабораторная диагностика. 2019; 64 (9): 578-584
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-9-578-584>

Suranova T.G., Suvorov G.N.

STORAGE, ACCESS AND PROTECTION OF FULL GENOME SEQUENCING DATA IN RUSSIA AND FOREIGN COUNTRIES: PRACTICAL ASPECT

Federal Research and Clinical Center of the Federal Medical-Biological Agency, 125371, Moscow, Russia

The relevance of the chosen topic is due to the need to resolve legal problems in the field of observance of human and civil rights and freedoms when storing, accessing and protecting full genome sequencing data. The purpose of this study is the formation of conceptual criteria on the basis of which a new model of regulatory regulation of this sphere of public relations will be built. To achieve this goal, the tasks of studying the regulatory legal acts in force in Russia and a number of foreign countries were solved. General scientific, private-scientific and special methods of scientific knowledge (system-structural, formal-legal) were used. In order to formulate conceptual criteria of practical importance for storing access and protecting genome-wide sequencing data in Russia and foreign countries, it was proposed to develop clarifying characteristics or gradation of human and civil rights and freedoms in the context of realization of public state interests. It is also necessary to unify the content of the conceptual apparatus of normative acts taking into account the peculiarities of genetic information, work out the procedure for accessing data, and provide for a system of its depersonification. For the first time, the authors substantiate the need to transform the content of the human rights declared by the state to life, freedom, personal and family secrets, and others with the development of new technologies in the field of DNA scanning. The basic criteria that are of practical importance for the storage, access and protection of genome-wide sequencing data indicate the need to improve normative concepts, establish categories of persons with the right to access such data, normatively fix the conditions for observing an anonymous survey, and also refuse to get acquainted with the results, to develop mechanisms for the depersonification of the obtained genetic information).

Key words: genome-wide sequencing; storage; protection and access to information; personal data; legal regulation.

For citation: Suranova T.G., Suvorov G.N. Storage, access and protection of full genome sequencing data in Russia and foreign countries: practical aspect. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (9): 578-584. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/09869-2084-2019-64-9-578-584>

For correspondence: Suranova T.G., Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Professor of the Department of Hygiene, Epidemiology and Infectious Diseases; e-mail: ipk6019086@yandex.ru

Information about authors:

Suranova T.G. <https://orcid.org/0000-0003-0768-8365>

Suvorov G.N. <https://orcid.org/0000-0001-8452-5522>

Acknowledgments. The reported study was funded by RFBR according to the research project № 18-29-14037.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 15.09.2019

Accepted 20.09.2019

Введение. Под секвенированием (от лат. sequentum – последовательность) в настоящее время понимают методику анализа, в результате которой можно определить порядок мономеров в полимере. Определяющим для трансформации их качественных характеристик является именно последовательность расположения мономеров. Под мономерами, в свою очередь, стали понимать (др. – греч. μόνος – один; μέρος – часть) низкомолекулярное вещество, образующее полимер в реакции полимеризации.

Автором этого ключевого открытия в области биологии является британский исследователь Ф. Сенгер [1], который в конце 40-х годов XX века доказал, что пропорции аминокислот в инсулине имеют строгую последовательность, а значит идентифицировать можно любую из них. Метод секвенирования макромолекулы ДНК был им опубликован в 1977 г. и с помощью него был прочитан геном человека.

На сегодняшний день наблюдается прогресс в разработке новых технологий высокопроизводительного секвенирования (например, технология Roche 454, технология Illumina, технология секвенирования с помощью лигирования ABI (Applied Biosystems) SOLiD (Sequencing by Oligonucleotide Ligation). Это свидетельствует о большой практической значимости полногеномных методов исследования, актуальности геномных исследований в целом [2], а их удешевление показывает, что в перспективе цена такого исследования может быть снижена до нуля [3]. Появление мощных компьютеров позволило оцифровать полученный массив информации, что привело к появлению на свет новой науки – биоинформатики [4].

Анализ полученных сведений пока сводится к сравнению отличий, выявляемых в процессе исследований здоровых людей и имеющих конкретное заболевание. С их помощью объясняются функции определенного участка генома при диагностировании конкретного заболевания. Очевидно, что чем больше пациентов с определенным заболеванием передаст свои данные для обработки, тем более точными и понятными для исследователей будут выглядеть диагностические маркеры и механизм мутации отдельных участков генома [5-7]. Однако при осуществлении такой деятельности необходимо помнить о соблюдении прав и свобод человека и гражданина отчертив границы того, какая информация, полученная с помощью ДНК сканирования, считается персональной, существует ли согласие пациента на такое исследование и не затрагивает ли оно права и интересы других лиц.

Кроме того, подлежит разрешению целый комплекс проблем, связанных с точностью полученных данных, способов их хранения обработки и защиты, стандартизацией имеющейся информации. Унификация необходима и для соединения баз данных в объединенные кластеры с целью конкретизации получаемой информации не только в рамках конкретного региона, но и в рамках страны, а также на межгосударственном уровне. Одновременно возникают вопросы, связанные с их хранением, так как в электронном виде геном одного человека эквивалентен ~ 1,5 Гб информации [8], что часто приводит к обширным потерям информации, а в ряде случаев

время, затрачиваемое на решение проблем с пространством хранения больше чем время, затрачиваемое на сбор и анализ данных [9].

С учетом изложенного цель настоящего исследования обусловлена необходимостью формирования концептуальных критериев, на основе которых будет построена эффективная и целесообразная модель нормативного правового регулирования процессов ее хранения, доступа и защиты в России с учетом зарубежного опыта.

