

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ
ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«ЦЕНТРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭПИДЕМИОЛОГИИ»
РОСПОТРЕБНАДЗОРА (ФГУН ЦНИИЭ РОСПОТРЕБНАДЗОРА)

НАЦИОНАЛЬНОЕ НАУЧНОЕ ОБЩЕСТВО ИНФЕКЦИОНИСТОВ

**VII Всероссийская научно-практическая конференция
с международным участием**

«МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА – 2010»

СБОРНИК ТРУДОВ

Под редакцией академика РАМН В.И. Покровского

ГЕНЕРАЛЬНЫЙ СПОНСОР: ООО «ИнтерЛабСервис»

ТОМ V

Москва

УДК 577.21

ББК 28.04

М75

СОСТАВ РЕДАКЦИОННОЙ КОЛЛЕГИИ:

Покровский В.И. (главный редактор)
Шипулин Г.А. (ответственный секретарь)
Альварес Фигероа М.В.
Астахова Т.С.
Гущин А.Е.
Карань Л.С.
Куевда Д.А.
Маркелов М.Л.
Подколзин А.Т.
Чуланов В.П.
Шипулина О.Ю.
Яцышина С.Б.

М75 Молекулярная диагностика. сб. трудов/колл. авт., под. ред. В.И. Покровского. – т. V – М.: ООО «Рекламное Агентство «ЭйВиДжи», 2011. – 168 с.

В пятом томе представлены результаты научных исследований российских и зарубежных специалистов в области молекулярной диагностики социально-значимых инфекционных болезней человека. Освещаются вопросы использования молекулярно-биологических методов в диагностике и изучении ВИЧ и ВИЧ-ассоциированных инфекций, вирусных гепатитов, туберкулеза, особо опасных инфекций. Отдельные разделы сборника включают работы, посвященные использованию молекулярных методов диагностики для обеспечения инфекционной безопасности в трансфузиологии и трансплантологии, работы, посвященные вопросам молекулярной диагностики оппортунистических инфекций.

Для специалистов в области лабораторной диагностики и научных работников. Сборник будет интересен врачам-лаборантам, инфекционистам, гинекологам, урологам, дерматовенерологам, гепатологам, пульмонологам, трансфузиологам и трансплантологам, генетикам, судебно-медицинским экспертам, эпидемиологам, врачам общей практики, ветеринарным врачам, а так же студентам медицинских и ветеринарных учебных заведений

Издано в Российской Федерации по решению Организационного комитета VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика - 2010».

СОСТАВ ОРГАНИЗАЦИОННОГО КОМИТЕТА VII ВСЕРОССИЙСКОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ «МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА – 2010»

СОПРЕДСЕДАТЕЛИ:

- Онищенко Г.Г. – руководитель Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главный санитарный врач России, академик РАМН
- Покровский В.И. – директор Федерального государственного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, академик РАМН

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ:

- Шипулин Г.А. – заведующий отделом молекулярной диагностики и эпидемиологии ФГУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, кандидат медицинских наук

ЧЛЕНЫ ОРГАНИЗАЦИОННОГО КОМИТЕТА:

- Борисевич И.В. – директор ФГУН «Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича» Роспотребнадзора, доктор медицинских наук, профессор
- Вороненко Ю.В. – ректор Национальной медицинской академии последипломного образования имени П.Л. Шупика, Киев, Украина, член-корреспондент АМН Украины
- Гинцбург А.Л. – директор Учреждения РАМН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи», академик РАМН

- Дятлов И.А. – директор ФГУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, профессор, доктор медицинских наук
- Ежлова Е.Б. – начальник Управления эпидемиологического надзора Роспотребнадзора
- Жебрун А.Б. – директор ФГУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора, член-корреспондент РАМН
- Иванов П.Л. – руководитель Специализированного центра молекулярно-генетических экспертиз РЦСМЭ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, доктор биологических наук, профессор
- Игнатъев Г.М. – директор Республиканского научно-практического центра эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь, доктор медицинских наук, профессор
- Кувейда Д.А. – заместитель заведующего отделом молекулярной диагностики и эпидемиологии ФГУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора
- Куличенко А.Н. – директор ФГУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, доктор медицинских наук, профессор
- Кутырев В.В. – директор ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, член-корреспондент РАМН
- Меньшиков В.В. – заведующий лабораторией проблем клинико-лабораторной диагностики Научно-исследовательского центра Московской медицинской академии имени И.М. Сеченова, доктор медицинских наук, профессор

- Михайлов М.И. – директор Учреждения РАМН «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова», доктор медицинских наук, профессор
- Мусабаев Э.И. – директор Научно-исследовательского института вирусологии, Ташкент, Республика Узбекистан, доктор медицинских наук, профессор
- Панин А.Н. – директор Федерального государственного учреждения «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору, академик РАСХН
- Покровский В.В. – руководитель Федерального научно-методического центра по профилактике и борьбе со СПИДом Федерального государственного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, академик РАМН
- Поляков А.В. – руководитель лаборатории ДНК-диагностики Медико-генетического научного центра РАМН, доктор биологических наук, профессор
- Сергиев В.П. – директор Института медицинской паразитологии и тропической медицины им. Е.И. Марциновского Московской медицинской академии им. И.М.Сеченова, академик РАМН
- Скрябин К.Г. – директор Центра «Биоинженерия» Российской академии наук, академик РАН и РАСХН
- Тутельян В.А. – директор Учреждения РАМН «Научно-исследовательский институт питания», академик РАМН
- Шевырева М.П. – директор Департамента охраны здоровья и санитарно-эпидемиологического благополучия человека Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, доктор медицинских наук

Раздел 1.

ВИЧ И ВИЧ-АССОЦИИРОВАННЫЕ ИНФЕКЦИИ

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ИЗОЛЯТОВ CRF02_AG ВИЧ-1, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ

Гашникова Н.М., Тотменин А.В., Сафронов П.Ф., Богачев В.В., Барышев П.Б., Никонорова Ю.В., Унагаева Н.В., Лаптева Т.А.,¹Мещерякова Ю.В.,¹Черноусова Н.Я., Ставский Е.А.

ФГУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, Россия; ¹ГБУЗ Новосибирский областной Центр по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями, Кольцово, Новосибирская область, Россия

Введение. Необычайно высокая изменчивость ВИЧ создает колоссальные проблемы диагностики и лечения. Существующие на сегодняшний день методические подходы для создания кандидатных вакцин, противовирусных препаратов, алгоритмов для анализа биологических свойств ВИЧ основаны на знаниях и разработках применительно к ВИЧ-1 субтипа В. Тем не менее существуют определенные отличия в патогенезе ВИЧ-инфекции, вызванной разными субтипами вируса, значимость которых до сих пор не определена. Поэтому выделение изолятов ВИЧ не В субтипов и изучение их генетических особенностей и биологических свойств остается актуальным.

Целью исследования было выделение и изучение свойств изолятов ВИЧ-1 циркулирующей рекомбинантной формы 02_AG, быстро распространяющейся на территории Новосибирской области.

Материалы и методы. Для выделения первичных изолятов ВИЧ-1 в работе использовали венозную кровь от пациентов, инфицированных ВИЧ-1 в 2008-2010 годах. Сбор образцов крови осуществляли на базе Новосибирского областного Центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями. Выделение первичных изолятов ВИЧ-1 проводили согласно протоколу ВОЗ. Генетическую характеристику ВИЧ-1 осуществляли путем определения и анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов генома вируса, кодирующих области гена полимеразы (pol) и основного белка оболочки (env).

Основные результаты. Проведено исследование 21 изолята CRF02_AG ВИЧ-1. Все изоляты относятся к CCR5-тропным вирусам, большая часть (19) изолятов ВИЧ является быстро реплицирующимися вирусными вариантами, характеризующимися способностью к накоплению высокой концентрации вирусного белка p24 в культу-

ральной жидкости. Установлено, что варианты ВИЧ, выделенные до 2008 г., генетически близки к референс-штаммам, циркулирующим в Африке и в странах Средней Азии. Изоляты CRF02_AG, выделенные в конце 2009 – начале 2010 гг., формируют отдельную ветвь филогенетического дерева.

Выводы. Филогенетический анализ выделенных в Новосибирской области вариантов CRF02_AG ВИЧ-1 показал, что на данной территории сформировался собственный очаг эпидемии, вызванный проникновением в человеческую популяцию генетических вариантов CRF02_AG ВИЧ-1, которые обуславливают дальнейшее распространение ВИЧ-инфекции. Инфицирование CRF02_AG ВИЧ-1 выявлено при употреблении наркотических препаратов внутривенно, при гетеросексуальных половых контактах и при рождении ребёнка от инфицированной ВИЧ матери. Созданная коллекция генетически и биологически охарактеризованных изолятов CRF02_AG ВИЧ-1 позволит провести углубленные исследования особенностей биологии циркулирующей рекомбинантной формы 02_AG ВИЧ-1, не распространявшейся ранее на территории России.

РАЗРАБОТКА И ВНЕДРЕНИЕ В ЛАБОРАТОРНУЮ ПРАКТИКУ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ АЛЛЕЛИ HLA В*5701 ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ С ЦЕЛЬЮ ИСКЛЮЧЕНИЯ СЛУЧАЕВ ВОЗНИКНОВЕНИЯ РЕАКЦИИ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ АБАКАВИР-СОДЕРЖАЩЕЙ ТЕРАПИИ

Киреев Д.Е., Кувва Д.А.

ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия.

Введение.

В настоящее время во многих странах, в том числе и в России, широко используется антиретровирусный препарат абакавир. Абакавир является нуклеозидным ингибитором обратной транскриптазы и применяется совместно с другими антиретровирусными препаратами для лечения ВИЧ-инфекции. Несмотря на его эффективность, существует серьезное ограничение при назначении пациенту вследствие возможного возникновения реакции гиперчувствительности (РГЧ). РГЧ к абакавиру – это мультиорганный клинический синдром, обычно проявляющийся в течение первых 6 недель после начала приема

абакавира. В случае отмены препарата симптомы РГЧ пропадают, однако в случае повторного применения, более серьезные, они возникают вновь и могут явиться причиной смерти пациента. В 2002 году была обнаружена связь между возникновением РГЧ и наличием у пациента аллели В*5701 главного комплекса гистосовместимости I-го класса. Дальнейшие клинические исследования, проведенные в Западной Австралии, Великобритании и Франции, подтвердили сильную корреляцию РГЧ и носительства HLA-B*5701. Для окончательного подтверждения гипотезы было проведено широкомасштабное исследование PREDICT. Это было проспективное двойное слепое исследование, включавшее 1660 пациентов, которым планировалось назначение схемы антиретровирусной терапии с абакавиром. Пациенты были разделены на две группы: контрольную и исследуемую. Всем пациентам контрольной группы была назначена абакавир-содержащая терапия, в то время как пациентам исследуемой группы сначала был проведен анализ на наличие аллели В*5701 и только в случае ее отсутствия назначалась терапия, содержащая абакавир. По результатам исследования прогностическая ценность отрицательного результата анализа составила 100%. В настоящее время по американским, европейским и российским рекомендациям по лечению ВИЧ-инфицированных анализ на наличие аллели В*5701 необходимо проводить перед назначением абакавир-содержащей терапии.

Цель и задачи.

Целью нашей работы являлось создание теста для обнаружения аллели HLA В*5701, его валидация относительно референсных методик и клиническая апробация в соответствующих медицинских учреждениях.

Материалы и методы.

Материалом при разработке и валидации теста служили 13 референсных образцов ДНК и зашифрованная панель, содержащая 384 образца ДНК. Обе группы были заранее охарактеризованы референсной методикой SSP (sequence specific primers), а образцы содержащие аллель В*5701 дополнительно проанализированы методом секвенирования. Образцы были любезно предоставлены доктором E. Hammond (Murdoch University, Австралия). Клиническая апробация набора реагентов проводилась на 300 образцах крови, либо соскобах со слизистой ВИЧ-инфицированных и здоровых доноров, собранных на территории России.

Основные результаты.

На первом этапе разработки теста, на основании выравнивания нуклеотидных последовательностей аллелей главного комплекса гистосовместимости человека 1-го и 2-го классов были подо-

браны специфические олигонуклеотиды. Данные олигонуклеотиды были расположены таким образом, чтобы происходила эффективная амплификация фрагмента ДНК аллелей, относящихся к группы В*57. Дальнейшая дискриминация производилась с помощью меченого олигонуклеотида (зонда). Такая система с помощью метода ПЦР с флуоресцентной детекцией в режиме “реального времени” позволяла обнаруживать только аллель В*5701 и несколько других редко встречаемых аллелей группы В*57 и дискриминировать все остальные аллели.

Результаты тестирования ДНК от 13 референсных образцов, содержащих следующие варианты аллелей 08**, 0801, 15**, 1502, 25**, 27**, 3701, 40**, 4001, 4201, 44**, 4403, 51**, 5101, 5301, 55**, 5701, 5703, 5704, 5801, 61**, показали 100%-ную специфичность методики. Были получены флуоресцентные кривые, свидетельствующие о положительном результате, у 3-х образцов, содержащих аллель В*5701. Для остальных 10 образцов, в том числе образцов, содержащих близкородственные аллели 5703 и 5704, были получены отрицательные результаты.

На следующем этапе разработанный тест валидировался с помощью зашифрованной панели, содержащей 384 образца ДНК. После получения результатов тестирования разработанной методикой панель была расшифрована. Данная панель содержала 317 отрицательных образцов, 34 положительных образца и 33 невалидных образца для проверки отсутствия контаминации во время анализа. Результаты тестирования панели разработанным тестом полностью совпали с результатами, полученными в университете Австралии с помощью референсной методики.

Необходимо было также подобрать эффективный метод ДНК из клинического материала. Основными видами клинического материала для разрабатываемого теста являются цельная кровь и соскоб со слизистой, как быстрый и неинвазивный способ получения клеток пациента. Для таких видов клинического материала наиболее хорошо подходит преципитационный метод выделения нуклеиновых кислот (например, набор реагентов «РИБО-преп» производства ФГУН Центрального НИИ эпидемиологии). Результаты экспериментов показали, что данный набор отлично подошел для вышеуказанных целей, позволяя менее чем за час провести качественное выделение ДНК из 10 образцов. Для повышения надежности теста одновременно с амплификацией мишени – аллели В*5701, в пробирке производится амплификация гена β -глобина, позволяя проводить оценку качества взятия материала и выделения ДНК.

На заключительном этапе разработки тест был валидирован на 300 образцах крови, либо соскобах со слизистой ВИЧ-инфицированных и здоровых доноров, собранных на территории России. Из 300 протестированных образцов было выявлено 17 положительных, наличие аллели В*5701 в которых было затем подтверждено с помощью методики SSP. Таким образом, распространенность аллели HLA В*5701 в наших исследованиях составила 5,67%. Эти результаты согласуются с данными по распространенности HLA В*5701 в Европе (5-8%).

После окончания разработки в ГИСК им. Л.А. Тарасевича были проведены испытания набора реагентов. В результате успешных испытаний набор был разрешен к производству и применению в РФ и получено регистрационное удостоверение в МинЗдравСоцРазвития (№ФСР 2009/06189 от 3 декабря 2009 года).

Заключение.

Использование антиретровирусного препарата абакавир ограничивается необходимостью проведения тестирования ВИЧ-инфицированных на наличие аллели HLA В*5701 перед его назначением. Проведение анализа с помощью референсных методов, таких как SSP и секвенирование, в лечебно-профилактических учреждениях затруднено вследствие отсутствия стандартизации процедуры анализа и учета результатов. Велика необходимость в наличии простого и надежного метода, не уступающего по качеству “золотому” стандарту. Разработанный в Центральном НИИ эпидемиологии набор реагентов позволяет менее чем за три часа провести подобный анализ и для его использования необходимо оборудование, доступное в большинстве лабораторий центров СПИД. Данный метод прошел несколько этапов валидации, зарегистрирован в Российской Федерации и может быть использован в клинико-диагностических лабораториях центров по борьбе и профилактике со СПИД и других профильных учреждениях.

НЕКОТОРЫЕ ВОПРОСЫ ДИАГНОСТИКИ, ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ ОНКОЗАБОЛЕВАНИЙ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ОСУЖДЕННЫХ

Кусая В.В., Сивак В.П.

ООО МФО «Клиника «На Здоровье», Краснодар, Россия

При ВИЧ – инфекции максимально повышен риск развития рака шейки матки. Риск данной онкопатологии связан, прежде всего, с установлением этиологической роли вирусов папиллом человека

(HPV) и возможностью создания специфических вакцин. Группа вирусов папиллом (ВЧП) высокого риска включает в первую очередь HPV 16 и HPV 18 типы.

Нами проанализированы сведения о 325 ВИЧ-инфицированных осужденных. Рак шейки матки (РШМ) выявлен у 128 больных, у 86 (26,4%) он был первым признаком ВИЧ-инфекции. РШМ оказался наиболее часто встречающимся при СПИД злокачественной опухолью (55%), за ним следовали лимфома и саркома Капоши.

Вирус папилломы человека (ВПЧ), интраэпителиальная неоплазия шейки матки и иммуносупрессия увеличивали риск развития рака шейки матки. Оказалось, что вирусы папилломы человека (ВПЧ), связанные с раком шейки матки, гораздо чаще встречались у ВИЧ-положительных женщин (52%) чем у ВИЧ-отрицательных (15%), диагностировались методом ПЦР. Вероятность наличия этих видов ВПЧ зависела также от вирусной нагрузки и состояния иммунного статуса женщин. Дисплазия шейки матки также гораздо чаще встречалась у женщин с ВИЧ инфекцией, то есть риск рака связан с длительностью иммуносупрессии, даже если иммунодефицита в этот период не наблюдалось. ВИЧ-инфекция у них перестает прогрессировать, но часто остается продолжительная иммуносупрессия. Таким образом, даже при применении терапии есть вероятность развития ВПЧ в слизистой шейки матки, что может приводить к развитию рака. Это еще раз говорит о том, что ВИЧ-положительным необходимы регулярные и внимательные осмотры, которые могли бы выявить патологические изменения шейки матки и что способствовало бы, предотвращению развития онкологических заболеваний.