Материал и методы. В качестве методической основы научных изысканий в сфере хранения, доступа и защиты данных полногеномного секвенирования были использованы общенаучные, частно-научные и специальные методы научного познания. С помощью системно-структурного и формально-юридического методов научного познания было осуществлено комплексное исследование международных нормативных правовых актов (Декларации прав и свобод человека и гражданина, Регламента № 2016/679 Европейского парламента и Совета Европейского Союза «О защите физических лиц при обработке персональных данных и о свободном обращении таких данных, а также об отмене Директивы 95/46/ЕС (Общий Регламент о защите персональных данных)». Среди нормативных правовых актов национального уровня особое внимание уделялось анализу базовых законов, регламентирующих порядок и условия обращения с персональными данными в России (О государственной геномной регистрации в Российской Федерации: Федеральный закон от 3 декабря 2008 г. № 242-ФЗ, О персональных данных: Федеральный закон от 27 июля 2006 г. № 152-ФЗ, О государственном регулировании в области геномно-инженерной деятельности: федеральный закон от 05 июля 1996 г. № 86-ФЗ), США, Германии, Австралии, Канаде. Исследование судебной практики осуществлялось с целью выявления проблемных аспектов при обращении с информацией, полученной в результате ДНК сканирования. Анализ механизмов защиты персональных данных осуществлялся с учетом опыта Австралии («Деидентификация и закон о конфиденциальности» 2018 г.), Германии (Gesetz zur Regelung der Gentechnik 2010 г.). Вопросы хранения генетической информации анализировались с учетом американского опыта криптографического кодирования и разделенного доступа к данным с использованием технологии блокчейна.

Необходимо указать и на аксиологический метод познания, ввиду того, что информация содержащая данные полногеномного секвенирования напрямую затрагивает права человека с этических и нравственных позиций. Сравнительный метод позволил обратить внимание на опыт, имеющийся в части защиты данных генетических исследований в зарубежных государствах с учетом имеющейся специфики, что определило его значимость с учетом имеющихся пробелов в механизме правового регулирования и для определения основных направлений для его совершенствования.

Результаты. 1. Практическое значение хранения доступа и защиты данных полногеномного секвенирования в России и зарубежных странах указывает на необходимость

уточнения общей парадигмы права и принципов, которые лежат в основе функционирования современного правового государства. Так как передача полученной генетической информации автоматически ущемляет права третьих лиц, то необходимо разработать уточняющие характеристики или градацию прав и свобод человека и гражданина в контексте реализации публичных государственных интересов. Необходимо трансформировать содержание таких декларативных установлений как право на жизнь, свободу и личную неприкосновенность с учетом новых качественных характеристик, которые вкладываются в это понятие ввиду новых открытий в области генома человека, осуществляемых с помощью технологии полногеномного секвенирования.

2. Отечественные нормативные акты, регулирующие хранение, доступ и защиту данных полногеномного секвенирования в Российской Федерации нуждается в переработке. В Федеральном законе от 27 июля 2006 г. № 152-ФЗ «О персональных данных» необходимо расширить понятие «персональные данные», под которыми предлагается понимать любую информацию, которая может быть получена, в том числе, и с помощью сканирования генома человека, не зависимо от того, может ли быть она ассоциирована с личностью конкретного человека или нет, а также правдива она или нет. К персональным данным следует также отнести генетические тесты членов семьи человека (до 4-го степени родства, включая усыновленных, но имеющих общего генетического предка); генетические тесты любого плода человека или члена семьи, проведенные в период беременности женщины; генетические тесты любого эмбриона, законно проведенного человеком или семьей, в том числе с использованием вспомогательных репродуктивных технологий; проявление заболевания или расстройства у членов семьи (семейный анамнез); любой запрос или получение генетических услуг, либо участие в клинических исследованиях, которое включает генетические услуги (генетическое тестирование, консультирование или обучение) человека или члена его семьи.

3. В целях защиты данных полногеномного секвенирования необходимо закрепить исчерпывающую категорию лиц, имеющих право доступа к данным, полученным с помощью технологии полногеномного секвенирования, разработать систему деперсонификации информации, которая предусматривала бы не только удаление или изменение идентификационных данных о лице, но и кодирование любой иной информации, которая потенциально могла быть использована для косвенного отождествления физического лица. Закрепить возможность анонимного генетического консультирования, а также отказа знакомится с результатами ДНК сканирования.

4. Для практической конкретизации доступа к генетическим данным нуждаются в детальной регламентации ситуации, при которых возможно использование данных, полученных с помощью полногеномного секвенирования (и какая именно их часть), без согласия лица, а какая с его письменного волеизъявления. Считаю необходимым внести соответствующие поправки в законодательство Российской Федерации об обороне, безопасности, противодействии терроризму, транспортной безопасности, противодействии коррупции, об оперативно-розыскной деятельности, о государственной службе, уголовно-исполнительном законодательстве Российской Федерации, законодательстве Российской Федерации о порядке выезда из Российской Федерации и въезда в Российскую Федерацию, о гражданстве Российской Федерации.

5. Для решения ресурсоемкой задачи в области хранения и доступа к информации, полученной с помощью полногеномного секвенирования, необходимо использовать большие вычислительные кластеры и облачные платформы хранения информации, которые должны быть образованы государством. Альтернативой этому подходу могут стать алгоритмы

хранения информации о сканировании ДНК с использованием вычислительных сетей построенных на технологиях блокчейна.

Обсуждение. Конституция Российской Федерации в ст. 23 закрепляет право каждого гражданина на неприкосновенность частной жизни, личную и семейную тайну¹. В соответствии с пп 3 ч. 1 ст. 1 Федерального закона от 3 декабря 2008 г. № 242-ФЗ «О государственной геномной регистрации в Российской Федерации» под геномной информацией понимаются персональные данные, включающие кодированную информацию об определенных фрагментах дезоксирибонуклеиновой кислоты физического лица или неопознанного трупа, не характеризующих их физиологические особенности². Как видим, законодатель отнес только определенную часть информации, получаемую с помощью геномного секвенирования ДНК человека к персональным данным, под которыми, в соответствии с п. 1 ч. 1 ст. 3 Федерального закона от 27 декабря 2006 г. № 152-ФЗ «О персональных данных» понимается любая информация, относящаяся к прямо или косвенно определенному, или определяемому физическому лицу (субъекту персональных данных)³. В соответствии с Федеральным законом от 5 июля 1996 г. № 86-ФЗ «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» под генной терапией (генотерапией) понимается совокупность генно-инженерных (биотехнологических) и медицинских методов, направленных на внесение изменений в генетический аппарат соматических клеток человека в целях лечения заболеваний⁴.

Анализ представленных определений позволяет указать на то, что в отечественной правовой системе в настоящий момент персональные данные понимаются в узком смысле. Субъектами персональных данных могут выступать только физические лица прямая или косвенная информация о которых позволяет их идентифицировать. Исследование юридической литературы в интересующем нас контексте показывает уязвимость предложенной конструкции, в части обсуждения условий, при которой получаемая информация о сканированном ДНК конкретного человека приобретает статус персональных данных [10]. С позиции буквального толкования к геномной следует отнести информацию, которая позволяет идентифицировать конкретное лицо. Речь идет о фамилии, имени и отчестве лица, дате его рождения, поле, возрасте, месте регистрации, государственных идентификационных данных (номере паспорта, СНИЛС, ИНН и других). Причем, с точки зрения правоприменительной практики суды не признают конфиденциальной информацию, содержащую отдельные сведения об ИНН⁵, СНИЛС⁶, серии и номере

¹Конституция Российской Федерации. Принята всенародным голосованием 12.12.1993 г. Собрание законодательства Российской Федерации от 4 августа 2014г. № 31. Ст. 4398.

²О государственной геномной регистрации в Российской Федерации: Федеральный закон от 3 декабря 2008 г. № 242-ФЗ. Собрание законодательства Российской Федерации от 8 декабря 2008 г. № 49. Ст. 5740.

³О персональных данных: федеральный закон от 27 июля 2006 г. № 152-ФЗ. Собрание законодательства Российской Федерации от 31 июля 2006 г. № 31 (Ч. 1). Ст. 3451.

⁴О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности: федеральный закон от 5 июля 1996 г. № 86-ФЗ. Собрание законодательства РФ от 8 июля 1996 г. № 28. Ст. 3348.

⁵Апелляционное определение Санкт-Петербургского городского суда от 3 февраля 2015 г. по делу № 2-3097/2014.

⁶Решение Белоглинского районного суда Краснодарского края от 22 июня 2014 г. по делу № 2-300/2014 № 2-300/2014.

⁷Определение Московского городского суда от 29 февраля 2012 № 33-6709.

паспорта⁷ поскольку этой информации недостаточно чтобы идентифицировать конкретное лицо. Получается, что если каким-либо образом результаты генетического исследования можно соотнести с фамилией, именем и отчеством конкретного субъекта, то это, в соответствии с действующим законодательством, считается персональными данными.

Однако информацию, которую можно отнести к персональным данным, следует рассматривать с более широких позиций. К таковой следует отнести любую информацию, которая позволяет выделить конкретные особенности определенного человека с учетом конкретных обстоятельств и взаимосвязанного контекста[10]. Так, при выявлении генетических мутаций (например, склонности к онкологическим заболеваниям) следует учитывать состояние здоровья человека, наличие или отсутствие конкретного заболевания, а также выявлены ли расстройства функций органов и систем организма⁸. С юридической точки зрения информация, полученная с помощью технологии полногеномного секвенирования, представляет собой лишь юридический факт об организме конкретного человека. И если явные признаки заболевания отсутствуют, то подобная информация не может определять состояние здоровья человека, но она критически важна для выявления генетического заболевания в будущем. Это касается не только обследуемого, но и его детей и родственников по боковым линиям. Дискуссионность вопроса о том, кто может распоряжаться такой информацией выражается в том, что если конкретное физическое лицо дает согласие на использование результатов исследования своего генома, то также он автоматически передает информацию и значимые сведения о геноме своих родителей и родственников. Это может иметь существенные последствия для очень широкого круга лиц, и даже безопасности государства. Например, если косвенно будут разглашены сведения о лицах, находящихся под защитой государства, занимающих ответственные государственные должности, носителях секретов различного уровня и так далее [11].

В большинстве зарубежных государств понятие «персональные данные» используется в широком смысле. Действующий на сегодняшний момент Регламент № 2016/679 Европейского парламента и Совета Европейского Союза «О защите физических лиц при обработке персональных данных и о свободном обращении таких данных, а также об отмене Директивы 95/46/ЕС (Общий Регламент о защите персональных данных)» в п. 35 указывает на то, что понятие персональных данных включает в себя всю информацию, которая касается состояния здоровья субъекта, в том числе о его прошлом, настоящем и будущем времени. Сюда следует отнести и индексированную информацию, полученную в ходе регистрации, либо оказании медицинских услуг физическому лицу, а также при исследовании тела, или телесного материала, включая генетические данные и биологические образцы. Сюда же относится информация о выявленном заболевании, либо инвалидности, возможном риске заболевания, анамнезе, госпитальном лечении, медико-биологическом либо физиологическом состоянии субъекта данных не зависимо от источника нахождения такой информации[12].

Наиболее обширные базы генетических данных на сегодняшний день созданы на государственном уровне в целях идентификации личности методом ДНК анализа. Так, в Германии под генетическим скринингом понимается генетический тест, который проводится для медицинских целей и затрагивает всё население или конкретные группы людей

во всем обществе и проводится без какой-либо необходимости для соответствующего субъекта данных в случаях, если есть основания полагать, что его генетическая информация может помочь расследованию[13]. В Канаде руководство для определения, какие сведения относятся к личным указывает на прямую информацию об определенном человеке или косвенную информацию, которая позволяет в разумных пределах идентифицировать его не зависимо от того: а) правдива эта информация или нет; б) записана ли эта информация на материальном носителе или нет[14]. Подобные определения признаются достаточно гибкими для того, чтобы охватить практику обработки информации в будущем времени с учетом темпов развития этой отрасли.

В США закон о запрете дискриминации на основе генетической информации 2008 г. под генетической информацией понимает: а) генетические тесты человека (включая генетические тесты, выполненные в рамках научного исследования); б) генетические тесты членов семьи человека (определяются как иждивенцы, в том числе до 4-го степени родства включая усыновленных, но имеющих общего генетического предка); в) генетические тесты любого плода человека или члена семьи, проведенные в период беременности женщины, и генетические тесты любого эмбриона, законно проведенного человеком или семьей, в том числе с использованием вспомогательных репродуктивных технологий; г) проявление заболевания или расстройства у членов семьи (семейный анамнез); д) любой запрос или получение генетических услуг или участие в клинических исследованиях, который включает генетические услуги (генетическое тестирование, консультирование или обучение) человека или члена его семьи [15].

Отметим что, по мнению отечественного законодателя геномная информация, подпадающая под юридическую защиту, не должна характеризовать физиологические особенности этого лица. Однако обладание такой информации и без персонификации ее конкретного владельца может стать инструментом для прямой или косвенной манипуляции над ним, следует указать на то, что отечественный закон каких-либо запретов или ограничений, связанных с дискриминацией граждан по признаку геномных различий, не содержит.