Один раз в 6 мес в течение 3 лет проводили скрининговые осмотры, включающие взятие мазков и кольпоскопию. При первом осмотре ЗППП выявлены у 18 (9%) больных, при последующих осмотрах ЗППП не определялись. При взятии мазков изменения шейки матки обнаружены у 87 больных, при кольпоскопии у 110. Частота ложноотрицательных результатов при взятии мазков составила 14,2%, а применительно к дисплазии эндоцервикса 2 и 3 степени 3,1%. Среди женщин с дисплазией 1 степени при повторном осмотре у 10% отмечен переход в дисплазию 2 и 3 степени. Из исследований проведенных нами в пенитенциарной системе видно, что ВЧП-инфекция чаще появлялась у симптоматичных, чем у асимптоматичных ВИЧ - положительных женщин. В основном риску инфекции онкогенного вируса и развития злокачественного заболевания подвергались женщины с серьезными поражениями иммунной системы (3а, 4 стадии СПИДа). В исследовании о наличии клеток Лангерганса (биопсии эндо) в шейке матки ВИЧ-серопозитивных женщин (354 осужденных) оказалось,

что количество этих клеток, играющих антигенпредставляющую роль в иммунном ответе, у них уменьшено по сравнению со здоровыми женщинами (пациентки клиники). Из-за этого местный иммунитет в шейки матки является менее действенным, что дает возможность проявить себя онкогенному ВЧП. Влияние ВЧП подозревалось также при развитии других форм рака половых органов у осужденных (вульва, влагалище). Вирусы могут становиться активными в этих местах при поражении иммунной системы; однако они остаются латентно присутствующими у женщин с интактной иммунной системой. На большом количестве исследований 400 серопозитивных женщин, находящихся в пенитенциарной системе было определено различие между проявлениями РШМ у тех, которые подвергались заражению ВИЧ путем гетеросексуального контакта, и у тех, которые заразились при внутривенном использовании наркотиков (200 женщин). В группе гетеросексуальной трансмиссии 7% женщин страдали тяжелой формой рака, в группе использовавших внутривенные наркотики – 40%. При менее тяжелых формах рака различий в обеих группах не было (обе 7%). Поскольку женщины, употреблявшие внутривенно наркотики (в основном проститутки) в этом исследовании имели значительно больше половых партнеров, кажется возможным, что различие в частоте встречаемости РШМ связано с повышенной подверженностью лиц внутри этой группы онкогенным, переносимым половым путем вирусам. Женщины с ВИЧ или ВЧП-инфекцией имели, повышенный риск возникновения карциномы шейки матки. Женщины с обеими инфекциями подвергались наибольшему риску. Далее, женщины с ВИЧ-инфекцией в поздней стадии подвергались большему риску рака шейки матки, не позднее чем через 6 мес гинекологическое обследование, при котором брался мазок, который необходим у ВИЧ-серопозитивных женщин для своевременного выявления ВПЧ-инфекции. При этом должно быть отмечено, что при помощи мазка (так называемая онкоцитология) часто не обнаруживают ВПЧ-инфекцию. Чтобы проверить результат, необходимо наряду с мазком также регулярно (например, ежегодно) проводить кольпоскопическое обследование; этот метод в данном случае дает более высокую достоверность. Хотя еще не существует оптимальной терапии больных со связанными с ВИЧ ВЧП-инфекцией и раком шейки матки, предполагается, что их лечение должно быть агрессивнее, чем иммуносостоятельных женщин. К сожалению, женщины с иммунной недостаточностью часто плохо реагируют на общепринятую терапию. Уже имеющийся в наличии ВЧП никогда не может быть ликвидирован путем лечения, и остающиеся вирионы вызывают после лечения новые поражения шейки матки или прилегающих тканей. Для борьбы

с инфекциями вируса папиллом мы применяли различные способы. Антивирусное, иммунорегулирующее и антипролиферативное действие интерферона определило его роль в лечении ВЧП-инфекции. Местная терапия предпочтительней, чем системная терапия, так как отсутствуют тяжелые побочные явления. Бородавки, которые возникают в первую очередь, удалялись с помощью лазерного лечения. Недостатками лазерного лечения в условиях пенитенциарной системы являются высокие затраты на аппаратуру, дополнительная анестезия и госпитализация. Риск возвращения инфекции достаточно высок, потому что лазерное лечение действует только местно. Podofylline являлся наиболее распространенным средством для местного лечения генитальных бородавок; он прост в применении и затраты по его использованию относительно низки. Процент излечения, однако, незначителен и, безусловно, у ВИЧ-серопозитивных женщин от этого средства большого эффекта не ожидали. Криотерапия являлась альтернативным лечением, при котором бородавка и небольшая часть окружающей ткани замораживались. Закись азота является часто используемым криогенном. В некоторых исследованиях было показано, что после перечисленных методов лечения ВЧП все еще присутствовало. Риск возникновения рака шейки матки, оставался большим, последней возможностью оставалась хирургия, часто в комбинации с химиотерапией.

СОЗДАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ СОВРЕМЕННЫХ, ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ДЛЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ИЗОЛЯТОВ ВИЧ-1

**Никонорова Ю.В., Сафронов П.Ф., Унагаева Н.В., Лаптева Т.А.,
Богачев В.В., Барышев П.Б., Тотменин А.В., ¹Мещерякова Ю.В.,
¹Черноусова Н.Я., Ставский Е.А., Гашникова Н.М.**

*ФГУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии
«Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, Россия*

*¹Новосибирский областной центр по профилактике и борьбе со
СПИДом и инфекционными заболеваниями, Кольцово, Новосибирская
область, Россия*

Введение. Разработка эффективных вакцин и антиретровирусных препаратов является одним из приоритетных направлений в борьбе с распространением ВИЧ-инфекции. Для создания новых противовирусных средств необходимо иметь набор инструментов для адекватной оценки их эффективности. Такими инструментами могут являться

специфические панели охарактеризованных изолятов ВИЧ-1, обладающих различными генетическими и биологическими свойствами, позволяющие производить исследование противовирусной активности препаратов *in vitro*. До настоящего времени в России отсутствовала коллекция эпидемиологически значимых изолятов ВИЧ-1.

Целью данной работы было создание коллекции современных эпидемиологически значимых для России изолятов ВИЧ-1 для оценки антиретровирусной эффективности кандидатных химиотерапевтических и иммунотерапевтических препаратов.

Материалы и методы. Работы по созданию коллекции включали выделение первичных изолятов ВИЧ-1 и последующее изучение их генетических и биологических характеристик. Образцы крови от ВИЧ-инфицированных пациентов были предоставлены специалистами Новосибирского областного центра по борьбе со СПИДом. Донорами ВИЧ являлись пациенты с разными сроками инфицирования и клиническим статусом, получающие и не получавшие антиретровирусную терапию. Выделение изолятов осуществлялось путем сокультивирования мононуклеаров периферической крови (МПК) ВИЧ-инфицированного пациента со стимулированными фитогемагглютинином МПК от серонегативного донора. Исследование биологических свойств изолятов ВИЧ-1 включало оценку их репродуктивных характеристик и тропности. Изучение генетических свойств проводили с помощью определения нуклеотидных последовательностей фрагментов генома ВИЧ-1, кодирующих области генов *pol* и *env* и последующего анализа с использованием специализированных программ.

Основные результаты. За период с ноября 2008 по июль 2010 года был выделен 41 изолят ВИЧ-1: 14 изолятов субтипа А, 6 – субтипа В и 21 изолят CRF02_AG ВИЧ-1. Установлено, что большинство выделенных изолятов обладают сродством к CCR5-рецепторам (38), 2 ВИЧ-1 субтипа А и 1 ВИЧ-1 субтипа В являются CXCR4-тропными. Анализ участков гена *pol* показал, что 8 изолятов содержат мутации устойчивости к ингибиторам ревертазы и протеазы ВИЧ-1. Исследование репликативных способностей выделенных изолятов выявило значительные отличия в динамике роста и высокую вариабельность значений максимального накопления вирусспецифического белка p24 внутри групп всех субтипов (от 1,98 нг/мл до 1523,5 нг/мл).

Выводы. Создана охарактеризованная коллекция изолятов эпидемиологически значимых для России субтипов А, В и CRF02_AG ВИЧ-1. Наличие такой коллекции позволяет сформировать специализированные панели для исследования широты вируснейтрализующих свойств кандидатных вакцин и для оценки эффективности анти-ВИЧ препаратов, в том числе в отношении резистентных к существующим

Раздел 2.
ВИРУСНЫЕ ГЕПАТИТЫ

РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ РНК ВИРУСА ГЕПАТИТА А (HAV) МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ (ПЦР) С ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ «АМПЛИСЕНС® HAV-FL»

Карандашова И.В., Неверов А.Д., Долгин В.А., Чуланов В.П.

ФГУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение. Вирусный гепатита А (ВГА) – острое заболевание печени, передающееся фекально-оральным путем, возбудителем которого является вирус гепатита А (HAV), относящийся к семейству Picornaviridae. Основными серологическими маркерами вирусного гепатита А являются специфические антитела к вирусу гепатита А класса IgM и IgG. Антитела класса IgM (anti-HAV IgM) начинают вырабатываться в конце инкубационного периода, который длится в среднем в течение 30 дней, и служат маркером острой инфекции. Синтез специфических антител класса IgG (anti-HAV IgG) начинается в конце первой – начале второй недели болезни. Антитела этого класса являются маркером перенесенного ВГА или поствакцинального иммунитета. Антиген вируса гепатита А (HAV-Ag) обнаруживают в фекалиях в инкубационном периоде и, как правило, в течение первых двух-трех недель болезни. Данный маркер также используется для выявления вируса гепатита А в объектах окружающей среды. Первым диагностическим маркером, обнаруживаемым в крови заболевшего ВГА, является РНК вируса гепатита А, которая определяется в крови на третьей неделе от момента заражения. Anti-HAV IgM обнаруживаются в крови от нескольких дней до нескольких недель после появления РНК HAV. Определение РНК HAV имеет значительное преимущество в чувствительности (как минимум в 10000 раз) по сравнению с детекцией HAV-Ag при выявлении вируса гепатита А в объектах окружающей среды. Определение РНК вируса гепатита А методом ПЦР наиболее целесообразно использовать для выявления заболевших ВГА среди контактных и для тестирования объектов окружающей среды на наличие вируса гепатита А. ЦЕЛЬЮ настоящей работы была разработка и апробация набора реагентов для выявления РНК вируса гепатита А в клиническом материале и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флюоресцентной детекцией.

Материалы и методы. Выбор праймеров для амплификации и зонда для детекции фрагмента 5'-нетранслируемого региона генома вируса гепатита А, вычисление температуры их отжига определяли с помощью программного обеспечения, разработанного в ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора. Предварительная проверка специфичности праймеров и зонда проводилась в поисковой системе Blast в банке нуклеотидных последовательностей GenBank. Выделение РНК из 100 мкл исследуемого образца проводили с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп» («ФГУН ЦНИИЭ», Россия) и с помощью автоматической станции для выделения нуклеиновых кислот «NucliSENS® easyMAG™» («BioMerieux», Франция), из 200 мкл и 1000 мкл - с использованием комплекта реагентов «МАГНО-сорб» («ФГУН ЦНИИЭ»). ОТ-ПЦР проводили с использованием реагентов производства ФГУН ЦНИИЭ. Аналитическую специфичность набора реагентов оценивали, добавляя в реакцию геномную ДНК/РНК следующих организмов и вирусов: вирус гепатита В, вирус гепатита С, вирус гепатита D, вирус гепатита Е, вирус гепатита G, вирус иммунодефицита человека, цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барр, вирус простого герпеса 1 и 2 типов, вирус герпеса человека 6 и 8 типов, энтеровирус (Coxsackie B1, B2, B3, B4, B5, B6, Polio I, II, III), ротавирус человека WA, астровирус, норовирус I и II типов, аденовирус (типы 2, 3, 7), Shigella, Salmonella, Yersinia, Campylobacter, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Streptococcus agalactiae, Homo sapiens. Для определения диагностической чувствительности и специфичности использовали 200 образцов плазмы (сыворотки) крови и 50 образцов фекалий, полученных от 200 пациентов, госпитализированных с диагнозом острый вирусный гепатит или острый ВГА в стационары гг. Москва, Калининград, Рязань, Уфа, Радужный (Ханты-Мансийский АО), Махачкала, Южно-Сахалинск и Республики Тыва в период с 10.01.08 по 01.07.09 г (опытная группа). В контрольную группу вошли 100 пациентов больных гепатитами другой этиологии, от которых было проанализировано 100 образцов плазмы (сыворотки) крови и 20 образцов фекалий. Для определения аналитической чувствительности разработанного набора реагентов проводили модельный эксперимент, добавляя стандартный образец предприятия (СОП) «Положительный контрольный образец содержания РНК вируса гепатита А (FL, рекомбинантный)» («ФГУН ЦНИИЭ») в отрицательный контрольный образец (ОКО) («ФГУН ЦНИИЭ») и НАV-отрицательные образцы плазмы крови, фекалий и воды. Разведения готовили согласно инструкции по при-

менению соответствующего СОП. В качестве системы сравнения использовался набор реагентов для выявления РНК вируса гепатита А в клиническом материале и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле «АмплиСенс® HAV» (№ ФСР 2007/00578).

Результаты. В ФГУН ЦНИИЭ был разработан набор реагентов «АмплиСенс® HAV-FL» для выявления РНК вируса гепатита А в клиническом материале и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. Набор реагентов содержит рекомбинантный неконкурентный внутренний контрольный образец (ВКО), позволяющий проводить контролировать основные процессы ПЦР-анализа (выделение РНК, проведение реакции обратной транскрипции и амплификации кДНК) и оценивать влияние ингибиторов ПЦР на результаты исследования.

В наборе реагентов используются 1) праймеры, комплементарные наиболее консервативной области генома вируса гепатита А - 5'-нетранслируемой области (5'UTR), с которых осуществляется амплификация участка кДНК вируса гепатита А всех его генотипов, встречающихся у людей (I, II и III) и 2) праймеры, с которых осуществляется амплификация ВКО. В наборе реагентов используются зонды, которые позволяют осуществлять гибридизационно-флуоресцентную детекцию амплификации кДНК вируса гепатита А (HAV) по каналу флуоресценции JOE (HEX), и экзогенного ВКО - по каналу флуоресценции - FAM. Разработанный набор реагентов позволяет проводить реакцию обратной транскрипции (ОТ) выделенной РНК и ПЦР-амплификации синтезированной кДНК в одном реакционном буфере (one step ОТ-ПЦР). Разработанный набор реагентов адаптирован для использования как на амплификаторах с детекцией флуоресцентного сигнала в режиме реального времени (FRT), так и на флуоресцентных детекторах (FER).

При проверке аналитической специфичности перекрестных реакций для тестируемых организмов и вирусов зарегистрировано не было. При тестировании образцов плазмы (сыворотки) крови и фекалий от опытной и контрольной групп пациентов показатели диагностической специфичности и диагностической чувствительности составили 100% для каждого вида исследованного клинического материала. Аналитическая чувствительность разработанного метода выявления РНК вируса гепатита А составила не менее 5×10^2 копий вируса гепатита А в 1 мл плазмы (сыворотки) крови, фекалий и воды (при выделении из 100 мкл

исследуемого образца); не менее 250 копий вируса гепатита А в 1 мл плазмы (сыворотки) крови и воды (при выделении из 200 мкл исследуемого образца) и не менее 50 копий вируса гепатита А в 1 мл плазмы (сыворотки) крови и воды (при выделении из 1000 мкл исследуемого образца).

Заключение: Разработанный набор реагентов «АмплиСенс® НАV-FL» для выявления РНК вируса гепатита А в клиническом материале и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией пригоден для использования в клинической лабораторной диагностике и научной практике.

РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОДНОВРЕМЕННОГО ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК HBV И РНК HDV В КЛИНИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

Коновалов А.С., Карандашова И.В., Кувда Д.А.

ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение. Вирусный гепатит В (ВГВ) – широко распространенная инфекция человека, вызываемая ДНК-содержащим вирусом, относящимся к семейству *Hepadnaviridae*. Заражение вирусом гепатита В происходит при непосредственном попадании вируса в кровь (при парентеральных вмешательствах или при гемотрансфузиях) или через слизистые оболочки, повреждения кожного покрова (при половых контактах, вертикальной передаче, тесном бытовом контакте).

Вирусный гепатит В представляет собой серьезную проблему здравоохранения ввиду его повсеместного распространения. Выявление ДНК HBV и определение вирусной нагрузки в плазме крови являются ценными диагностическими тестами, которые используются в совокупности с другими серологическими маркерами и биохимическими методами для диагностики вирусного гепатита В и мониторинга терапии.

Однако, весьма важно распознавание HDV-инфекции на фоне гепатита В, поскольку течение болезни, терапевтические подходы и прогноз при гепатите D отличаются от таковых при ВГВ.

Вирус гепатита D (HDV) является РНК содержащим, гепатотропным вириоидом (несовершенным вирусом), относящимся к семейству Deltavirus. HDV нуждается в хелперной функции вируса гепатита В, который обеспечивает вирус гепатита Дельта белками поверхностной оболочки (HBsAg). Поэтому HDV способен к эффективной репликации только в присутствии HBV.