В качестве аналогии хотелось бы привести пример широко применяемых сегодня способов косвенной манипуляции лиц во всемирной сети «Интернет». Ни для кого не секрет, что каждый пользователь в интернете считается анонимным. Существует только IPадрес, по которому можно узнать только город или провайдера сети, однако на практике сохранить такую анонимность практически невозможно. По информации, оставленной в социальных сетях, на форумах по интересам, системы поиска по фотографии, истории поисковых запросов, интернет-сервисам для размещения объявлений о товарах, вакансиях и резюме на рынке труда, а также услугах от частных лиц и компаний, об используемом персональном компьютере, и даже по поведению и привычкам оператора (движения курсора, любимые разделы сайта и прочее) можно очень подробно охарактеризовать его личность не зная при этом его официальных идентификационных данных, что автоматически формирует не только контекстно ориентированную рекламу, но и может стать основанием для отказа в приеме на работу, индивидуализации размера страхового покрытия и иных способов дискриминации конкретного лица[16, 17]. Такие технологии получили название Big Data, а исследование, проведенное в 2016 г. в Стэнфордском университете, показало, что достаточно номера телефона абонента, времени и продолжительности звонка либо времени и количества символов в SMS сообщении для того, чтобы не только идентифицировать владельца, но и выявлять его политические и

⁸Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации: Федеральный закон от 21 ноября 2011 г. № 323-ФЗ. Собрание законодательства Российской Федерации от 28 ноября 2011 г. № 48. Ст. 6724.

религиозные взгляды, а также состояние его здоровья, половые пристрастия [18].

Таким образом, при наличии неперсонифицированной, абсолютно легальной, с точки зрения действующего российского законодательства, информационной базы генетических данных и массива информации, собранной по определенному алгоритму из данных, оставленных пользователями в сети, возможно ассоциировать ее с конкретным человеком. При этом совершенно не обязательно знать его имя, так как определяющими станут характеристики его генома и проявляющиеся социально-поведенческие и личностные особенности [19].

С учетом изложенного считаем, что хранение генетической информации должно осуществляться с соблюдением строгих правил конфиденциальности, которые исключали бы возможность доступа к ней посторонних лиц, что в свою очередь предусматривает нормативное закрепление исчерпывающих категорий лиц имеющих возможность такого доступа, а также ее обязательную деперсонификацию.

Кроме того, раз передача генетической информации об одном человеке автоматически нарушает права другого, то в ближайшем будущем необходимо будет не только нормативно запретить дискриминацию по этому критерию, но и пересмотреть содержание базовых принципов, которые лежат в основе общей парадигмы права. Речь идет об изменении, как на уровне международных документов, так и на уровне национальных конституций с акцентом на возможности реализации прав человека в контексте соблюдения общественных интересов.

Российский законодатель в ч. 1 статьи 11 Федерального закона от 27 июля 2006 г. № 152-ФЗ «О персональных данных» отдельно закрепил понятие биометрических персональных данных, под которыми следует понимать сведения, характеризующие физиологические и биологические особенности человека, на основании которых можно установить его личность (биометрические персональные данные). К таким данным помимо фотографии, видеоизображения, записи голоса, отпечатков пальцев, вполне можно отнести результаты ДНК сканирования конкретного лица.

В соответствии с ч. 2 статьи 11 Федерального закона от 27 июля 2006 г. № 152-ФЗ «О персональных данных» обработка биометрических персональных данных может осуществляться без согласия субъекта персональных данных в связи с реализацией международных договоров Российской Федерации о реадмиссии, осуществлением правосудия и исполнением судебных актов, проведением обязательной государственной дактилоскопической регистрации, а также в случаях, предусмотренных законодательством Российской Федерации об обороне, о безопасности, о противодействии терроризму, о транспортной безопасности, о противодействии коррупции, об оперативно-розыскной деятельности, о государственной службе, уголовно-исполнительном законодательстве Российской Федерации, законодательстве Российской Федерации о порядке выезда из Российской Федерации и въезда в Российскую Федерацию, о гражданстве Российской Федерации. В связи с этим, нуждается в конкретизации вопрос о том, в отношении какого круга субъектов, и в каких случаях возможно использовать данные ДНК сканирования без их согласия.

В соответствии со статьей 7 Федерального закона от 3 декабря 2008 г. № 242-ФЗ «О государственной геномной регистрации в Российской Федерации», обязательной государственной геномной регистрации подлежат: 1) лица, осужденные и отбывающие наказание в виде лишения свободы за совершение тяжких или особо тяжких преступлений, а также всех категорий преступлений против половой неприкосновенности и половой свободы личности; 2) неустановленные лица, биологический материал которых изъят в ходе производства след-

ственных действий. Обязательной государственной геномной регистрации подлежат неопознанные трупы. Отечественный законодатель принял эти нормативные дефиниции по аналогии с зарубежной практикой. Такие же базы данных созданы и активно пополняются в Германии и США.

Рассматриваемые нормативные предписания с точки зрения правовых последствий их реализации в отечественной и зарубежной юридической литературе находит как положительные, так и отрицательные отклики. К положительным следует отнести появившуюся возможность использовать генетические базы данных ДНК в борьбе с преступностью, что позволило пересмотреть те категории дел, по которым обвинительные приговоры были вынесены на основании показаний свидетелей без соответствующих экспертных подтверждений [20]. С отрицательной же стороны, нельзя исключить вероятность того, что следы, оставленные на месте преступления, будут фальсифицированы. В США долгое время считалось, что склонность к совершению преступлений обосновывается наличием специального гена (синдром ХУУ) [21, 22], а в настоящее время получает широкое развитие технология семейного соединения, позволяющая найти ДНК близких родственников подозреваемого в имеющейся базе. Думается, это может стать основанием для их дискриминации (например, родственников могут рассматривать как потенциальных преступников, или ограничивать их право на трудоустройство или получения визы для посещения страны), однако пока правоприменительная практика оправдывает подобную деятельность. Последние технологии в этой области позволяют моделировать фото преступника на основе ДНК, а также исследовать микробную часть имеющихся ДНК, которая позволяет выявить сопутствующие заболевания подозреваемого [23].

В вопросах учета и хранения геномной информации законодатель ограничился достаточно широкой формулировкой. Согласно п. 1 статьи 10 Федерального закона от 3 декабря 2008 г. № 242-ФЗ «О государственной геномной регистрации в Российской Федерации» условия получения, учета, хранения, использования, передачи и уничтожения биологического материала и обработки геномной информации при проведении государственной геномной регистрации должны исключать возможность их утраты, повреждения, искажения, несанкционированного доступа к ним и их передачи.

Отметим, что ряд современных государств на законодательном уровне разработали механизмы защиты персональных ДНК данных своих граждан. Так, представляет интерес юридически значимые принципы и правила, содержащиеся в «Деидентификации и законе о конфиденциальности», которые приняты в Австралии в 2018 году и направлены на выполнение компаниями требований закона «О конфиденциальности» 1988 года, а также для удовлетворения своих интересов и укрепления доверия к практике управления данными [30]. Согласно этому документу деидентификация состоит из двух этапов. На первом – удаляются или изменяются сами идентификационные данные о лице, на втором, соответственно, удалению подлежит либо иная информация, которая потенциально может быть использована для повторной идентификации физического лица, либо надлежит использовать соответствующие меры защиты информации, а также контроля доступа к данным для предотвращения удостоверения личности. Правила содержат обязательные требования по деидентификации информации для медицинских организаций, которые хотят поделиться информацией с другой медицинской исследовательской группой.

Представляет интерес опыт нормативного регулирования обращения с генетическими данными в Германии. Генно-инженерная деятельность, регламентирующая оборот генно-модифицированных объектов, не затрагивающих

ДНК человека, регулируется отдельным законом Gesetz zur Regelung der Gentechnik [24]. С 1 февраля 2010 г. вступил в действие закон, регламентирующий порядок проведения генетических исследований на людях, который содержит прямой запрет на дискриминацию любого человека или его родственника из-за его генетических характеристик, а также отказа от проведения генетического исследования самого по себе. Согласно указанному закону генетическая экспертиза или анализ может проводиться только при необходимости и только с письменного согласия лица, генетический материал которого подвергается исследованию. Такое согласие должно предусматривать и масштабы тестирования, а также в какой степени необходимо сообщать результаты такого тестирования или уничтожить его. Учреждение, которое уполномочено на проведение исследования, должно иметь вышеуказанное разрешение и человек в любое время может отказаться от его проведения путем письменного волеизъявления [25].

Следует отметить и проблему физического хранения информации и защиты от несанкционированного доступа, полученной с помощью полногеномного секвенирования. Современные исследования в этой области сводятся к двум основным проблемам: во-первых, необходимо обеспечить неприкосновенность частной жизни лиц, которым принадлежит биоматериал, во-вторых, необходимо очертить круг субъектов контролируемых массивов данных. В идеале поставщик биологического образца должен иметь возможность контролировать доступ напрямую, или косвенно через доверенных лиц. Однако на сегодняшний момент процедуры допуска к такой информации не отработаны и занимают много времени. Ряд американских компаний предлагает использовать для хранения результатов ДНК-сканирования технологию блокчейна, которая соединит различных участников системы потребления подобной информации. Генетические лаборатории, фармацевтические компании, генетические советы смогут осуществлять обмен информацией под контролем генетического смарт-контракта, предоставлять или потреблять генетические услуги и получать оплату или вознаграждения за такое участие. Эта технология позволяет обеспечить высокий уровень анонимности, контролировать и распоряжаться этими информационными данными [26].

Накопление генетических данных указывает на проблему хранения таких массивов информации. Так, для сканирования генома по технологии Illumina HiSeq X Ten 18 тыс. человек в год может потребоваться примерно 2 петабайт единиц информации, и использование децентрализованных распределенных баз данных сможет стать решением этой проблемы с помощью современных алгоритмов разделенного доступа к данным [27]. Решением проблемы обеспечения безопасности хранения и доступа данных ДНК сканирования в этом случае может стать система обязательного криптографического кодирования [28].

Заключение. Подводя итоги вышесказанному, следует отметить, что выявление концептуальных критериев имеющих практическое значение для хранения, доступа и защиты данных полногеномного секвенирования на сегодняшний момент предусматривает существенное уточнение принципов лежащих в общей парадигме права и государства. Трансформация содержания задекларированных государством прав человека на жизнь, свободу, личную и семейную тайну и других с развитием новых технологий в области ДНК сканирования приведут к формированию их нового смыслового содержания.

Для разрешения практических вопросов хранения и доступа и защиты данных полногеномного секвенирования в России и зарубежных странах следует унифицировать нормативный понятийный аппарат, установить категории лиц

имеющих право доступа к таким данным, нормативно закрепить условия соблюдения анонимного обследования, а также отказа знакомится с полученными результатами. Разработать механизмы деперсонализации генетической информации в целях более широкого использования таких результатов в образовательных и научных целях. Закрепить условия, при которых возможно использовать данные ДНК сканирования без согласия лица, которому они принадлежат, в том числе через механизм биометрических персональных данных, а также предусмотреть механизмы обеспечения хранения и защиты генетической информации за счет государства.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) в рамках научного проекта № 18-29-14037.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 4–9, 13–15, 18, 21–28 см. REFERENCES)

- Орлов Ю. Л. Компьютерное исследование регуляции транскрипции генов эукариот с помощью данных экспериментов секвенирования и иммунопреципитации хроматина. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2014; 18 (1) : 193–206.
- Ершов А. Секвенируй это (ликбез по технологиям чтения ДНК) / N+1. 2015. 1 сент. <https://nplus1.ru/material/2015/09/17/seq> (дата обращения 25.03.2019).
- Романовский Г. Б. Правовое регулирование генетических исследований в России и за рубежом. *Lex russica*. 2016; 7: 93–102.
- Савельев А. И. Электронная коммерция в России и за рубежом: правовое регулирование. 2-е изд. М.: Изд-во «Статут»; 2016.
- Владимиров В. Ю., Горбулинская И. Н., Кубитович С. Н. К вопросу о без-опасности геномной информации. *Биосфера*. 2018; 1. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/k-voprosu-o-bezopasnosti-genomnoy-informatsii> (дата обращения 06.04.2019).
- Жуков А. Фингерпринтинг браузера. Как отслеживают пользователей в сети. <https://xakep.ru/2015/01/30/user-web-tracking-howto> (дата обращения 06.04.2018).
- Савельев А. И. Электронная коммерция в России и за рубежом: правовое регулирование. 2-е изд. М.: Изд-во «Статут»; 2016.
- Новикова П. «Я удалила обе груди, не дожидаясь рака». URL: <https://blog.genotek.ru/mastectomy-stories> (дата обращения 04.04.2019).
- Романовская О. В., Романовский Г. Б. Правовое регулирование геномной регистрации в Российской Федерации. *Российская юстиция*. 2013; 8: 43–6.