Пути передачи HDV-инфекции аналогичны путям передачи гепатита В. В мире насчитывается около 500 миллионов человек, инфицированных вирусом гепатита В. Их инфицированность HDV в эндемичных районах может достигать 60%. В России максимум регистрации ВГД приходится на зоны, эндемичные по HBV - Туву, Якутию.

Коинфекция - одновременное заражение вирусами гепатитов В и D носит характер острого тяжелого заболевания с высоким риском развития фульминантного гепатита (до 20%). Заражение вирусом гепатита D больного хроническим гепатитом В или носителя вируса гепатита В (суперинфекция) в 70-80% случаев ведет к быстрому развитию цирроза.

Для диагностики дельта-инфекции наиболее целесообразно использовать тест-системы на основе ПЦР. РНК HDV является первым диагностическим маркером, обнаруживаемым в крови пациента, антитела к D-Ag появляются на 2-3 недели позже, к тому же, наблюдается высокая частота серонегативной HDV-инфекции. Выявление РНК HDV с помощью ПЦР позволяет надёжно и максимально рано обнаруживать возбудителя.

Вирус гепатита D подавляет репликацию вируса гепатита В. Как правило, показанием к исследованию на наличие HDV является отсутствие ДНК вируса гепатита В или низкая концентрация ДНК HBV в плазме крови у хронически инфицированного пациента при наличии синдрома цитолиза (или других признаков поражения печени).

Из вышесказанного следует, что всех пациентов с вновь выявленным ВГВ, необходимо тестировать на наличие HDV. Наиболее логичным и правильным является формат одновременного выявления ДНК HBV и РНК HDV как с целью скрининга, так и дифференциальной диагностики. Данный формат максимально оперативен, информативен, позволяет более точно определить прогноз течения заболевания и немедленно внести коррективы в схему лечения.

Целью данной работы является разработка и апробация набора реагентов для одновременного выявления ДНК HBV и РНК HDV в клиническом материале.

Результаты. В ЦНИИ Эпидемиологии был разработан набор реагентов «АмплиСенс HBV/HDV-FL». Данный набор реагентов предназначен для одновременного выявления РНК вируса гепатита D и ДНК

вируса гепатита В в одной пробирке методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. ДНК HBV, РНК HDV и экзогенный внутренний контроль детектируются независимо по 3 каналам. Реакция обратной транскрипции совмещена с реакцией амплификации, что упрощает процесс работы врачей-лаборантов и сокращает количество ошибок при подготовке реакционных смесей. ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени позволяет добиться максимальной чувствительности и специфичности выявления.

Набор реагентов адаптирован под универсальную программу амплификации, что позволяет одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов (например, совместно с тестами для количественного определения ДНК HBV, выявления РНК HCV, генотипирования HCV и др.). Набор реагентов «АмплиСенс HBV/HDV -FL» адаптирован под автоматические станции пробоподготовки и неавтоматизированные методы выделения нуклеиновых кислот (сорбционные и преципитационные) с различным объёмом исследуемого образца от 100мкл до 1000мкл.

Аналитическую чувствительность разработанного набора реагентов определяли на международной панели стандартов NIBSC (в случае HBV) и на стандартном образце предприятия (СОП) HDV (концентрация СОП измерена методом лимитирующих разведений). Аналитическая чувствительность «АмплиСенс HBV/HDV-FL» указана в Таблице 1.

Таблица 1. Определение аналитической чувствительности набора реагентов «АмплиСенс HBV/HDV-FL»

Объём образца для выделения, мкл	Метод выделения	Аналитическая чувствительность	
		HBV, МЕ/мл	HDV, копий/мл
100	Ручное выделение с реагентами «РИБО-сорб» и «РИБО-преп»	100	100
200	Ручное выделение с реагентами «МАГНО-сорб»	50	50
1000	Ручное выделение с реагентами «МАГНО-сорб» Автоматические станции пробоподготовки	10	10

Аналитическую специфичность набора реагентов исследовали посредством добавления в реакцию нуклеиновых кислот следующих организмов и вирусов: вирус гепатита А, вирус гепатита С, вирус иммунодефицита человека, цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барр, вирус простого герпеса типы 1, 2, вирус ветряной оспы, вирус герпеса человека типы 6, 8, парвовирус В19, вирус клещевого энцефалита, вирус лихорадки западного Нила, аденовирус типы 2, 3, 7, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Homo sapiens* и др. Перекрестные реакции для указанных организмов и вирусов зарегистрированы не были.

Клинические испытания проводились на образцах ранее протестированных референс методами. В качестве референс тест-систем использовали наборы реагентов разрешенные к производству и применению на территории РФ «АмплиСенс HBV-FRT» и «АмплиСенс HDV-EPh».

Испытания диагностической специфичности набора реагентов «АмплиСенс HBV/HDV-FL» проводили на 70 образцах здоровых доноров, не содержащих РНК HDV и ДНК HBV. Для всех 70 образцов положительные сигналы зарегистрированы не были (отсутствовали значения пороговых циклов (Ct)). Таким образом, специфичность исследуемого набора реагентов составила 100%.

Испытания диагностической чувствительности проводили на 75 образцах положительных по содержанию ДНК HBV и РНК HDV. Из 75 исследуемых образцов 35 содержали только ДНК HBV, 11 только РНК HDV (не детектируемый уровень ДНК HBV) и 29 образцов содержали одновременно ДНК HBV и РНК HDV. Дискордантных результатов с референс методами обнаружено не было. Таким образом, чувствительность исследуемого набора реагентов составила также 100%.

Вывод. Таким образом, разработанный во ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора набор реагентов «АмплиСенс HBV/HDV-FL» представляет собой удобный и надежный инструмент для выявления и оценки устойчивого ответа на лечение как моноинфекции HBV, так и коинфекции/суперинфекции с HDV.

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ИЗОЛЯТОВ ВГВ В РАМКАХ РАЗРАБОТКИ РОССИЙСКОЙ РЕФЕРЕНС ПАНЕЛИ СЫВОРОТОК HBSAG

Максютов Р.А., Гаврилова Е.В., Канев А.Н.

ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Россия

Введение. Вирус гепатита В вызывает острый и хронический вирусный гепатит. Приблизительно 5% мировой популяции инфицировано ВГВ и более чем 1 млн пациентов с хроническим ВГВ умирает каждый год. На основе высокой гетерогенности, ВГВ подразделяется на 8 (А-Н) генотипов с четким географическим распространением. Антигенные детерминанты поверхностного антигена ВГВ (HBsAg) подразделяются на десять иммунологических серотипов: ауw1, ауw2, ауw3, ауw4, адw2, адw3, адw4, аур, адrq-, адrq+. Присутствие HBsAg в сыворотках крови является четким серологическим маркером инфекции ВГВ и, к настоящему времени, разработано множество ИФА тест-систем для выявления поверхностного антигена. Однако, у некоторых пациентов с острым и хроническим гепатитом В или бессимптомных пациентов уровень HBsAg может быть слишком низок для детекции большинством диагностических наборов. Разработка референс панели сывороток ВГВ с известными концентрациями HBsAg определенных серотипов необходима для контроля качества диагностических тест-систем и качество вакцин против гепатита В, которые должны быть строго стандартизованы по HBsAg составу. Представление серотипов в референс панели должно соответствовать встречаемости различных серотипов ВГВ в той географической территории, в которой планируется использование референс панели. Национальная референс панель для РФ должна включать лиофилизированные сыворотки, содержащие образцы ВГВ серотипов ауw2, ауw3, адw2.

Цель и задачи. Главной целью исследования было определить генотипы и серотипы ВГВ в образцах сыворотки, собранных из различных географических регионов РФ для конструирования референс панели, содержащей все варианты HBsAg, циркулирующие в РФ. Референс панель необходима для государственного контроля качества сертифицированных HBsAg тест-систем и для сертификации вновь разрабатываемых диагностикумов. Данная работа также необходима, т.к. предоставит дополнительные знания о распределении ВГС генотипов и серотипов в РФ.

Материалы и методы. Было исследовано 343 образца сывороток крови, полученных от хронических носителей ВГВ из шести

городов, расположенных в различных регионах РФ: Краснодар, Нижний Новгород, Горный Алтай, Санкт-Петербург, Новосибирск, Хабаровск.

Выделение ДНК ВГВ проводили из 200 мкл сыворотки набором QIAamp DNA Mini kit (Qiagen) с последующей постановкой двух-раундовой ПЦР. Секвенирование нуклеотидной последовательности фрагмента S гена, включающего детерминанту А, проводили по обеим цепям на автоматическом секвенаторе ABI 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Филогенетический анализ фрагмента S гена проводили с использованием прототипных последовательностей ВГВ с помощью программы MEGA2.0.

Основные результаты. ДНК ВГВ была выявлена в 262 из 343 HBsAg-положительных образцов (76.4%). Нуклеотидная последовательность фрагмента S гена была определена для 72 произвольно выбранных образцов: 20 из Краснодара, 5 из Нижнего Новгорода, 15 из Горно-Алтайска, 8 из Санкт-Петербурга, 9 из Новосибирска, 15 из Хабаровска. Последующий филогенетический анализ фрагмента S гена длиной 404 п.н. показал принадлежность всех 20 изолятов ВГВ из Краснодара, 15 из Горно-Алтайска и 8 из Санкт-Петербурга генотипу D. 4 и 1 ВГВ изолят из Нижнего Новгорода, 8 и 1 из Новосибирска, 14 и 1 из Хабаровска были определены как генотипы D и A, соответственно. Таким образом, распределение генотипов ВГВ среди 72 образцов сыворотки составило: 69 (95.8%) для генотипа D и 3 (4.2%) для генотипа A (таблица 1). Генотипы B, C, E, F, G и H не были выявлены. Существует точная корреляция между иммунологическим серотипом ВГВ и аминокислотным составом HBsAg. В нашей работе, основываясь на выявленных аминокислотных остатках в 122, 127, 140, 159 и 160 позициях HBsAg, были субтипированы все 72 образца сыворотки с определенной последовательностью S гена. Распределение серотипов ВГВ среди 69 образцов сыворотки с генотипом D было следующим: 38 были серотипа ауw2 (55.1%), 30 – ауw3 (43.5%), 1 – адw2 (1.4%). Все 3 образца сыворотки генотипа A были определены как серотип адw2 (100%). Таким образом, распределение серотипов ВГВ различалось в нескольких городах РФ. Распределение серотипов ВГВ было схожим в Санкт-Петербурге и Хабаровске с доминированием серотипа ауw3 (87.5% и 93.3%, соответственно), тогда как серотип ауw2 был уникальным в Горно-Алтайске. Все три серотипа ауw2, ауw3 и адw2 были выявлены в Нижнем Новгороде и Новосибирске с доминированием серотипа ауw2.

Таблица 1. Распределение генотипов и серотипов ВГВ

Город	Генотип А		Генотип D	
	adw2	ayw3	ayw2	adw2
Санкт-Петербург	–	7 (87.5%)	1 (12.5%)	–
Краснодар	–	7 (35%)	13 (65%)	–
Нижний Новгород	1 (20%)	1 (20%)	3 (60%)	–
Новосибирск	1 (11.1%)	1 (11.1%)	6 (66.7%)	1 (11.1%)
Горно-Алтайск	–	–	15 (100%)	–
Хабаровск	1 (6.7%)	14 (93.3%)	–	–
Всего	3 (4.2%)	30 (41.7%)	38 (52.7%)	1 (1.4%)

Закключение/выводы. Было определено распределение генотипов и серотипов 72 образцов ВГВ из городов, расположенных в различных географических регионах. Все 72 образца сыворотки были включены в референс панель. Национальная референс панель, состоящая из лиофилизированных сывороток, содержащих образцы ВГВ с D/ayw2, D/ayw3, A/adw2 и D/adw2 комбинациями генотипов и серотипов, предназначена для государственного контроля специфичности и чувствительности сертифицированных тест-систем как для выявления концентрации HBsAg, так и для детекции его различных серотипов. Также в нашей работе впервые был обнаружен образец сыворотки с комбинацией генотипа D и серотипа adw2. Ранее такая комбинация генотипа и серотипа не выявлялась.

Раздел 3.
ТУБЕРКУЛЕЗ

ОСОБЕННОСТИ АПОПТОЗА ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ПРИ ДЕЙСТВИИ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЁЗНЫХ ПРЕПАРАТОВ ОСНОВНОГО РЯДА IN VITRO

Васильева О.А.

*ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет
Росздрава, Томск, Россия*

В последние годы во многих странах, независимо от уровня их экономического развития, отмечается увеличение заболеваемости и распространенности туберкулёза лёгких. Одной из главных причин недостаточной эффективности лечения являются побочные реакции на противотуберкулёзные препараты. Возникая в процессе комбинированной химиотерапии, они существенно ограничивают её возможности и снижают эффективность лечения больных туберкулёзом лёгких по основным показателям – срокам прекращения бактериовыделения и частоте закрытия каверн. Несмотря на большой опыт применения противотуберкулёзных препаратов, проблема их побочного действия на макроорганизм до настоящего времени остаётся актуальной. Поскольку доклинические и клинические испытания не позволяют выявить весь спектр возможных нежелательных побочных реакций на препараты, очевидна необходимость продолжения исследований и оценки негативных реакций на лекарственные средства и после внедрения их в практику. В соответствии с современными представлениями о патогенезе туберкулеза процессы внутриклеточного метаболизма, митохондриальные, тиоловые и кальций-зависимые механизмы участвуют в реакциях апоптоза, приводящих к развитию остро прогрессирующих форм микобактериальной инфекции.

В связи с вышеизложенным, целью настоящего исследования явилось изучение прямого действия основных противотуберкулёзных препаратов (ПТП) (изониазид, рифампицин, этамбутол) на апоптоз лимфоцитов крови у здоровых доноров и больных инфильтративным туберкулёзом лёгких с лекарственной чувствительностью и устойчивостью возбудителя.

Материалы и методы.

В основу исследования положены результаты обследования 60 впервые выявленных больных с инфильтративным туберкулёзом лёгких (ТЛ) в возрасте от 18 до 55 лет (47 мужчин и 13 женщин) и 25 здоровых доноров с сопоставимыми характеристиками по полу и возрасту. Материалом исследования служила периферическая кровь, взятая утром натощак из локтевой вены в количестве 10 мл. Уровень

апоптоза лимфоцитов у больных туберкулёзом лёгких оценивали до начала проведения специфической противотуберкулёзной химиотерапии. Выделение мононуклеарных лейкоцитов периферической крови осуществляли методом градиентного центрифугирования. Для оценки влияния ПТП на апоптоз лимфоцитов субстанции химиопрепаратов («Sigma», США) добавляли в среду для культивирования клеток (RPMI-1640) в дозах, сопоставимых с сывороточной концентрацией этих препаратов с учетом фармакокинетических сведений. Конечная концентрация исследуемых ПТП в культуральной среде составила 10 мкг/мл – для изониазида и рифампицина и 25 мкг/мл – для этамбутола. В контрольные пробы вносили полную среду RPMI-1640. Для оценки апоптоза клетки культивировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 20 ч. После инкубации пробирки встряхивали, центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин, осадок использовали для подсчета CD95+ и annexin V положительных лимфоцитов. Определение CD95+ клеток производили с помощью моноклональных антител фирмы «Сорбент» (Москва, Россия) в лимфоцитотоксическом тесте. Детекцию апоптотических лимфоцитов периферической крови осуществляли с помощью набора Annexin V Fitc [«Beckman Coulter», Франция] методом люминесцентной микроскопии. Для оценки достоверности различий выборок, распределение которых не соответствовало нормальному закону, использовали непараметрический Mann Whitney U test для независимых выборок и Wilcoxon matched pairs test для зависимых выборок.

Результаты исследования.

В результате определения уровня фоновой экспрессии молекул CD95 на поверхности лимфоцитов обнаружили, что исходное количество клеток, предуготовленных к апоптозу, у больных с лекарственно-чувствительным туберкулезом легких (ЛЧТЛ) в 1,4 раза превышало их уровень в группе сравнения, а у больных с лекарственно-устойчивым туберкулезом легких (ЛУТЛ) было сопоставимо с контролем. При этом уровень спонтанного апоптоза лимфоцитов (по количеству annexin V+ клеток) у больных инфильтративным ТЛ оставался в пределах нормы. После инкубации с изониазидом среднее количество CD95+ и annexin V-презентирующих лимфоцитов у больных ТЛ и у здоровых доноров в среднем увеличивалось в 2 раза ($p < 0,05$) относительно исходного его уровня. При этом существенных различий между величинами показателя апоптоза в сравниваемых группах установлено не было. Добавление в культуру клеток рифампицина также приводило к значительному увеличению числа CD95+ и annexin V-положительных лимфоцитов в сравнении с их фоновым количеством во всех группах исследования. Наряду с этим, у больных

с лекарственно-чувствительным вариантом ТЛ число CD95⁺ лимфоцитов превышало норму. В результате оценки количества клеток, вступивших в раннюю фазу апоптоза, при действии рифампицина у больных ЛЧТЛ и ЛУТЛ регистрировались значения, превышающие соответственно в 1,5 ($p < 0,05$) и 1,6 ($p < 0,05$) раза аналогичные показатели у здоровых доноров. Воздействие этамбутола сопровождалось статистически достоверным увеличением числа лимфоцитов, подготовленных к апоптозу и вступивших в раннюю фазу клеточной гибели, как у пациентов с ТЛ вне зависимости от чувствительности возбудителя к ПТП, так и в группе контроля. Сравнительный анализ представленных результатов у больных ТЛ в зависимости от исследуемого ПТП не выявил достоверных различий между группами.