REFERENCES

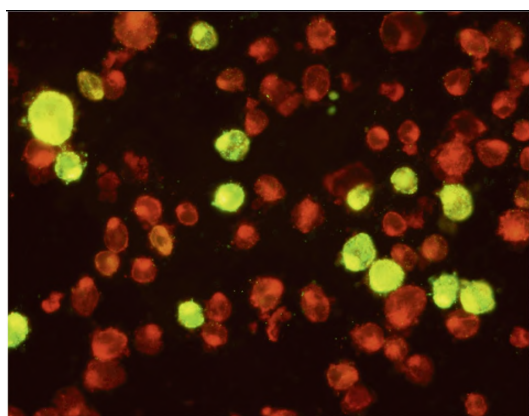
- Sanger F., Nicklen S., and Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS*. USA. 1977. Dec; 74(12): 5463–7.
- Orlov Ju. L. Computer study of the regulation of transcription of eukaryotic genes using data from chromatin sequencing and immunoprecipitation experiments. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i seleksii*. 2014; 18. (1): 193–206. (in Russian)
- Ershov A. Sequencing it (educational program on DNA reading technologies) / N+1. 2015. 1 sent. <https://nplus1.ru/material/2015/09/17/seq> (date of the application 25.03.2019). (in Russian)
- Mulder N., Schwartz R., Brazas M., Brooksbank C., Gaeta B., Morgan S. et al. The development and application of bio-informatics core competencies to improve bioinformatics training and education. *PLOS Comput. Biol.* 2018; 14(2): e1005772.
- Soon W., Hariharan M., Snyder M. High-throughput sequencing for biology and medicine. *Molecular Systems Biology*. 2013; 9:640.
- Jianhua Zhao and Struan F.A. Grant, «Advances in Whole Genome Sequencing Technology». *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2011; 12: 293.
- Yegnasubramanian S. Explanatory chapter: next generation sequencing. *Methods Enzymol.* 2013; 529: 201–8.

8. Norman H. How much information does human DNA store? URL: <https://www.quora.com/How-much-information-does-human-DNA-store> (date of the application 05.04.2019).
9. Papageorgiou L., Eleni P., Raftopoulou S., Mantaïou M., Megalooikonomou V., Vlachakis D. Genomic big data hitting the storage bottleneck. *EMBnet J.* 2018;24:e910.
10. Romanovskiy G. B. Legal regulation of genetic research in Russia and abroad. *Lex russica.* 2016; 7: 93–102. (in Russian)
11. Savel'ev A. I. E-commerce in Russia and abroad: legal regulation. 2nd ed. Moscow: Statut; 2016. (in Russian)
12. Vladimirov V. Ju., Gorbuninskaya I. N., Kubitovich S. N. On the security of genomic information. *Biosfera.* 2018; 1. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/k-voprosu-o-bezopasnosti-genomnoy-informatsii> (date of the application 06.04.2019). (in Russian)
13. Regulation (eu) 2016/679 of the European parliament and of the council of 27 April 2016 on the protection of natural persons with regard to the processing of personal data and on the free movement of such data, and repealing Directive 95/46/EC (General Data Protection Regulation). *Official Journal of the European Union.* N L 119. 04.05.2016. P. 1. URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX%3A32016R0679> (date of the application 06.04.2019).
14. Gendiagnostik gesetz vom 31. Juli 2009 (BGBl. I S. 2529, 3672), das zuletzt durch Artikel 2 Absatz 1 des Gesetzes vom 4. November 2016 (BGBl. I S. 2460) geändert worden ist. URL: <https://www.gesetze-im-internet.de/gendg/GenDG.pdf> (date of the application 09.04.2019).
15. What is personal information? URL: <https://www.oaic.gov.au/resources/agencies-and-organisations/guides/what-is-personal-information.pdf> (date of the application 06.04.2019).
16. Zhukov A. Browser fingerprinting. How to track users online. URL: <https://xakep.ru/2015/01/30/user-web-tracking-howto> (date of the application 06.04.2018).
17. Savel'ev A. I. E-commerce in Russia and abroad: legal regulation [Elektronnaya kommersiya v Rosii I za rubezhom: pravovoe regulirovanie]. Moscow, Statut; 2016. (in Russian)
18. Mayer J., Mutchlera P., Mitchell J. Evaluating the Privacy Properties of Telephone Metadata. Stanford University. 1 March 2016. URL: <https://www.pnas.org/content/pnas/113/20/5536.full.pdf> (date of the application 08.04.2019).
19. Novikova P. «I removed both breasts without waiting for cancer». URL: <https://blog.genotek.ru/mastectomy-stories> (date of the application 04.04.2019). (in Russian)
20. Romanovskaya O. V., Romanovskij G. B. Legal regulation of genomic registration in the Russian Federation. *Rossiyskaya yustitsiya.* 2013; 8: 43–6. (in Russian)
21. Jacobs P., Brunton M., Melville M., Brittain P., McClemon F. Aggressive behavior, mental sub-normality and the XYY male. *Nature.* 1965; Dec 25; 208(5017):1351–2.
22. Kaplan M. These advances in DNA research could change crime-fighting forever. URL: <https://nypost.com/2018/01/27/these-advances-in-dna-research-could-change-crime-fighting-forever> (date of the application 09.04.2019).
23. De-identification and the Privacy Act. URL: <https://www.oaic.gov.au/resources/agencies-and-organisations/guides/de-identification-and-the-privacy-act.pdf> (date of the application 09.04.2019).
24. Gentechnik gesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 16. Dezember 1993 (BGBl. I S. 2066), das zuletzt durch Artikel 3 des Gesetzes vom 17. Juli 2017 (BGBl. I S. 2421) geändert worden ist. URL: <https://www.gesetze-im-internet.de/gentg/GenTG.pdf> (date of the application 09.04.2019).
25. Gendiagnostik gesetz vom 31. Juli 2009 (BGBl. I S. 2529, 3672), das zuletzt durch Artikel 2 Absatz 1 des Gesetzes vom 4. November 2016 (BGBl. I S. 2460) geändert worden ist. URL: <https://www.gesetze-im-internet.de/gendg/GenDG.pdf> (date of the application 09.04.2019).
26. Lidsky A. How Blockchain Can Simplify The Transfer Of Genomic Data. URL: <https://www.dnatix.com/blockchain-transfer-genomic-data> (date of the application 16.04.2019).
27. Ozercan H., Ileri A., Ayday E., Alkan C. Realizing the potential of blockchain technologies in genomics. *Genome Res.* 2018; 28(9):1255–63.
28. Dwivedi A., Srivastava G., Dhar S., Singh R. A Decentralized Privacy-Preserving Healthcare Blockchain for IoT. *Sensors* (Basel). 2019; 19 (2): 326.