Заключение.

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что противотуберкулёзные препараты основного ряда способствуют индукции апоптоза лимфоцитов *in vitro*, что может приводить к нарушению формирования антигенспецифического ответа при туберкулёзе легких вследствие дефицита специфических Т-клеток и нарушения их функциональной активности. При достаточной выраженности этих иммуноингибирующих воздействий отсутствие радикального и стойкого антибактериального эффекта данных препаратов делает больного беззащитным перед лицом неискорененной инфекции.

Раздел 4.

ВИРУСЫ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА И РШМ

ВЫЯВЛЕНИЕ ВПЧ ВЫСОКОГО КАНЦЕРОГЕННОГО РИСКА У ЖЕНЩИН РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА

Андосова Л.Д., Контрощикова К.Н., Куделькина С.Ю., Михалева О.В., Блатова О.Л.

*ГОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия»
Росздрава, Медицинский центр «Тонус», Нижний Новгород, Россия*

Проблема диагностики и лечения заболеваний, обусловленных вирусом папилломы человека (ВПЧ) продолжает привлекать внимание врачей различных специальностей в виду достоверного резкого роста заболеваемости во всем мире, значительной контагиозности и доказанной высокой онкогенности определенных типов ВПЧ. В связи с этим вопрос ранней диагностики ВПЧ остается актуальным и в настоящее время. Одним из наиболее удобных на сегодняшний день методов, позволяющих обнаружить вирус, а также дать ответ на вопрос, каким генотипом ВПЧ произошло заражение, сколько генотипов присутствует одновременно, какова вирусная нагрузка, является метод ПЦР в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ).

В данной работе представлены результаты ПЦР-диагностики формат «реальное время» вирусов папилломы человека высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР), отмечены частота встречаемости, кратность инфицирования, вирусная нагрузка у женщин репродуктивного возраста в г. Нижнем Новгороде.

Материалом для исследования служили соскобы эпителия цервикального канала, взятые с использованием одноразовых универсальных зондов в транспортную среду торговой марки «АмплиСенс» для материала из урогенитального тракта женщин. Для выявления и определения генотипа ВПЧ использовали тест-систему «Ампли Сенс ВПЧ ВКР генотип-Fl», «Ампли Сенс ВПЧ ВКР скринтитр-Fl». Наборы данных реагентов предназначены для выявления, дифференциации и количественного определения ДНК ВПЧ ВКР 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 типов в клиническом материале методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. Принцип метода основан на одновременной амплификации (мультикомплекс – ПЦР) в одной пробирке участков ДНК трех типов ВПЧ и участка ДНК β -глобинового гена, используемого в качестве эндогенного внутреннего контроля. ПЦР-анализ на наличие ДНК двенадцати типов ВПЧ проводится в четырех пробирках. Каждый тип регистрируется по своему каналу флуоресценции, что позволяет не только выявлять, но и определять генотип обнаруженного ВПЧ ВКР. Концентрацию ДНК ВПЧ в исследуемых пробах определяли с помощью стандартных кривых, построенных с использованием ВПЧ клонов данных типов. Вирусную нагрузку рассчитывали как

количество копий ДНК ВПЧ, выраженное в lg на 10⁵ клеток. Полученный материал исследовали методом ПЦР-РВ с использованием анализатора «iQ5» Cycler («Bio-RAD», США), комплекта тест-систем ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора. За период с декабря 2009 года по август 2010 года на генотипы ВПЧ ВКР было обследовано 1026 женщин в возрасте от 16 до 50 лет. Анализ частоты выявления различных генотипов ВПЧ показал, что 56, 51 и 16 типы были обнаружены чаще других, в 30 и 15 процентах случаев, соответственно (табл. 1).

Таблица 1. Частота выявления различных генотипов ВПЧ ВКР

Типы ВПЧ ВКР	56	51	16	31	39	52	58	18	45	33	59	35
Частота выявления, %	29,8	15,4	15,2	7,8	6,5	6,2	4,8	4,0	3,3	3,2	2,5	1,3

Доминировали геноварианты 31 (7,8%), 39 (6,5%), 52 (6,2%). Частота распространения остальных генотипов варьировала от 1% до 5%. В материале у 54,8% обследованных пациенток присутствовал только один генотип ВПЧ ВКР, у 26,2% было выявлено два генотипа. Три и более генотипов вируса папилломы выявлено при обследовании 104 женщин (19%): 3 типа – 62 пациентки (11,3%), 4 типа – 26 (4,8%), 5 типов – 12 (2,2%), 6 типов – 3 (0,5%), 7 типов – 1 человек (0,2%).

При исследовании распределения вирусной нагрузки среди ВПЧ-позитивных лиц, группа 780 человек, показано, что количество женщин, содержащих клинически значимую концентрацию ВПЧ, составляет 56,9% - 444 человека, чаще всего встречается концентрация 3 – 5 lg на 100 тыс. клеток 275 (35,2%), далее следует 2 – 3 lg – 165 (21,1%), концентрация 5 – 6 lg – 87 женщин (11,1%). Количество пациенток, содержащих клинически значимую концентрацию ВПЧ больше группы с клинически малозначимой концентрацией 444/272, в процентном отношении 57% против 35%. Группа 169 женщин – (21,7%) содержит ВПЧ с вирусной нагрузкой обозначаемой как «порог прогрессии» – 5 lg и более на 100 тыс. клеток, т.е. это группа, которая требует дальнейшего обследования и наблюдения.

Среди обследованных пациенток в 73,4% случаев ДНК ВПЧ была обнаружена у лиц, в возрасте от 16 до 30 лет, в 26,6% – у лиц 30 лет и старше.

Выводы. Генодиагностика папилломавирусной инфекции позволяет быстро с высокой чувствительностью и специфичностью выявлять этиологический фактор возможной патологии, определять группы риска по онкозаболеваниям уrogenитального тракта у женщин.

Раздел 5.

ИНФЕКЦИИ ОРГАНОВ РЕПРОДУКЦИИ

ВЫЯВЛЕНИЕ МУТАЦИЙ УСТОЙЧИВОСТИ MYCOPLASMA GENITALIUM К МАКРОЛИДАМ В ПРОЦЕССЕ ЛЕЧЕНИЯ ДЖОЗАМИЦИНОМ ПАЦИЕНТОВ С УРЕТРИТОМ

Гущин А.Е.¹, Рыжих П.Г.¹, Гомберг М.А.², Бурцев О.А.³, Шипулин Г.А.¹.

¹ФГУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва

²Московский государственный медико-стоматологический университет, г. Москва

³ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий», г. Москва

В настоящее остается проблема выбора наиболее эффективной терапии инфекции вызванной *M.genitalium*. Клинические наблюдения показывают, что использование тетрациклиновых препаратов в большинстве не эффективно и препаратами первого ряда при лечении инфекции, вызванной *M.genitalium*, являются макролиды. Однако режим и дозировка препаратов остаются предметом изучения, поскольку возникают случаи рецидивов инфекции. На сегодня установлено, что при лечении макролидами рецидив инфекции связан с возникновением устойчивых к этим препаратам изолятов микроорганизмов. Устойчивость развивается в результате появления точечных мутаций в различных участках генома микроорганизмов и преимущественно в гене 23S рНК. Известно, что антибиотик в клетке блокирует синтез белка, связываясь с 23S-субъединицей рНК, а возникающие точечные мутации препятствуют данному взаимодействию и, тем самым, обеспечивают микроорганизму устойчивость. Ранее в работе J.Jensen (CID 2008:47/1547) было установлено, что резистентность *M.genitalium* к азитромицину связана с мутациями в V домене гена 23S рНК. Устойчивость данного возбудителя к другим представителям класса макролидов не исследовалась.

Цель исследования. Становить связь между генотипом *M.genitalium* в области гена 23S рНК с результатами лечения джозамицином.

Материалы и методы.

В исследование были включены 49 пациентов с диагнозом уретрит, у которых была установлена инфекция, вызванная *M.genitalium* с помощью метода ПЦР с использованием набора реагентов «Амплисенс *M.genitalium*-Fl». У данных пациентов лабораторные исследования, включая метод ПЦР с использованием наборов реагентов «Амплисенс *N.gonorrhoeae*-screen-Fl», «Амплисенс *C.trachomatis*-Fl», «Амплисенс *T.vaginalis*-Fl», показали отсутствие других возбудителей ИППП. Пациентам

была назначена стандартное лечение джозамицином 500 мг 3 раза в день в течение 10 дней. Пациентам проводили мониторинг клинических и лабораторных показателей, включая наличие ДНК *M.genitalium*, до начала лечения, в процессе терапии (на 3 и на 8 день), и после окончания терапии (на 2-й и 38 дни). Все образцы, в которых на протяжении исследования обнаруживалась ДНК возбудителя, повторно исследовались методом ПЦР с праймерами, предложенными J.Jensen, к фрагменту 23S рДНК. Полученный продукт амплификации размером 147 п.о. секвенировали и анализировали на наличие точечных мутаций.

Результаты.

Из 49 обследованных пациентов у 3-х на разных сроках после окончания лечения наблюдался рецидив инфекции, сопровождавшийся возвращением клинических проявлений уретрита, повышением уровня лейкоцитов при микроскопии на фоне положительных результатов ПЦР. Молекулярно-генетический анализ показал, что у всех обследованных пациентов, включая тех, что не ответили на лечение, до начала терапии была обнаружена *M.genitalium* «дикого» генотипа». Кроме того, у всех пациентов, ответивших на терапию джозамицином, «дикий» генотип сохранялся до момента исчезновения *M.genitalium*. У 3 пациентов, которые не ответили на лечение, «дикий» генотип сохранялся до поздних сроков терапии. При рецидиве инфекции были обнаружены точечные мутации в гене 23SpPHK, в положениях, в которых данные мутации ассоциированы с резистентностью к различным макролидам у других микроорганизмов, включая микоплазмы. В двух случаях наблюдалась замена А на G в положении 2059 (нумерация *E.coli*). У одного пациента была выделена *M.genitalium* с мутацией А на G в положении 2062 (нумерация *E.coli*).

Выводы. Данное исследование показало, что при лечении уретрита, вызванного *M.genitalium*, макролидами (джозамицином) рецидив заболевания связан с появлением точечных мутаций в гене 23SpPHK. Одна из этих мутаций (A2062G) впервые описана для *M.genitalium*. Мутации не обнаруживаются до начала и в процессе лечения и выявляются либо поздних сроках терапии, либо через несколько дней после отмены препарата.

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ *TRICHOMONAS VAGINALIS* НА ОСНОВЕ ТЕХНОЛОГИИ НАСБА В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Рыжих П.Г., Гуштин А.Е., Шипулин Г.А.

ФГУН «ЦНИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора, г. Москва, Россия

Введение.

Trichomonas vaginalis играет важную роль в развитии воспалительных заболеваний урогенитального тракта мужчин и женщин. Клинические симптомы трихомонадной инфекции довольно часто стерты и не специфичны, что делает необходимым применение лабораторных методов диагностики. На сегодняшний день культуральный метод диагностики трихомониаза, является «золотым стандартом» - высокочувствительным и высокоспецифичным. Но его существенными минусами являются длительность исполнения (от 2-х до 7-ми суток), высокие требования к качеству питательных сред и условиям транспортировки клинического материала. Более быстрый и недорогой метод микроскопии окрашенного мазка наиболее популярен среди методов лабораторной диагностики трихомонадной инфекции в Российской Федерации. Однако высокая субъективность и низкая чувствительность микроскопии при бессимптомной инфекции существенно перевешивают плюсы метода. С появлением методов амплификации нуклеиновых кислот, наиболее известный из которых – ПЦР, появились новые возможности для диагностики *T.vaginalis*. Данные методы становятся инструментами выбора в диагностике многих инфекций благодаря высокой чувствительности и специфичности. Помимо ПЦР – метода амплификации ДНК, все больше внимания стали привлекать методы амплификации РНК, к которым относится реакция транскрипционной амплификации НАСБА (NASBA – Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) (BioMerieux). Использование в качестве мишени РНК дает целый ряд преимуществ перед ПЦР. Во-первых, количество рибосом в одной клетке содержится от нескольких тысяч до нескольких десятков тысяч, в зависимости от фазы жизненного цикла микроорганизма. Во-вторых, в то время как ДНК – достаточно стабильный материал и обнаружение ДНК еще не означает наличие жизнеспособных микроорганизмов, РНК – наоборот крайне нестабильный материал и достаточно быстро деградирует при гибели и разрушении клеток микроорганизмов. Это дает возможность не только более правильно судить о наличии текущей инфекции, но и более точно и надежно оценивать результаты проведенного лечения. В-третьих, поскольку, метод ПЦР является наиболее чувствительным

и специфичным методом для диагностики *T.vaginalis* по сравнению с бактериоскопией и культуральным посевом, то НАСБА может использоваться в качестве референсного метода для подтверждения результатов ПЦР.

Целью нашей работы стала разработка и апробация набора реагентов для диагностики *T.vaginalis* на основе технологии НАСБА в реальном времени.

Материалы и методы.

В работе был использован «Базовый набор «Nuclisens», который включает в себя комплект реагентов для экстракции РНК из клинического материала и комплект реагентов для проведения амплификации (солевые компоненты, ДНТФ, комплекс ферментов в виде лиофилизированной сферы с АМV- обратной транскриптазой, T7 РНК-полимеразой, РНКазойН и необходимые для их растворения компоненты).

Нами были разработаны реагенты, специфичные к мишени. Были выбраны праймеры и флуоресцентно-меченый зонд для специфического участка 18S рРНК *T.vaginalis* на основе информации международного банка генетической информации GenBank; получены рекомбинантные количественно охарактеризованные препараты внутреннего контрольного образца (ВКО) и положительного контрольного образца (ПКО), а также флуоресцентно-меченый зонд к ВКО. Реакцию NASBA с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени проводили с использованием прибора «Rotor-Gene Q» («Qiagen», Германия).

В рамках апробации разработанного набора реагентов проводили сравнение с зарегистрированным набором реагентов на основе ПЦР «АмплиСенс *Trichomonas vaginalis*-FL» (№ ФСР 2009/06556 от 31 декабря 2009 г.) производства ФГУН ЦНИИ эпидемиологии согласно инструкции производителя на чистой культуре *T.vaginalis*, которую получали с помощью диагностической среды «Vagicult» («Orion Diagnostica», Финляндия), согласно инструкции производителя. Кроме того было проведено исследование на клиническом материале – соскобного отделяемого урогенитального тракта мужчин и женщин.

Результаты.

В результате проведенной работы по оптимизации условий анализа был разработан набор реагентов «АмплиСенс® *Trichomonas vaginalis*-РИБОТЕСТ» на основе технологии НАСБА в реальном времени. С использованием рекомбинантного препарата РНК ПКО было установлено, что предел детекции реакции амплификации набора составил 50-100 копий РНК. Сравнение пределов детекции двух технологий – ПЦР и НАСБА проводилось на чистой культуре

T.vaginalis, полученной из клинического материала. Для этого из исходного образца культуры готовили серию 10-кратных разведений, из которых выделяли нуклеиновые кислоты и проводили амплификацию разработанным набором для НАСБА в сравнении с ПЦР тест-системой «АмплиСенс *Trichomonas vaginalis*-FL», использующей праймеры к фрагменту ДНК повторов в геноме трихомонад. Каждое разведение тестировалось в трех повторах. Исследования показали как минимум стократное превышение предела детекции НАСБА по сравнению с ПЦР (см. таблицу 1) на трех образцах культуры, полученных от трех разных пациентов в разные временные периоды.

Таблица 1. Сравнение пределов детекции методов ПЦР и НАСБА на 10х разведениях культуры *T.vaginalis*

Разведения	Культура 1		Культура 2		Культура 3	
	ПЦР*	NASBA	ПЦР*	NASBA	ПЦР*	NASBA
10 ⁻¹	3 из 3	3 из 3	3 из 3	3 из 3	3 из 3	3 из 3
10 ⁻²	3 из 3	3 из 3	3 из 3	3 из 3	3 из 3	3 из 3
10 ⁻³	3 из 3	3 из 3	3 из 3	3 из 3	3 из 3	3 из 3
10 ⁻⁴	3 из 3	3 из 3	2 из 3	3 из 3	3 из 3	3 из 3
10 ⁻⁵	1 из 3	3 из 3	0 из 3	3 из 3	3 из 3	3 из 3
10 ⁻⁶	0 из 3	3 из 3	0 из 3	1 из 3	0 из 3	3 из 3
10 ⁻⁷	0 из 3	1 из 3	0 из 3	0 из 3	1 из 3	3 из 3
10 ⁻⁸	0 из 3	0 из 3	0 из 3	0 из 3	0 из 3	0 из 3

*«АмплиСенс *Trichomonas vaginalis*-FL»

Расчеты показали, что указанный предел детекции обеспечивает аналитическую чувствительность ПЦР позволяющую определять возбудитель, в концентрации 5х10² клеток *T.vaginalis* на мл. С учетом полученных результатов методом НАСБА можно обнаруживать возбудитель при концентрации как минимум в 10-100 раз меньше, т.е. до 5-50 клеток в мл.

Апробация набора реагентов «Амплисенс *Trichomonas vaginalis*-РИБОТЕСТ» на основе НАСБА в реальном времени была проведена на клиническом материале (соскобах из уретры и цервикального канала) полученном от 154 пациентов, которые были разделены на 2 группы. У пациентов первой группы (n=54) трихомонадная инфекция была установлена на основании ПЦР-исследования с помощью набора реагентов «Амплисенс *Trichomonas vaginalis*-FL». РНК *Trichomonas vaginalis* была обнаружена с помощью разработанного набора реагентов в 54 образцах из 54. Вторая группа пациентов (n=100) выступала в

качестве контрольной. У пациентов данной группы результаты ПЦР на *T.vaginalis* были отрицательными. РНК *T.vaginalis* также не была обнаружена методом НАСБА ни в одном из образцов контрольной группы.

Заключение.

Впервые был разработан набор реагентов для выявления *T.vaginalis* в клиническом материале на основе технологии НАСБА в реальном времени - «Амплиценс *Trichomonas vaginalis*-РИБОТЕСТ». Предел детекции данного набора на чистой культуре в 100 раз выше по сравнению с ПЦР. Диагностическая чувствительность двух молекулярно-биологических методов на исследованном клиническом материале совпадала. Разработанный набор реагентов может использоваться для лабораторной диагностики урогенитального трихомониаза. На данный набор получено регистрационное удостоверение (№ ФСР 2010/07305 от 22 апреля 2010 г) разрешающее его использование в клинической лабораторной практике.

Раздел 6.

**ИНФЕКЦИИ С ФЕКАЛЬНО-ОРАЛЬНЫМ
МЕХАНИЗМОМ ПЕРЕДАЧИ**

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ В ИЗУЧЕНИИ ЦИРКУЛЯЦИИ РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОТИПОВ РОТАВИРУСОВ СРЕДИ ДЕТЕЙ В УКРАИНЕ

Дзюблик И.В., Обертинская О.В., Соловьев С.А., Костенко И.Г., Трохименко Е.П., Вороненко С.Г., Ковалишин Г.Г., Ковалюк О.В., Самборская И.Ф., Жеребко Н.Н.

Национальная медицинская академия последипломного образования имени П.Л.Шупика, Киев, Украина

Острые кишечные инфекции (ОКИ) представляют одну из наиболее значимых проблем здравоохранения во всех странах мира. Спектр возбудителей, вызывающих ОКИ, разнообразен и включает в себя патогенные и условно-патогенные бактерии, простейшие а также вирусы. Среди них именно ротавирусам принадлежит ведущая роль в структуре вирусных диаррейных заболеваний у новорожденных и детей в возрасте до 5 лет. Ежегодно во всем мире миллионы детей заболевают тяжелой формой ротавирусной диареи, из которых более 440 тыс. умирают, главным образом в развивающихся странах [1]. В 2006 году только в странах Европейского Союза было зарегистрировано 3,6 млн случаев ротавирусной инфекции, 87 тыс. госпитализаций, 213 летальных исходов [2]. В Украине ОКИ вирусной этиологии изучены недостаточно хорошо, в связи с тем, что обследование пациентов с симптомами гастроэнтеритов проводится преимущественно на наличие бактериальных патогенов с использованием стандартных микробиологических методов. В редких случаях этот перечень дополняется исследованием клинического материала простыми/быстрыми тестами или применяют коммерческие иммуноферментные тест-системы для выявления антигенов ротавирусов группы А. В результате, почти половина случаев ОКИ (28 381- 46 134 ежегодно) остаются этиологически не расшифрованными и относятся к кишечным инфекциям неустановленной этиологии [3]. Однако, в настоящее время разработаны тест-системы для выявления РНК ротавирусов методом ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и методом мультиплексной ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» и в реальном времени [4]. Методы G/P-генотипирования ротавирусов с использованием ОТ-ПЦР стали применяться в качестве современного «инструмента» при изучении циркуляции ротавирусов среди людей в разных регионах мира и это сегодня особенно актуальны в контексте реализации программ по вакцинопрофилактике ротавирусной инфекции у детей.

Цель работы состояла в изучении особенностей циркуляции ротавирусов среди детей с ОКИ в различных городах Украины методами молекулярной диагностики, а также определение доминирующих G/P генотипов методом ОТ-ПЦР.

Материалы и методы. Нами было исследовано 600 образцов фекалий от детей в возрасте до 5 лет с ОКИ из 6 городов Украины: (Харьков, Одесса, Чернигов, Суммы, Львов, Киев), отобранных в период с ноября 2006 по май 2007 гг. Клинические образцы исследовали методом ИФА с использованием тест-систем Ridascreen® ELISA (R-biopharm, Германия) и методом ОТ-ПЦР тест-системой АмплиСенс® Rotavirus-EPH (ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора). Генотипирование ротавирусов в позитивных пробах проводили с набором праймеров, специфичных для различных генотипов ротавирусов по методу [5].

Результаты. Показано, что за исследуемый период в структуре ОКИ вирусной этиологии в разных городах Украины ротавирусы составляли: во Львове – 51 %, в Одессе – 42%, в Чернигове и Суммах – 15 %, в Харькове – 30 %, в Киеве – 20 %. Подтверждена зимне-весенняя сезонность ротавирусной инфекции, максимальное число случаев РВИ было выявлено у детей в январе-феврале месяцах 2007г. В возрастной группе детей до 3 лет средняя частота выявления ротавирусов была наибольшей и составила 70,1+4,0 %.

В результате генотипирования отобранных 210 позитивных образцов в 176 случаях (83,8%) были выявлены Р-генотипы и в 182 случаях G-генотипы ротавирусов (86,6%). В 3,3 % образцов не было выявлено Р-генотип, в 4,3 % - G-генотип, и в 5,7 % случаев не выявлялись оба генотипа. В исследуемый период была выявлена циркуляция четырех основных генотипов ротавирусов группы А: P[8]G1, P[8]G4, P[8]G3, P[4]G2. Следует отметить, что в Киеве, Львове, Одессе и Харькове большинство случаев ротавирусной инфекции (более 70%) было вызвано ротавирусом группы А с генотипом P[8]G1. В Суммах доминировал генотип P[8]G4. В Одессе в отдельных случаях были выявлены ротавирусы генотипа P[8]G9.

Заключение. Показано, что ротавирусы группы А были основной причиной развития в вирусных гастроэнтеритов у детей раннего возраста в Украине. Пик sporadicческой заболеваемости ротавирусной инфекцией приходился на январь-февраль. В исследуемый период была установлена циркуляция четырех основных генотипов ротавирусов группы А: P[8]G1, P[8]G4, P[8]G3, P[4]G2. Метод ОТ-ПЦР можно использовать для детекции ротавирусной инфекции и мониторинга за циркуляцией штаммов ротавирусов в Украине. Следует предположить, что антиротавирусные вакци-

ны, включающие аттенуированные или реассортантные штаммы ротавирусов с генотипом Р[8]G1 будут наиболее эффективными на территории Украины при планировании специфической профилактики РВИ у детей.

Литература:

1. Parashar U.D., Gibson C.J., Bresse J.S., Glass R.I. Rotavirus and severe childhood diarrhea // *Emerg. Infect. Dis.*-2006.-#12.-P.304-306.
2. Soriano-Gabarro M. Burden of rotavirus disease in European union countries /M. Soriano-Gabarro, J.Mrucowicz, T. Vesicari [et al.] // *Pediatric Infect. Dis.*-2006.-Vol.25.-P.7-11.
3. Кракович А.В. Епідеміологічна характеристика ротавірусної інфекції та шляхи удосконаллення епідеміологічного нагляду: Автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.02.02/ АМНУ ІЕІХ ім. Л.В. Громашевського. - 2006.-24 с.
4. Подколзин, А. Т. Разработка методик детекции возбудителей острых кишечных инфекций на основе мультиплексной ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации «по конечной точке»/ А. Т. Подколзин, Н. Ю. Абрамычева, Е. Б. Фенске и др.// *Генодиагностика инфекционных болезней: Материалы Российской научно-практической конференции (25-27 октября 2005 г., Новосибирская обл.)*- Новосибирск, 2005.-С.216-221.
5. Подколзин, А. Т. Адаптированная к практическому применению методика [P]G генотипирования ротавирусов группы А / А. Т. Подколзин, Е. Б. Фенске, Н. Ю. Абрамычева и др. // *Молекулярная диагностика-2007 : сб. тр. 6-ой Всерос. науч.-практ. конф. с международным участием.* – М., 2007. – Т. 3. – С. 284-286.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ HELICOBACTER PYLORI К МАКРОЛИДАМ МЕТОДОМ ПЦР

Махова М.А., Мазепа В.Н., Бруснигина Н.Ф. Черневская О.М., Орлова К.А., Сперанская Е.В., Барышева Н.Н., Скобло Л.Е., Кленина Н.Н., Бокарев А.А.

ФГУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия

Введение. Молекулярно-биологические методы, в частности полимеразная цепная реакция (ПЦР) в настоящее время широко используется для диагностики *Helicobacter pylori* у пациентов с гастродуоденальной патологией. Метод ПЦР обладает рядом преимуществ по

сравнению с остальными методами диагностики, а именно высокой чувствительностью и специфичностью, экспрессностью, а кроме того возможностью выявлять генетически закрепленные изменения в геноме возбудителя позволяющие ему проявлять устойчивость к ряду антимикробных препаратов. В настоящее время в стандартных схемах лечения хеликобактерной инфекции активно используются антибиотики из группы макролидов.

Однако микроорганизм выработал механизм устойчивости к этой группе препаратов, которая определяется генами детерминирующими синтез метилтрансфераз, способных изменять сайты распознавания антибиотиков - 23SpPНК. Перенос генов резистентности осуществляют транспозоны. При этом наблюдается перекрестная устойчивость ко всем макролидам.

Целью работы явилось изучение частоты встречаемости мутации в гене 23pSPНК *Helicobacter pylori*, которая позволяет микроорганизму проявлять резистентность к антибиотикам эритромицинового ряда (макролидам).

Материалы и методы. Материалом для исследования служили пробы биоптатов слизистой оболочки желудка и желудочного сока, забранные от пациентов с различными типами гастродуоденальной патологии. Выделение ДНК проводили с использованием набора «ДНК-сорб Б» («Интерлабсервис», Москва), для выявления ДНК *Helicobacter pylori* использовали ПЦР-тест-систему «АмплиСенс-*Helicobacter pylori*-520» («Интерлабсервис», Москва), для выявления устойчивости к эритромицину – «Эритропол» («Литех», Москва).

Результаты. В ходе исследований нами были проверены 149 проб, содержащие ДНК *Helicobacter pylori* на наличие гена метилтрансфераз, обуславливающих резистентность к макролидам. Были получены следующие результаты: 132 пробы (88,6%) оказались чувствительны к макролидам, в 17 случаях (11,4%) наблюдалась резистентность к антибиотикам данного ряда.

Заключение. В ходе исследований установлено, что резистентность *Helicobacter pylori* к макролидам составила 11,2%. Такая встречаемость устойчивости к макролидам характерна для стран с высоким потреблением макролидов, где уровень резистентности доходит в среднем до 10%. Таким образом, перед проведением курса антихеликобактерной терапии помимо выявления самого инфекционного агента может быть рекомендовано и проведение анализа генома *Helicobacter pylori* на выявление устойчивости к антибиотикам эритромицинового ряда.

ВЫЯВЛЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОППОРТУНИСТИЧЕСКИХ ИНФЕКЦИЙ У ДЕТЕЙ С ПАТОЛОГИЕЙ ТОНКОГО КИШЕЧНИКА

Орлова К.А., Мазепа В.Н., Бруснигина Н.Ф., Черневская О.М.,
Сперанская Е.В., Скобло Л.Е., Махова М.А., Кленина Н.Н.,
Барышева Н.Н., Глушкова О.А.*

ФГУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад.
И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия
ФГУ Нижегородский НИИ ДГЭ Росмедтехнологий, Нижний Новгород,
Россия

Целью данной работы явилось изучение частоты выявления возбудителей оппортунистических инфекций у детей с врожденной и приобретенной патологией тонкого кишечника (целиакия, хронический энтерит).

Материалы и методы. Для исследования использовался биоптат тонкого кишечника, взятый в стандартную микропробирку с транспортной средой согласно «Методическим рекомендациям по взятию, транспортировке, хранению и пробоподготовке биологического материала для ПЦР-диагностики». Пробирки с биоптатом доставлялись в лабораторию в течение 24 часов. Исследования проводились методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием коммерческих тест-систем, разработанных и производимых ЦНИИ эпидемиологии («Интерлабсервис», Москва). Обработка проб и выделение ДНК проводились сорбционным методом коммерческим набором «ДНК-сорб Б» производства ЦНИИ эпидемиологии. Реакция амплификации осуществлялась на термоциклере «Терцик 2М» («ДНК-технология», Москва). Визуализация результатов ПЦР проводилась методом электрофореза в 2% агарозном геле с последующей регистрацией при помощи видеосистемы «Биотест».

Результаты и их обсуждение. С 2007 по 2010 год было обследовано 157 детей с врожденной и приобретенной патологией тонкого кишечника (целиакия, хронический энтерит), у которых отсутствовал эффект на фоне проведения базисной терапии. Все дети находились на лечении в ФГУ Нижегородский НИИ детской гастроэнтерологии Росмедтехнологий. Пробы биоптата тонкого кишечника исследовались на наличие ДНК наиболее распространенных возбудителей оппортунистических инфекций: цитомегаловирус (ЦМВ), герпес 1,2 типа, герпес 6 типа, вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ), *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila psittaci*, *Chlamydophila pneumoniae*, бактерии рода *Mycoplasma*. Из общего числа исследованных проб биоптата 41,4% (65 проб) содержали тот или иной инфекционный агент.

Возбудители выявлялись как в моноинфекции, так и в микстинфекции. *Chlamydomphila psittaci*, *Chlamydomphila pneumoniae* не были выявлены ни в одной пробе.

Результаты представлены в таблице 1:

Инфекционный агент	Частота выявления инфекционного агента от числа положительных проб, %
Моноинфекции	83%
Микстинфекции	17%

В моноинфекции наиболее часто выявлялся ВЭБ (43% от числа положительных проб), в 30,8% случаев выявлялись бактерии рода *Mycoplasma*, герпес 1,2 типа ни разу не выявлялся в моноинфекции. В составе микстинфекции преобладали сочетания вирусов ЦМВ и ВЭБ с бактериями рода *Mycoplasma* (11% от числа положительных проб), 6% составили различные сочетания вирусов герпесгруппы. Результаты представлены в таблице 2:

Инфекционный агент	Частота выявления инфекционного агента от числа положительных проб, %
Вирус Эпштейна-Барр	43%
Герпес 6 типа	3%
Цитомегаловирус	6,2%
Бактерии рода <i>Mycoplasma</i>	30,8%
Герпес 1,2 типа+ ВЭБ	2%
ЦМВ+ бактерии рода <i>Mycoplasma</i>	1,7%
ВЭБ+ бактерии рода <i>Mycoplasma</i>	7,7%
ЦМВ+ герпес 6 типа	4%
ВЭБ+бактерии рода <i>Mycoplasma</i> + <i>Chlamydia trachomatis</i>	1,6%

Обследованные дети были представлены по двум нозологическим формам заболевания: целиакия и хронический рецидивирующий энтерит. Полученные в ходе работы результаты представлены в таблице 3:

Нозологическая форма	Количество пациентов, n	Количество положительных результатов, %	Частота выявления инфекционных агентов, от числа положительных проб, %	
			Моноинфекции	Микстинфекции
Целиакия	24	50%	83,3%	16,7%
Хронический энтерит	133	39,1%	82,7%	17,3%

При целиакии чаще всех выявлялись бактерии рода *Mycoplasma*, в том числе и в микстинфекции (66,7% от числа положительных результатов). При хроническом энтерите наиболее часто выявлялись представители герпес группы - 78,8% от числа положительных результатов, включая микстинфекции.

Выводы. Результаты исследования показали, что почти у половины обследованных детей, имеющих затяжное течение основного заболевания (целиакия, хронический энтерит) на фоне отсутствия эффекта при проведении базисного лечения, в биоптате тонкого кишечника выявляются возбудители оппортунистических инфекций.

При затяжном течении целиакии наиболее часто выявляются бактерии рода *Mycoplasma*, а при хроническом рецидивирующем энтерите – возбудители герпес – группы.

На основе полученных данных можно сделать вывод, что появление новых ПЦР тест-систем способствует совершенствованию диагностики тяжелых заболеваний, это позволяет своевременно выявить этиологический фактор и назначить этиотропную иммуномоделирующую терапию.

Раздел 7.

**ИНФЕКЦИИ БЕРЕМЕННЫХ
И НОВОРОЖДЕННЫХ**

ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСА У НОВОРОЖДЕННЫХ В СТАЦИОНАРЕ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Сапкина М.Р.², Пиянзин А.И.¹, Зайцев И.Ф.², Акинина З.Ф.²,
Лукопкина О.А.², Назарова Р.В.², Миллер Ю.В.², Мухортова О.А.²,
Калина Е.В.², Жукова Е.Н.², Воробьева Е.Н.¹

¹Алтайский государственный медицинский университет,

²Алтайская краевая клиническая детская больница, Барнаул, Россия

Диагностика вирусных заболеваний плода и новорожденного является одной из актуальных проблем акушерства и перинатологии. Цитомегаловирусная инфекция характеризуется разнообразием симптомов и преимущественно субклиническим течением. У новорожденных постановка диагноза должна основываться с учетом клинических данных и результатов лабораторного обследования. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в сочетании с другими методами является обязательной в выявлении врожденной или латентно протекающей инфекции, а также она необходима для разработки методов профилактики.

Цель работы. в стационаре с помощью метода ПЦР изучить у новорожденных частоту выявления цитомегаловируса в различных биологических жидкостях с учетом доношенности и преобладающей патологии.