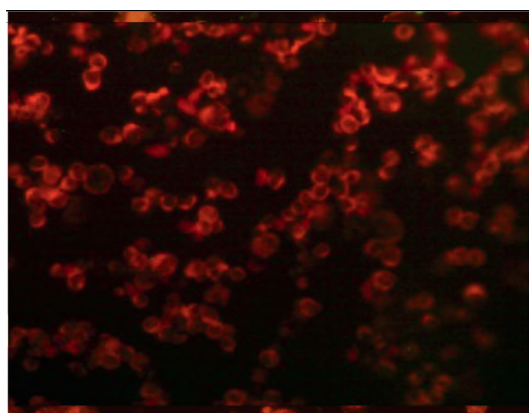
Поступила 15.09.19

Принята в печать 20.09.19

К ст. Марданлы С.Г. и соавт.



Положительный результат РИФ



Отрицательный результат РИФ

Рис. 2. Результаты исследования образцов в реакции непрямой иммунофлюоресценции (РИФ).

К ст. Никитиной А.В и соавт.

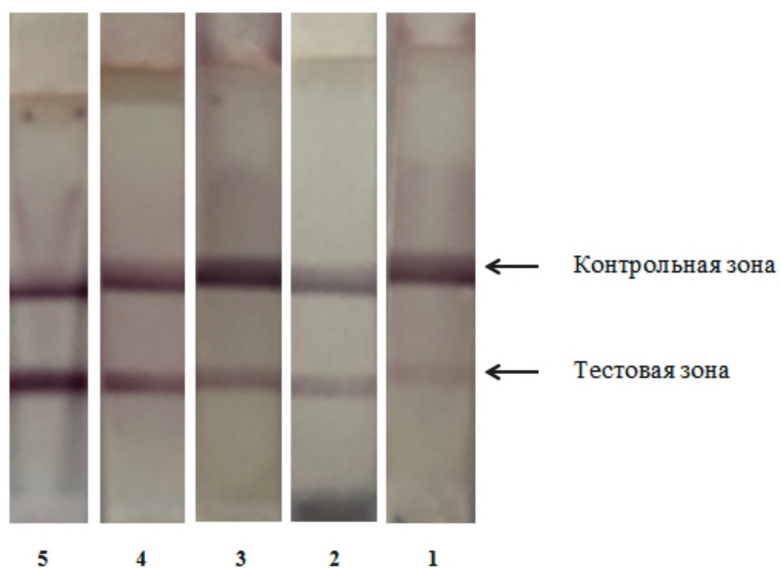


Рис. 1. Интенсивность окрашивания образцов, содержащих гемоглобин (от 5 до 1 усл.ед.).

К ст. Кукиной И.В. и соавт.

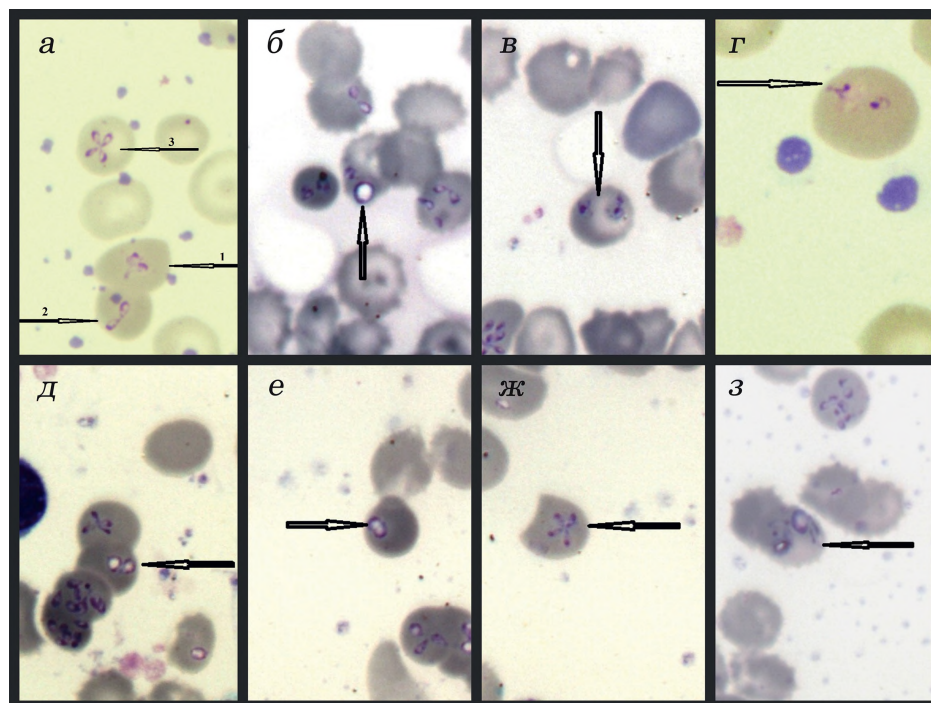


Рис. 1. *Babesia divergens*. Полиморфизм паразитов. Тонкий мазок крови, окрашенный по методу Романовского (x1000):

а – 1-трофозоиты грушевидной формы (пириформы); 2- делящиеся трофозоиты «фигура 8»; 3 – тетрада паразитов «Мальтийский Крест»; б – одиночные и парные формы паразитов; мелкие кольцевидные формы; крупная кольцевидная форма с прозрачной вакуолью; в – безвакуольные формы; г – амёбовидные трофозоиты; д – делящиеся трофозоиты, образующие тетраду; множественная инвазия в 2-х эритроцитах по 8 трофозоитов с хаотичным расположением; 2 кольцевидных трофозоита; е – делящиеся кольцевидные трофозоиты; ж – тетрада паразитов «Мальтийский Крест»; з – 8 трофозоитов, расположенных хаотично, 2 кольцевидных трофозоита.

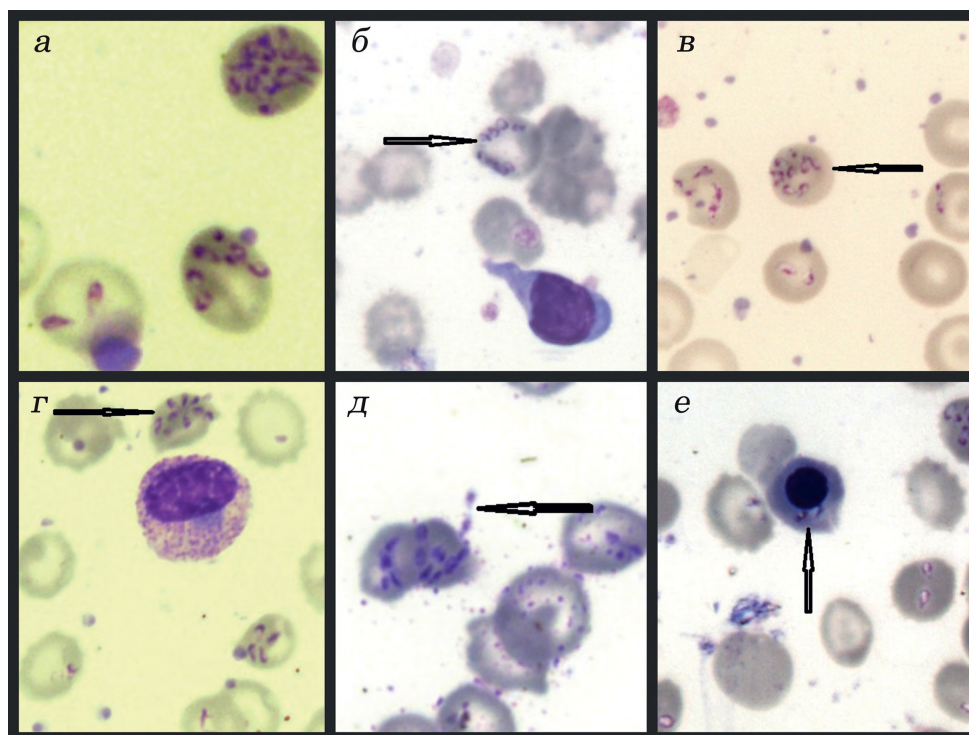


Рис. 2. *Babesia divergens*. Тонкий мазок крови, окрашенный по методу Романовского (x1000).

a – множественная инвазия – 14 трофозоитов в эритроците; *б* – расположение паразитов по периферии эритроцита; *в* – хаотичное расположение паразитов при множественной инвазии эритроцита; грушевидные трофозоиты; делящиеся трофозоиты – «фигура 8»; *г* – деление паразитов на 6 трофозоитов, соединенных в «секстет»; *д* – мерозоиты, вышедшие из эритроцита; *е* – 2 трофозоита, прилегающие к ядру нормобласта.

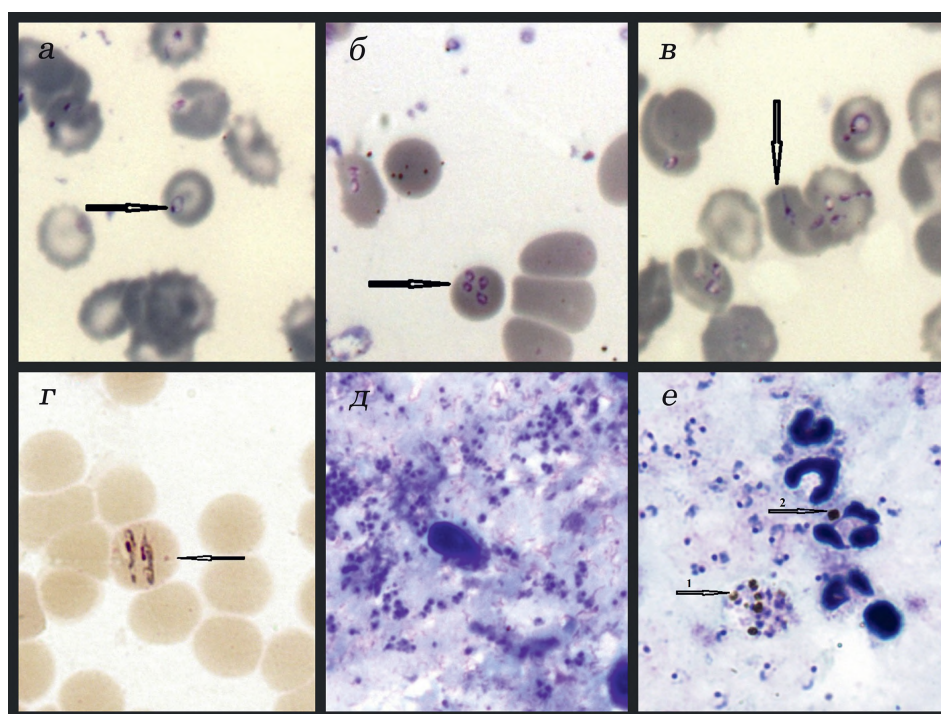


Рис. 3. Тонкий мазок крови, окрашенный по методу Романовского (x1000).

Babesia divergens. *a* – кольцевидный трофозоит; *б* – 2 пирiformы, 4 кольцевидных трофозоита; *в* – вытянутая безвакуольная форма; *г* – атипичная форма трофозоитов *Plasmodium falciparum*, в цитоплазме хорошо различим малярийный пигмент; *д* – трофозоиты *B. divergens* в толстой капле; *е* – многочисленные кольцевидные трофозоиты *P. falciparum* в толстой капле, 1 – шизонт с малярийным пигментом, 2 – сегментоядерный нейтрофил (пигментофаг) с фагоцитированным малярийным пигментом в цитоплазме.