Материалы и методы. Были обследованы новорожденные, находящиеся на лечении в Алтайской краевой клинической детской больнице в следующих отделениях: выхаживания недошенных, неврологии новорожденных, патологии новорожденных. Цитомегаловирус определяли в крови, секрете слюнных желез и моче методом полимеразной цепной реакции с использованием наборов НПФ «ЛИТЕХ».

Результаты. При обследовании 118 недоношенных процент положительных результатов в крови составил - 9,3, в слюне - 10,4, в моче - 12,8. У 136 новорожденных отделения неврологии частота выявления вируса в крови - 10,3%, слюне - 20,7%, моче - 21%. У детей отделения патологии новорожденных частота определения вируса была следующей: в крови - 9,5%, слюне - 15,7%, моче - 12,8%. Таким образом, в крови независимо от возраста и преобладающей патологии процент выявления цитомегаловируса был примерно одинаков. В секрете слюнных желез и моче положительный тест у новорожденных с неврологическими заболеваниями был значительно выше. Недошенные дети характеризовались более низкой частотой обнаружения цитомегаловируса во всех определяемых биологических жидкостях.

Выводы. Полученные результаты позволили в стационаре у новорожденных определить группы повышенного риска по развитию цитомегаловирусной инфекции, дали возможность более точно оценить состояние ребенка, выбрать наиболее правильную комплексную иммунную и противовирусную терапию и определить меры профилактики.

РАЗРАБОТКА ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ В ФОРМАТЕ ИММУНОЧИПА ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ И МОНИТОРИНГА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ВНУТРИУТРОБНЫХ ИНФЕКЦИЙ, ОБЪЕДИНЕННЫХ В ГРУППУ TORCH

**Чеканова Т.А., Пудова Е.А., Маркелов М.Л., Кирдяшкина Н.П.,
Гоптарь И.А., Шипулина О.Ю., Сафонова А.П., Скачкова Т.С.,
Сильвейстрова О.Ю., Романюк Т.Н., Кузницова С.В., Алексева Ю.А.,
Андрюшина Т.Ю., Манзенюк И.Н., Шипулин Г.А.**

*ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, г.Москва,
Россия*

Возбудители внутриутробных инфекций (инфекции, вызывающие патологию плода) в 1971 году ВОЗ были объединены в группу TORCH-инфекций. Название группы образовано начальными буквами латинских названий инфекций, наиболее часто вызывающих тяжелую внутриутробную патологию плода, невынашивание, мертворождение: «Т» - токсоплазма (*Toxoplasma*); «R» - краснуха (*Rubella*); «С» - цитомегаловирус (*Cytomegalovirus*); «Н» - герпес (*Herpes*); «О» - другие инфекции (*Other*), вызываемые парвовирусом B19, *Chlamydia trachomatis*, листериями и др.

Для данных инфекций лабораторная диагностика, основанная на методах выявления специфических антител, приобретает исключительное значение. Определение специфической реактивности (определение антител классов G и M) к инфекциям TORCH-комплекса еще до планируемой беременности позволяет своевременно выявить группы риска, принять меры профилактики.

В настоящее время существует большое количество иммуноферментных тест-систем, позволяющих выявлять антитела к вирусу краснухи, герпесу 1 и 2 типов, вирусу Эпштейн-Барр, токсоплазме, цитомегаловирусу и др. Вместе с тем, ни одна из существующих тест-систем не предусматривает одновременного выявления антител к спектру наиболее значимых антигенов разных классов в одной лунке.

В связи с этим, для выявления антител классов G, и M, по крайней мере, к основным классическим возбудителям инфекций комплекса TORCH (вирусам краснухи, герпеса, токсоплазме, цитомегаловирусу) требуется использование не менее восьми разных тест-систем, что существенно увеличивает объем анализируемого образца, необходимо для полноценного анализа, стоимость и время исследования.

Новый формат тест-систем на основе иммуночипов с флуоресцентной детекцией результатов позволяет повысить информативность исследований за счет возможности одновременного и отдельного выявления антител разных классов к широкому спектру антигенов возбудителей инфекций. Учитывая особенности иммунопатогенеза инфекций группы TORCH, мы поставили задачу разработать иммуночип для детекции антител классов G и M к диагностически значимым антигенам: GRA1 (p24), GRA7(p29), MIC3, SAG1 (p30) возбудителя токсоплазмоза - *Toxoplasma gondii*; E1, E2, core вируса краснухи; pp 28, pp 38, pp 52, pp 65, pp 150, protein mosaic цитомегаловируса; парвовируса B19; MOMP, pGp3, *Chlamydia trachomatis*; gD1, gG1 вируса герпеса 1 типа; gD2, gG2 вируса герпеса 2 типа; p18 (capside), p54 (ENA), EBNA вируса Эпштейн-Барр. Указанные антигены были клонированы, экспрессированы в *E.coli* и очищены с помощью высокоэффективной хроматографии. По своим характеристикам полученные антигены не уступают коммерческим препаратам. Все двадцать три рекомбинантных антигена были иммобилизованы в повторях на иммуносорбенте в пределах индивидуальных эрреев на активированном предметном стекле (25x75 мм).

Для производства иммуночипов мы использовали технологию пьезоэлектрической микропечати с помощью наноплоттеров, которые позволяют нанести нанокolicества биологических веществ как на активированные микроскопные слайды, так и на дно лунки полистиролового планшета для ИФА.

Дифференциальное выявление антител различных классов проводили за счет использования конъюгата, состоящего из смеси антител к IgG человека и антител к IgM человека, модифицированных различными по спектральным характеристикам флуорофорами, и учету результатов с помощью многоканального флуоресцентного сканера при активации соответствующих каналов. Обработку результатов сканирования проводили с помощью программного обеспечения, прилагаемого к сканеру. В настоящее время продолжается работа над созданием макета программы для качественной обработки флуоресцентных изображений и формирования клинического отчета.

Диагностическая тест-система содержит также растворы для разведения контрольных и исследуемых образцов, раствор для раз-

ведения конъюгата, раствор для промывки иммуносорбента, положительный контрольный образец (K+) и отрицательный контрольный образец (K-).

Общее время инкубаций иммуночипа с исследуемыми образцами и конъюгатом – 1 час. Для проведения анализа требуется 10 мкл сыворотки/плазмы крови.

Нами была сформирована представительная коллекция сывороток крови пациентов, содержащих и не содержащих антитела классов G и M, к возбудителям группы TORCH. При формировании коллекции образцов мы руководствовались данными исследований, проводимых на базе Центра молекулярной диагностики (ЦМД) ФГУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора с помощью коммерческих ИФА тест-систем.

Была выявлена высокая корреляция результатов тестирования в ИФА сывороток крови на наличие антител класса G, с данными, полученными с помощью иммуночипа (таб. 1).

Таблица. Совпадение результатов, полученных с помощью иммуночипа, с данными ЦМД ЦНИИЭ при тестировании сывороток на наличие антител класса G (всего- 600 образцов)

Определение IgG	% совпадения с результатами ИФА	
	по положительным сывороткам	по отрицательным сывороткам
T.gondii	97,6	97,6
CMV	97,6	100
HSV-1,2	97,6	97,7
Rubella	94,3	97,5
Ch.trachomatis (по антигену MOMP)	91,4	95,2

При тестировании 37 образцов, которые по данным ЦМД ЦНИИЭ содержали специфические антитела класса M (всего- 37 шт) к разным антигенам, в 34 образцах было подтверждено наличие антител при использовании иммуночипа. Вместе с тем, нами было дополнительно выявлено наличие антител класса M к разным антигенам в 12 клинических образцах. Дискордантные результаты могут быть объяснены тем, что в иммуночипе спектр антигенов возбудителей отдельно взятых инфекций шире по сравнению с ИФА-форматом.

Работа по оптимизации тест-системы и тестирование клинического материала в настоящее время продолжают, однако полученные нами данные позволяют уже сейчас делать выводы о высокой информативности, чувствительности и специфичности иммуночипа.

КЛИНИЧЕСКАЯ АПРОБАЦИЯ НОВОГО ТЕСТА НА ОСНОВЕ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ СТРЕПТОКОККОВ ГРУППЫ В У БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН И НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ

Шипицына Е.В.¹, Будиловская О. В.¹, Золотоверхая Е.А.¹,
Защиорская С.Л.¹, Рыбина Е.В.¹, Шипулина О.Ю.², Скачкова Т.С.²,
Романюк Т.Н.², Шипулин Г.А.², Савичева А.М.¹

¹Лаборатория микробиологии, НИИ акушерства и гинекологии
им. Д.О. Отта СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

²Лаборатория молекулярной диагностики, ЦНИИ эпидемиологии
Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение. Инфекции, вызываемые стрептококками группы В (*Streptococcus agalactiae*), относятся к числу наиболее значимых в акушерстве, так как они могут приводить к тяжелой патологии у беременных женщин и новорожденных детей. Важнейшей задачей в профилактике этих инфекций является своевременная лабораторная диагностика. В настоящее время для выявления *S. agalactiae* используется культуральный метод. К ограничениям метода относятся длительность культивирования (до двух суток) и отсутствие условий для бактериологических исследований в некоторых родовспомогательных учреждениях.

Цель. Целью данного исследования явилась клиническая апробация нового теста на основе ПЦР в реальном времени для выявления ДНК *S. agalactiae* у беременных женщин и новорожденных детей.

Материалы и методы. Клинические материалы (соскобы из цервикального канала, отделяемое влагалища, моча у женщин и мазки из зева, носа, уха, с кожи подмышечной впадины, меконий у детей) были получены от пациентов родовых и детских отделений НИИ АГ им. Д.О. Отта СЗО РАМН. Культуральное исследование на *S. agalactiae* включало посев на кровяной агар (Columbia blood agar, HiMedia, Индия) и идентификацию с использованием САМР-теста (Schaeidler agar + 5% sheep blood, BioMerieux, Франция) и метода ко-агглютинации (Аквапаст, Санкт-Петербург, Россия). ДНК микроорганизма определяли с использованием нового теста, разработанного в ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией производителя. Диагностическую чувствительность и специфичность нового теста рассчитывали по отношению к истинно положительным результатам. Пробу считали истинно положительной, если она была положительной в культуре, или если проба была положительной в ПЦР и отрицательной в культуре, но при этом у дан-

ного пациента *S. agalactiae* выделялся из другого биотопа. Для оценки аналитической специфичности теста использовали чистые культуры клинических изолятов различных микроорганизмов, рутинно выделенных и идентифицированных в лаборатории микробиологии НИИ АГ им. Д.О. Отта СЗО РАМН.

Результаты. За период с июня по ноябрь 2009 года на *S. agalactiae* было обследовано 650 женщин и 112 детей. Всего было проанализировано 1496 клинических материалов, в том числе 988 материалов от женщин и 508 материалов от детей. *S. agalactiae* был выявлен в 58 пробах, полученных от 32 женщин (4,9%) и 3 детей (2,7%). В 34 пробах *S. agalactiae* был обнаружен обоими методами; 1403 пробы были отрицательными как в культуре, так и в ПЦР (Таблица 1).

Таблица 1. Выявление *Streptococcus agalactiae* с применением культурального метода и метода ПЦР в реальном времени в клинических материалах от беременных женщин и новорожденных детей

Культуральный метод	ПЦР в реальном времени	Интерпретация результата	Количество проб
+	+	+	34
+	-	+	11
-	+	+	13
-	+	-	35
-	-	-	1403

С использованием культурального метода было выявлено 45 из 58 истинно положительных проб и, таким образом, его диагностическая чувствительность составила 77,6%. Методом ПЦР в реальном времени было получено 82 положительных результата, из них только 47 проб были интерпретированы, согласно используемым критериям, как истинно положительные. Показатели диагностической чувствительности и специфичности метода ПЦР в реальном времени, таким образом, равнялись 81% и 97,6%, соответственно.

Для оценки аналитической специфичности использовали чистые культуры следующих микроорганизмов: *Candida albicans* (1 изолят), *Citrobacter freundii* (1 изолят), *Corynebacterium urealyticum* (1 изолят), *Escherichia coli* (2 изолята), *Enterococcus faecalis* (2 штамма), гемолитический *Enterococcus faecalis var zymogenes* (2 изолята), *Klebsiella oxitoca* (1 изолят), *Klebsiella pneumoniae* (3 изолята), *Staphylococcus aureus* (2 изолята), *Staphylococcus saprophyticus* (1 изолят). При ана-

лизе ДНК данных микроорганизмов методом ПЦР в реальном времени перекрестных реакций не наблюдалось.

Выводы. Диагностическая чувствительность и специфичность нового метода ПЦР в реальном времени для выявления ДНК *S. agalactiae* (81% и 97,6%) сопоставимы с диагностической чувствительностью и специфичностью культурального метода (77,6% и 100%). Бесспорным преимуществом нового теста является то, что он позволяет выполнить исследование в течение нескольких часов и тем самым ускорить принятие клинических решений. Кроме того, данный метод может применяться в учреждениях родовспоможения, которые не располагают условиями для бактериологических исследований.

Раздел 8.

**ИНФЕКЦИИ ВЕРХНИХ И НИЖНИХ
ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ**

ДИАГНОСТИКА И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВИРУСА ГРИППА А/Н1N1V В РОССИИ

Грудинин М.П., Комиссаров А.Б., Елпаева Е.А., Писарева М.М., Бузицкая Ж.В., Паянкова А.А., Романовская-Романько Е.А., Слита А.В., Стукова М.А.

ФГБУ «НИИ гриппа» Минздравсоцразвития России, Санкт-Петербург, Россия

Появившийся в феврале-марте 2009 года в Мексике новый вирус гриппа А/Н1N1v быстро распространился по всему миру и явился причиной пандемии гриппа. Эпидемические события в России начались в последнюю неделю сентября 2009 г. в Дальневосточном регионе (Южно-Сахалинск), второй отправной точкой эпидемии стал Калининград, а к октябрю 2009 г. эпидемия охватила всю территорию России.

Настоящая работа посвящена анализу результатов диагностики пандемического гриппа в России и характеристике молекулярно-генетических особенностей вирусов гриппа А/Н1N1v, выделенных в период с мая по декабрь 2009 г., в НИИ гриппа.

Материалы и методы.

Клинический (мазки из носоглотки, бронхо-альвеолярный лаваж) и секционный материал (фрагменты трахеи, легких, бронхов, селезенки) поступал из клиник Санкт-Петербурга и Ленинградской области, а также из вирусологических лабораторий Опорных Баз Федерального центра по гриппу. Образцы были получены из лабораторий ФГУЗ «Центров гигиены и эпидемиологии» республик Коми, Карелия, Башкортостан; Белгородской, Воронежской, Калужской, Курской, Нижегородской, Новгородской, Астраханской, Архангельской, Саратовской, Псковской, Смоленской, Самарской, Вологодской областей и Ненецкого автономного округа.

Исследование клинического материала проводилось в день поступления методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени (Rotor-Gene 6000, Австралия) с использованием комплекта реагентов по протоколу CDC (Атланта, США): набор для выделения РНК – RNeasy Mini Kit (Qiagen); набор для постановки ОТ-ПЦР – SuperScript III Platinum One-step qRT-PCR System (Invitrogen); набор праймеров и зондов – InfA, H1 сезонный, RNP и H1Sw (Biosearch Technologies), а также наборов АмплиСенс *Influenza virus A/B* и *Influenza virus A/H1-swine-FL* ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

Определение нуклеотидной последовательности фрагментов генома вируса гриппа А/Н1N1v проводили на приборе ABI PRISM 3100-

Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) с использованием набора «BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit».

Филогенетический анализ осуществляли с использованием программы Vector NTI 8,0 (Invitrogen) и MEGA 3.1 (PSU, США) методом «ближайших соседей» и Kimura.

Результаты.

В период с мая по декабрь 2009 г. при анализе 1558 клинических образцов РНК вируса гриппа А(H1N1v) была обнаружена у 409 больных гриппом и 163 умерших. Вирусов гриппа А других субтипов и гриппа В выявлено не было. Из 409 больных 58% составили лица в возрасте до 14 лет, 41% - больные от 15 до 64 лет и 1% - лица старше 65 лет. Средний возраст обследованных больных составил 15,7 лет. Среди умерших пациентов большинство лиц (89,9%) были в возрасте от 15 до 65 лет, доля умерших детей до 14 лет составила 3,8%, а лиц старше 65 лет - 6,3%. Средняя продолжительность заболевания (до смерти) составила 10 дней (от 3-х до 30 дней). При этом в 84% случаев грипп был осложнен пневмонией вирусной или вирусно-бактериальной этиологии, у части больных регистрировали острый респираторный дистресс-синдром. По имеющимся данным у 6 умерших в анамнезе был сахарный диабет, у 7 - ожирение 2-3 степени, среди умерших было 6 женщин второго и третьего триместра беременности. Средний возраст умерших составил 39 лет.

Молекулярно-генетическая характеристика 31 пандемического штамма (20 штаммов были выделены из клинических образцов и 11 штаммов - из секционного материала) показала, что по генам гемагглютинина (HA) и нейраминидазы (NA) данные штаммы были подобны штаммам вируса гриппа А/Техас/05/2009 и А/Калифорния/07/2009 (гомология по HA составила 98,9%). Филогенетический анализ показал, что популяция штаммов H1N1v эволюционно связана с вирусами гриппа А/H1N1 1918 года и вирусами классического гриппа свиней. При этом пандемические штаммы 2009 г. и эпидемические H1N1 штаммы различных годов выделения образовывали две отдельные группы. Гомология по HA со штаммом А/Брисбен/59/2007, входившим в состав гриппозных вакцин в сезоны 2007-2009 гг., составила всего 78%.

Большинство Российских штаммов пандемического вируса гриппа А/H1N1, включенных в анализ, несли в гемагглютинине мутацию S203T, в нейраминидазе - мутацию N248D, в NS - мутацию I23V и, таким образом, принадлежали кластеру 2, согласно классификации Fereidouni и соавторов (Fereidouni et al., 2009).

У ряда российских штаммов выявлялись штаммоспецифические аминокислотные замены в различных положениях HA, две из кото-

рых находятся в антигенных сайтах Ca и Sb. В гемагглютинине 8 изолятов вируса гриппа, выделенных из секционного материала, и в 2-х изолятах, выделенных от больных с тяжелым течением гриппа, была обнаружена АК замена D222G. Известно, что АК остатки HA1 135, 183, 187, 191, 222, 223 и 225 (нумерация по H1) влияют на рецептор-связывающие свойства вирусов гриппа и, соответственно, на тропизм вируса.

Появление АК замен в рецептор-связывающем сайте HA может быть связано с пассированием вируса гриппа на КЭ (Xu et al., 1993; Gambaryan et al., 1999). В данном исследовании пять штаммов, содержащих остаток глицина (G) в 222 положении HA, были выделены из секционного материала на клетках MDCK, что исключает адаптационный характер данных замен.

Все проанализированные штаммы не имели в HA мутаций, определяющих устойчивость к озелтамивиру (H275Y), но содержали замену S31N в белке M2, определяющую устойчивость вирусов к адамантанам и характерную для циркулирующих в мире штаммов вируса гриппа A/H1N1v и их предшественников по M гену – штаммов евразийского свиного птицеподобного (avian-like) гриппа A подтипа H1N1.

Заключение.

Согласно исследованиям, проведенным в НИИ гриппа, в период с мая по декабрь 2009 г. эпидемия гриппа в России носила моноэтиологический характер и была вызвана вирусом гриппа A(H1N1v). В отличие от предыдущих эпидемических сезонов, когда наибольшее число тяжелых случаев гриппа регистрировалось у детей до 5 лет и лиц старше 65 лет, особенностью эпидемии, вызванной вирусом гриппа A(H1N1v), являлась высокая заболеваемость и смертность среди лиц молодого и среднего возраста.

Показано, что популяция штаммов H1N1v генетически однородна и эволюционно связана с вирусами гриппа H1N1 1918 года и вирусами классического гриппа свиней. При этом пандемические штаммы 2009 г. и эпидемические H1N1 штаммы различных годов выделения образуют две отдельные группы. По данным Европейского Центра профилактики и контроля заболеваний (ECDC) G222 варианты штаммов вируса гриппа H1N1v были выделены во многих странах как от людей, умерших от гриппа или перенесших заболевание в тяжелой форме, так и при легком течении гриппа. Сведений, позволяющих доказать непосредственную связь данных замен с усилением тяжести течения заболевания на сегодняшний день недостаточно. Для установления патогенетической роли данной мутации требуются дальнейшие исследования.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА КОКЛЮШНОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ БРОНХИТОМ

Маврутенков В.В.¹, Братусь И.В.², Маврутенкова Т.В.², Чемерис О.Л.¹, Дикленко Т.В.¹, Шматко Г.П.¹, Винокурова И.С.¹

Днепропетровская государственная медицинская академия¹,
Диагностический центр медицинской академии², г. Днепропетровск,
Украина

Актуальность. По данным Централизованной информационной системы по инфекционным заболеваниям (ЦИСИЗ) Европейского регионального бюро ВОЗ, базирующихся на сведениях, подаваемых национальными системами здравоохранения, распространенность коклюша в Украине в 2008 году составила 2,23 случая на 100 тыс. населения (последние данные, представленные МЗ Украины в ВОЗ). Для сравнения, за этот же период, по данным ЦИСИЗ, распространенность коклюша в Российской Федерации была 2,52 случая на 100 тыс. населения, в Эстонии - 36,16 случая, а в Чешской республике данный коэффициент составлял 7,43. Столь существенные различия в эпидемическом процессе на географически близких территориях, на наш взгляд, могут быть связаны не только с организацией системы учета и регистрации заболеваемости, но и с возможностями лабораторной верификации коклюшной инфекции.

Цель исследования. оценить возможность использования методов молекулярной диагностики для этиологической верификации коклюшной инфекции.

Материалы и методы. Группу наблюдения составили дети (n-14) в возрасте от 1 года и до 15 лет с признаками острого бронхита, при этом у 4 детей (28,6%) были клинические признаки бронхообструкции. Стандартный микробиологический посев, проведенный у 6 (42,9%) пациентов ни в одном случае не выявил возбудитель коклюша *Bordetella pertussis*. Молекулярная диагностика коклюшной инфекции основывалась на определении ДНК *B. pertussis* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). В качестве образца для выделения генетического материала *B. pertussis* использовали исключительно материал слизистых дыхательных путей, забранный способом «заднеглоточного тампона». Для выполнения диагностики методом ПЦР применяли амплификационные системы, производимые компанией «ДНК-технология» (Россия).

Результаты и их обсуждение. По данным ПЦР анализа ДНК *B. pertussis* из образцов отделяемого респираторного тракта было выделено у 5 (35,7%) детей, возраст которых составил: 16 месяцев, 3 года, 6

лет, 7 лет и 11 лет. Анализируя полученные результаты исследования необходимо отметить следующее. Во-первых, у всех детей (n-14) длительность кашля превышала 14 дней, составляя на момент обследования методом ПЦР в среднем 20 ± 4 дня. При этом трое из пяти детей с позитивным ответом на ДНК *B. pertussis* имели эпизод пребывания в стационаре, что с эпидемиологической точки зрения не позволяет исключить внутрибольничную супер-инфекцию. Во-вторых, у всех детей результаты исследования методом ПЦР могли быть модифицированы предшествующим анализом применением антибактериальных химиопрепаратов, где в 64,3% использовались β -лактамы антибиотики, в остальных случаях - макролиды. В-третьих, 11 (78,6%) детей в анамнезе имели иммунопрофилактику коклюша. В связи, с чем следует подчеркнуть, что у трех детей в возрасте 16 мес., 3 и 7 лет с позитивным ответом на наличие ДНК *B. pertussis* прививки не проводилась, у одного ребенка 6 лет вакцинация была неполной. Ни у одного ребенка с выявленной ДНК *B. pertussis* микробиологических или серологических обследований на коклюшную инфекцию не проводилось, что не позволило сравнить экономическую и диагностическую ценность метода ПЦР в сравнении с данными тестами.

Выводы.

1. Показана возможность использования метода ПЦР для диагностики коклюшной инфекции в «поздние» сроки заболевания
2. Вакцинация является единственным эффективным средством профилактики коклюша, что обосновывает введение в календарь иммунопрофилактики ревакцинации против данной инфекции у старших детей и взрослых.

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ОРНИТОЗА

Миненко А.Н.¹, Яцышина С.Б.¹, Карпов А.М.², Скрынник С.М.³,
Сорокина В.Б.³, Ходякова И.А.⁴, Очкасова Ю.В.⁴, Щукина И.А.⁴,
Зубочнок Н.В.⁵, Кудрявцева А.В.¹, Браславская С.И.¹.

¹ ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

² Главное управление здравоохранения Курганской области, Курган, Россия

³ ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Курганской области», Курган, Россия

⁴ Управление Роспотребнадзора по Липецкой области, Липецк, Россия

⁵ ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Липецкой области», Липецк, Россия

Введение.

Орнитоз – зоонозная инфекция, характеризующаяся наличием природных и вторичных антропоургических очагов. Возбудителем орнитоза является *Chlamydophila psittaci*, представитель семейства Chlamydiaceae. Заражение людей происходит в результате контакта с инфицированными птицами преимущественно с попугаями, но также зарегистрированы случаи заболевания при контакте с голубями и домашней птицей – чаще с индейками, или контаминированными их пометом объектами среды. Инфицирующая доза очень мала, поэтому достаточно даже однократного кратковременного контакта человека с птицей, или вдыхания контаминированной пыли (при манипуляциях с пометом или перьями) и отделяемого из респираторного тракта птиц. Следует учитывать, что инфицированная птица может быть внешне практически здоровой, но, тем не менее, выделять с пометом возбудитель в высоких концентрациях. В связи с этим, эпидемиологический анамнез при кратковременном контакте может быть неявным, и подобные случаи орнитоза эпидемиологически не подтвержденными.

Инкубационный период составляет в среднем от 5 до 14 дней, но регистрируются также более продолжительные периоды. Тяжесть заболевания варьирует от легкого ОРЗ до системной инфекции с тяжелой пневмонией и поражением других систем и органов (эндокардиты, миокардиты, гепатиты, артриты) [1]. Как правило, при заражении у людей в начале наблюдаются гриппо-подобные симптомы (лихорадка, недомогание, головная боль, мышечная боль), затем присоединяется непродуктивный кашель, затруднение дыхания и чувство стеснения в груди. На рентгенограмме наблюдается интерстициальная или лобарная инфильтрация. При отсутствии адекватного лечения орнитоза смертность составляет от 15 до 20 %, но при своевременно начатом лечении, она не превышает 1%.

Диагностику орнитоза в мире проводят методом микроиммунофлуоресценции, ИФА, РСК в парных сыворотках, используется также культуральный метод, однако он может применяться в ограниченном числе лабораторий. Метод микроиммунофлуоресценции является более чувствительным и специфичным, чем РСК в парных сыворотках, тем не менее, может наблюдаться перекрестная реакция с другими представителями семейства – *S. pneumoniae* и *S. trachomatis* [1]. Следует отметить, что на данный момент в РФ не существует утвержденных методических документов по лабораторной диагностике орнитоза у людей и сертифицированных диагностикумов. Использование

ПЦР в диагностике орнитоза, как наиболее доступного, быстрого и точного метода, позволит изучить распространенность орнитоза в клинической практике и оптимизировать мониторинг за этим заболеванием.

Цели и задачи.

С целью оптимизации лабораторной диагностики орнитоза в ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора проведена разработка набора реагентов для идентификации *Chlamydophila psittaci* методом ПЦР в формате гибридационно-флуоресцентной детекции.

Для разработки и апробации набора организован сбор биологического материала от птиц, клинического материала от больных людей с подозрением на орнитоз и внебольничной пневмонией неуточненной этиологии.

Методы.

В работе использовали патологический материал (паренхиматозные органы), помет птиц (52 образца) и смывы из клоаки (50 образцов). Клинический материал от пациентов: мокрота, БАЛ, респираторные мазки из носо- и ротоглотки.

Экстракцию ДНК возбудителя проводили с применением наборов «Рибо-преп» и «ДНК-сорб-В» (ФГУН ЦНИИЭ). При тестировании образцов использовался набор реагентов «ХЛА-ПСИТ» (ФГУН ЦНИИЭ), разрешенный для использования в ветеринарии, предназначенный для выявления *Chlamidophila psittaci* методом ПЦР с детекцией продуктов амплификации методом электрофореза (ЭФ).

ПЦР проводили на приборах: «Rotor-Gene» 6000 («Corbett Research», Австралия), «iQ5» («BioRad», США), ДТ-96 («ДНК-Технология», Россия); амплификатор «Терцик» («ДНК-Технология», Россия).

Секвенирование осуществляли методом «cycle sequence» с набором ABI PRISM Big Dye v.1.1 (Applied Biosystems, USA), согласно инструкции изготовителя с использованием капиллярного автоматического секвенатора ABI-3100 PRISM Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Анализ нуклеотидных последовательностей выполнялся с использованием блока программ DNASTAR по алгоритму CluslalW.

Результаты.

Для обнаружения ДНК *Chlamydophila psittaci* были подобраны специфические праймеры и зонд к последовательности гена OmpA. Штаммы *Chlamidophila psittaci* представляют гетерогенную группу, использование молекулярно-генетических методов позволяет выделить 7 генотипов (A-F, E/B) различающихся последовательностью гена OmpA. Все генотипы способны вызывать заболевания у человека и птиц. Интересным является тот факт, что наблюдается ассоциа-

ция определенного генотипа и вида птиц, от которого он выделен. К примеру, генотип А наиболее распространен среди видов отряда Psittaciformes (попугаи), генотип В – среди голубей, С часто встречается у водоплавающих птиц, генотип D встречается у домашней птицы (особенно у индеек) [2]. Праймеры и зонд подобраны к консервативной области гена *OmpA* всех генотипов.

Группа контроля для оценки специфичности составила более ста респираторных мазков от здоровых и инфицированных другими возбудителями ОРЗ людей. Для оценки специфичности также использовали изоляты *Chlamydia trachomatis* и штаммы различных бактериальных возбудителей родов: *Shigella*, *Neisseria*, *Moraxella*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Mycobacterium*, которые могут встречаться в респираторном тракте, в том числе *Chlamydia pneumoniae*. Перекрестных либо неспецифических реакций не обнаружено.

Аналитическую чувствительность теста оценивали с помощью количественно охарактеризованного положительного контрольного образца (рекомбинантная конструкция), чувствительность составила – $1 \cdot 10^3$ ГЭ/мл исследуемого материала.

В январе 2009 года в Петуховском районе Курганской области был зарегистрирован крупный очаг орнитоза, среди населения был выявлен 31 случай орнитоза, в том числе 5 – среди детей до 14 лет. Заболевания протекали в легкой и среднетяжелой клинических формах. По данным эпидемиологического расследования, групповая заболеваемость была связана с декоративной птицей. Совместно с «Центром гигиены и эпидемиологии в Курганской области» был исследован патологический материал от 23 особей декоративной птицы. В образцах патологического материала от 17 птиц при использовании ПЦР набора «ХЛА-ПСИТ» (детекция продуктов амплификации методом ЭФ) и с помощью разработанного набора реагентов с гибридизационно-флуоресцентной детекцией была идентифицирована ДНК *Chlamydia psittaci*.

По данным официальной статистики в 2008 году был зарегистрирован 51 случай, а в 2009 году – 104 случая заболевания людей орнитозом. [3]. В свою очередь согласно данным государственного доклада о состоянии здоровья населения РФ в 2003 г., у 90% больных, умерших от внебольничной пневмонии в стационаре этиологический диагноз остается неустановленным [4], и нельзя исключить, что среди них нет больных орнитозом. В связи с чем, для оценки распространенности орнитоза проводится работа по сбору материала среди госпитализированных пациентов с внебольничной пневмонией неуточненной

этиологии. Так, наличие возбудителя орнитоза было подтверждено, с помощью разработанного набора реагентов, в образцах БАЛ от двух пациентов из Мурманской области с диагнозами внебольничная пневмония. В 2009 году в Московской области был госпитализирован мужчина с пневмонией, как было выяснено, являясь работником зоомагазина, он ухаживал за больной птицей. В мокроте пациента был обнаружен возбудитель орнитоза с помощью разработанного набора реагентов. Следует отметить, что клинические симптомы орнитоза не являются достаточно специфичными и грамотно проведенное эпидемиологическое расследование играет большую роль в выяснении природы и источника возбудителя, что позволяет принять меры к предотвращению дальнейшего распространения заболевания среди людей и птиц.

При взаимодействии с сотрудниками Управления и ЦГиЭ Роспотребнадзора Липецкой области были получены образцы помета от птиц из зоомагазина и объединенные образцы помета из голубятен. Этот материал был собран в процессе эпидемиологического расследования sporadического случая заболевания орнитозом. В объединенном образце помета птиц из одной голубятни с помощью разработанного ПЦР набора с детекцией в режиме реального времени была выявлена *Chlamidophila psittaci*. При использовании набора реагентов для ПЦР «ХЛА-ПСИТ» (производство ФГУН ЦНИИЭ) с детекцией продуктов амплификации методом ЭФ, возбудитель идентифицировать не удалось. Полученные данные свидетельствуют о более высокой чувствительности набора с гибридационно-флуоресцентной детекцией.

Также нами было организовано исследование поголовья на одном из птицеперерабатывающих предприятий. Были протестированы образцы помета и смывов из клоаки от индеек (50 проб от самцов и самок разного возраста) – в этих образцах возбудителя орнитоза выявлено не было.

Для 30 положительных образцов, выявленных за время проведения работы, было проведено секвенирование гена *OmpA* на базе ФГУН ЦНИИЭ и данные секвенирования подтвердили наличие в них ДНК *Chlamidophila psittaci*. Анализ полученных последовательностей позволил отнести большинство образцов к генотипу А, пять образцов от птиц к генотипу В и один к Е генотипу. Полученные результаты подтверждают данные других исследователей о преобладании генотипа А среди птичьих изолятов *C. psittaci*.

Выводы.

Нами был разработан набор реагентов для диагностики и эпидемиологического надзора за орнитозом методом ПЦР в формате гибридизационно-флуоресцентной детекции в режиме реального времени. Предварительные результаты апробации набора реагентов свидетельствуют о его высокой аналитической чувствительности и специфичности.

Литература.

1. Compendium of Measures To Control *Chlamydomphila psittaci* Infection Among Humans (Psittacosis) and Pet Birds (Avian Chlamydiosis), 2010. National Association of State Public Health Veterinarians (NASPHV)

2. Sequencing of the *Chlamydomphila psittaci* ompA Gene Reveals a New Genotype, E/B, and the Need for a Rapid Discriminatory Genotyping Method. Tom Geens, Ann Desplanques, Marnix Van Loock et al. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, May 2005, p. 2456–2461.

3. Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях за 2008 и за 2009 гг. Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора.

4. Государственный доклад о состоянии здоровья населения Российской Федерации в 2003 году. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2003.-100 с.

**СТРУКТУРА БАКТЕРИАЛЬНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ
ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИИ (ВП) В
МНОГОПРОФИЛЬНЫХ СТАЦИОНАРАХ Г. СМОЛЕНСКА**

Рачина С.А.¹, Козлов Р.С.¹, Шаль Е.П.¹, Кречикова О.И.¹, Иванчик Н.В.¹,
Асафьева О.Ю.², Гучев И.А.³, Гуляева С.А.⁴, Бурдинская Ю.В.⁴,
Яцышина С.Б.⁵, Астахова Т.С.⁵, Бейкин Я.Б.⁶

¹ ГОУ ВПО “Смоленская государственная медицинская академия
Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию”,
Смоленск, РФ

² МЛПУ “Клиническая больница скорой медицинской помощи”,
Смоленск, РФ

³ ФГУ “421 Военный госпиталь Московского военного округа”,
Смоленск, РФ

⁴ МЛПУ “Первая городская клиническая больница”, Смоленск, РФ

⁵ ФГУН “ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора”, Москва, РФ

⁶ МУ “Клинико-диагностический центр”, Екатеринбург, РФ

Введение.

В основе рационального выбора антимикробных препаратов (АМП) для эмпирической терапии ВП лежит знание спектра ключевых возбудителей. Однако в Российской Федерации исследования, направленные на изучение этиологической структуры ВП, немногочисленны и далеко не всегда проводятся на должном методологическом уровне. Экстраполяция данных зарубежных исследований имеет существенные ограничения, так как не учитывает особенности популяции пациентов с ВП и организационные аспекты оказания медицинской помощи.

Цель и задачи.

Изучить структуру бактериальных возбудителей ВП у взрослых пациентов, госпитализированных в многопрофильные стационары г. Смоленска с использованием различных методов этиологической диагностики; проанализировать вероятность выявления различных микроорганизмов с учетом возраста, сопутствующих заболеваний, тяжести и характера течения заболевания.

Материалы и методы.

Исследование проводилось на базе пяти многопрофильных стационаров Смоленска. У взрослых пациентов с рентгенологически подтвержденной ВП в первые 24 ч с момента госпитализации собиралась мокрота, по показаниям - бронхоальвеолярный лаваж, при тяжелой ВП - кровь, фатальной - аутопсийный материал. Все образцы исследовались культуральным методом (посев на селективные и дифференциально-диагностические среды, в том числе *Legionella agar base*); респираторные образцы - дополнительно методом ПЦР. Идентификация аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов при культуральном исследовании проводилась в соответствии со стандартными методами и процедурами. ПЦР для выявления ДНК *M.pneumoniae*, *S.pneumoniae* и *L.pneumophila* выполнялась с использованием коммерческих тест-систем «АмплиСенс® *Legionella pneumophila*-FL» вариант FRT и «АмплиСенс® *Mycoplasma pneumoniae/Chlamydomphila pneumoniae*-FL» вариант FRT. У части пациентов проводилось серологическое исследование, предусматривавшее определение антител IgM, IgG к *M.pneumoniae*, *S.pneumoniae* и *L.pneumophila* в парных сыворотках и IgM - в одиночных сыворотках (тест-системы «Sero MPä IgM», «Sero MPä IgG; «Sero CPä IgM и «Sero CPä IgG, Savyon Diagnostics, Legionella Pneumophila Serogroup 1 ELISA IgM и IgG Vircell, s.1.). Значимым являлось выявление антител класса IgM к *S.pneumoniae*, *L.pneumophila*, *M.pneumoniae* в одиночной или хотя бы в одной из парных сывороток, либо сероконверсия (т.е. изменение отрицательно-

го результата на положительный) в парных сыворотках при выявлении антител класса IgG.

Результаты.

В исследование включено 326 пациентов в возрасте от 18 до 87 лет (средний возраст 43,0+19,9 лет), в том числе 80,7% мужчин. Тяжелая ВП регистрировалась в 19,3%, осложненное течение - в 49,1% случаев. Хронические сопутствующие заболевания (ХСЗ) выявлены у 54,3% пациентов. Этиологический диагноз при использовании двух методов (культуральное исследование + ПЦР) установлен у 42,7% пациентов, наиболее часто выявлялись *M.pneumoniae*, *H.influenzae* и *S.pneumoniae*, на их долю (в виде монокультуры и ассоциаций) приходилось 77,9% случаев пневмонии установленной этиологии. При тяжелой ВП наиболее частыми бактериальными возбудителями были *S.pneumoniae* и энтеробактерии, при нетяжелой - *M.pneumoniae* и *H.influenzae* (таблица).

Таблица. Структура бактериальных возбудителей при ВП различной степени тяжести (культуральное исследование + ПЦР), % от общего количества пациентов с установленным этиологическим диагнозом

Наименование микроорганизма	Нетяжелая ВП (n=109)	Тяжелая ВП (n=17)
<i>M. pneumoniae</i>	32,1	11,8
<i>H.influenzae</i>	20,2	-
<i>S.pneumoniae</i>	12,8	41,2
<i>H.influenzae</i> + <i>S.pneumoniae</i>	10,1	-
<i>H. influenzae</i> + <i>M. pneumoniae</i>	5,5	-
<i>C. pneumoniae</i>	3,7	-
<i>L. pneumophila</i>	2,8	11,8
<i>C. pneumoniae</i> + <i>H. influenzae</i> + <i>M. pneumoniae</i>	1,8	-
<i>H. influenzae</i> + <i>S. aureus</i>	1,8	-
<i>K. pneumoniae</i>	1,8	5,9
<i>C. pneumoniae</i> + <i>H. influenzae</i>	0,9	-
<i>C. pneumoniae</i> + <i>M. pneumoniae</i>	0,9	-
<i>E. cloacae</i> + <i>K. pneumoniae</i>	0,9	-
<i>E. coli</i>	0,9	11,8
<i>E. coli</i> + <i>K. pneumoniae</i>	0,9	5,9

<i>H. influenzae</i> + <i>K. pneumoniae</i> + <i>S. pneumoniae</i>	0,9	5,9
<i>K. pneumoniae</i> + <i>P. mirabilis</i>	0,9	-
<i>M. pneumoniae</i> + <i>S. pneumoniae</i>	0,9	-
<i>Enterococcus spp.</i> + <i>K. pneumoniae</i>	-	5,9

Факторами, достоверно повышающими вероятность инфицирования *S.pneumoniae* у пациентов с ВП были мужской пол и ХСЗ, энтеробактериями – наличие ХСЗ и тяжелое течение пневмонии, *H.influenzae* – нетяжелая пневмония, *M.pneumoniae* – отсутствие осложнений и ХСЗ.

Частота инфицирования *M.pneumoniae*, *C.pneumoniae* и *L.pneumophila* по результатам серологического исследования составила 69,0%, 25,9% и 21,6%, соответственно. Полное совпадение результатов ПЦР и серологического исследования отмечалось в 39,3% случаев. Положительные результаты ПЦР подтверждались серологически для *L.pneumophila* и *C.pneumoniae* во всех случаях, для *M.pneumoniae* – в 90,5% случаев. При отрицательных результатах ПЦР серологические маркеры инфекции обнаруживались с частотой 16,6%, 26,4% и 54,9% для *L.pneumophila*, *C.pneumoniae* и *M.pneumoniae*, соответственно.

Выводы.

1. Наиболее частыми бактериальными возбудителями ВП в стационарах г. Смоленска являлись *M.pneumoniae*, *H.influenzae* и *S.pneumoniae*.

2. Структура бактериальных возбудителей ВП зависела от тяжести течения заболевания и особенностей исследуемой популяции в конкретном стационаре: вероятность выявления энтеробактерий достоверно увеличивалась при тяжелом течении пневмонии и наличии ХСЗ, *S.pneumoniae* – у лиц мужского пола с ХСЗ, *H.influenzae* – в случае нетяжелой ВП, *M.pneumoniae* – при отсутствии осложнений и ХСЗ.

3. Использование тест-систем «Sero MPä IgM», «Sero MPä IgG; «Sero CPä IgM и «Sero CPä IgG, Savyon Diagnostics и Legionella Pneumophila Serogroup 1 ELISA IgM и IgG Vircell, s.1.) может приводить к гипердиагностике ВП, вызванных *M.pneumoniae*, *C.pneumoniae* и *L.pneumophila*.

ВАКЦИНЫ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ: КЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПАНДЕМИЧЕСКОЙ H5N1 DELNS1 ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ

Шурыгина А-П.С., Стукова М.А., Ерофеева М.К., Охапкина Е.А., Максакова В.Л., Поздеев В.К., Романовская-Романько Е.А., Войцеховская Е.М., Вакин В.С, Васильева А.А., Кривицкая В.З., Романова Ю.Р., Егоров А.Ю., Киселев О.И.

*ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа»
Минздравооцразвития России, г. Санкт-Петербург.*

Введение. НИИ гриппа совместно с компанией АВИР Грин Хилс Биотехнолоджи (ГНВ) (Австрия, Вена) разрабатывает новый подход к созданию интраназальных гриппозных вакцин на основе дефектных по репликации вирусов гриппа с удаленным геном NS1 (delNS1). Делеция гена NS1 приводит к неспособности вируса реплицироваться в интерферон-компетентных клетках и организмах (Egorov et al., 1998; Garcia-Sastre et al., 1998). При интраназальном введении вакцинный вирус способен инфицировать эпителиальные клетки, но не производит инфекционное потомство, и вследствие этого не распространяется из носоглотки привитых. В то же время, несмотря на отсутствие репликации, delNS1 вакцинные вирусы являются достаточно иммуногенными из-за повышенной продукции цитокинов в месте аппликации вакцины (назальный эпителий). Местное высвобождение цитокинов, таких как интерфероны первого типа и ИЛ-1, стимулирует мукозальный иммунитет, опосредованный секреторными антителами класса IgA, цитотоксический иммунитет, а также системный В - и Т- клеточный иммунный ответ. Вследствие этого, вакцина ΔNS1 иммуногенна и способна обеспечить перекрестную защиту даже без использования адъювантов. Безопасность и эффективность delNS1 вакцинных вирусов была продемонстрирована на различных животных моделях, в том числе приматах (Ferko et al., 2004; Romanova et al., 2009).

Цель исследования. Основной задачей 1 фазы данного исследования являлась оценка безопасности и переносимости двух доз delNS1 вакцинного препарата, полученного с помощью методов обратной генетики на основе вирусного штамма А/Вьетнам/1203/04(H5N1) - вакцинный реассортант с модификацией в сайте расщепления гемагглютинина и удаленным NS1 геном. Также в задачи исследования входила оценка местного и системного иммунных ответов и фармакокинетики (вирусовыделения) данного препарата при двукратном аэрозольном интраназальном введении.

Материалы и методы. Согласно протоколу исследования (фаза 1, двойное слепое, плацебо-контролируемое исследование) 36 здоровых добровольцев мужского и женского пола, в возрасте от 18 до 50 лет с титрами специфических антител к вирусам гриппа А H5N1 и H1N1 <1:10 были рандомизированы в соотношении 2:1 в группы, получивших вакцину (два уровня дозы: 6.8 lg и 7.5 lg ТИД50/доза) или плацебо.

Оценка безопасности и переносимости вакцинного препарата производилась путем тщательного мониторинга состояния здоровья добровольцев в ходе исследования (регистрация нежелательных явлений, физикальное обследование, оториноларингологическое обследование, лабораторные показатели). Оценка иммуногенности проводилась на 29-й день (перед второй вакцинацией) и на 57-й день (окончание исследования) по следующим критериям: местный иммунный ответ - оценка местного специфического иммунного ответа к вирусу гриппа А(H5N1) (IgA) в образцах носовых секретов методом иммуноферментного анализа (ИФА); системный иммунный ответ оценивался по выработке гемагглютинин-ингибирующих антител в образцах сыворотки крови в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) и выявлению сывороточных вирус специфических IgG методом ИФА. Определение ЦТЛ иммунного ответа проводилось у МНС класс I A02 аллель позитивных добровольцев путем измерения активности Гранзима-В (Granzyme B) продуцирующих Т-клеток методом иммуноферментного бляшкообразования (ELISPOT). Фармакокинетика (вирусовыделение) оценивалась путем титрования образцов носовых смывов на культуре клеток Vero (определение ТИД50/мл) на 2-й, 3-й и 4-й день исследования.

Результаты. Отмечена хорошая переносимость вакцинного препарата при двукратном интраназальном введении. Важным аспектом безопасности живых гриппозных вакцин является их потенциальная способность к репликации и последующему вирусовыделению и трансмиссии. В данном исследовании вирусовыделения ни в одной контрольной точке после вакцинации отмечено не было, что подтверждает дефектный по репликации фенотип вакцины и ее безопасность. У всех привитых добровольцев было отмечено формирование местного и системного иммунного ответов (Таблица 1).

Таблица 1. Уровень сероконверсий (%) после однократной (день 29-й) и двукратной вакцинации (день 57-й) пандемической H5N1 delNS1 гриппозной вакцины.

Доза вакцинного препарата (кол-во лиц)	РТГА		Секреторные IgA (ИФА)		Сывороточные IgG (ИФА)		Иммунный ответ, зарегистрированный хотя бы в одном исследовании	
	29-й день	57-й день	29-й день	57-й день	29-й день	57-й день	29-й день	57-й день
6,8 lg ТИД50/мл (n=12)	41,7*	91,7*	0,0	45,5*	0,0	60,0*	66,7*	100,0*
7,5 lg ТИД50/мл (n=12)	75,0*	91,7*	18,2	45,5*	20,0	50,0*	91,7*	100,0*
Плацебо (n=12)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

* $p < 0,05$ при сравнении с группой плацебо (точный критерий Фишера).

После двух иммунизаций в группе низкого уровня дозы вакцины (6.8 lg ТИД50/доза) был выявлен 8-кратный прирост СГТ в РТГА, а в группе вакцинированных высокой дозой (7.5 lg ТИД50/доза) был отмечен 9.5 кратный прирост; уровень сероконверсий составил 92% в обеих группах. Уровень сероконверсий секреторных IgA был выше при двукратной вакцинации (46% для каждого уровня дозы), чем после однократной вакцинации (0% при введении низкой дозы, 18% при введении высокой дозы). Кроме того, у трех из пяти добровольцев, получивших высокую дозу вакцины, через 4 недели после вакцинации наблюдалось ≥ 3 -кратное повышение Гранзим В-секретирующих Т-клеток/ 1×10^6 ПМЯЛ (полиморфнояденные лимфоциты) по сравнению с базовым уровнем. Повышение количества Гранзим В-секретирующих Т-клеток сохранялось и после второй вакцинации.

Заключение. Данные, полученные в ходе клинического исследования I фазы, свидетельствуют о безопасности и хорошей переносимости пандемической H5N1 delNS1 вакцины. Исследуемый препарат, несмотря на свой высоко аттенуированный фенотип (delNS1), подтвержденный отсутствием вирусовыделения вакцинного штамма, обладает высоким уровнем иммуногенной активности, формируя как местный, так и системный, иммунные ответы, уже после однократного интраназального введения.

Раздел 9.
НЕЙРОИНФЕКЦИИ

ВСПЫШКА ПОЛИОМИЕЛИТА В ТАДЖИКИСТАНЕ В 2010 Г., ВЫЗВАННАЯ ДИКИМ ПОЛИОВИРУСОМ СЕРОТИПА 1

**Яковенко М.Л.*^{1,2}, Иванова О.Е.*¹, Гмыль А.П.*¹, Еремеева Т.П.*¹,
Иванов А.П.*¹, Байкова О.Ю.¹, Исаева О.В.¹, Гаврилин Е.В.³, Мартин Р.³,
Михайлов М.И.¹, Шакарян А.К.¹, Липская Г.Ю.², Кью О.⁴, Вассиляк С.⁴,
Дешпанде Ж.⁵ и Агол В.И.^{1,2}**

** Равное участие в выполненной работе*

¹ Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им.М.П.Чумакова
РАМН, Московская обл., Россия;

² НИИ ФХБ им. А. Н. Белозерского МГУ им. М. В. Ломоносова, г.Москва,
Россия;

³ ВОЗ, Департамент иммунизации и инфекций, управляемых средства-
ми специфической профилактики, Региональное Европейское бюро, г.
Копенгаген, Дания;

⁴ Центры по контролю за заболеваемостью и предотвращению заболева-
ний, г.Атланта, Джорджия, США;

⁵ Центр по исследованию энтеровирусов, Индийский Совет медицинских
исследований, г. Мумбай, Индия

За период февраль-июль 2010 г. в Таджикистане была зарегистрирована крупная вспышка полиомиелита. На текущий момент зарегистрировано 701 случай острого вялого паралича (ОВП), из которых 456 лабораторно подтверждены как полиомиелит. Лабораторное исследование включало выделение полиовируса в культуре клеток, определение серотипа, внутритиповую дифференциацию (ВТД) и частичное секвенирование генома. При ВТД с помощью иммунно-ферментного анализа (ИФА) и полимеразной цепной реакции (ПЦР) для большинства штаммов полиовируса была подтверждена невакцинная природа. Определение первичной структуры участка генома VP1 полиовируса и дальнейший филогенетический анализ показали, что этиологическим агентом вспышки является дикий полиовирус серотипа 1, имеющий наиболее близкое генетическое родство со штаммами полиовируса серотипа 1, выделенным в Индии. Несмотря на то, что нуклеотидная дивергенция между вирусами, изолированными во время вспышки, достигает 1%, все штаммы объединяются в одну монофилетическую группу. Полиовирусы этой же группы также были изолированы на территории Российской Федерации (от случаев ОВП и контактных лиц) среди граждан РФ, а также прибывших граждан Таджикистана и Узбекистана. Данные результаты согласуются с гипотезой единичной импортации в Таджикистан дикого полиовируса перед развитием вспышки заболевания. Один из выделенных на территории Таджикистана полиовирусов серотипа 1 был охарактеризован как

вакцинные методы ВТД, однако, при секвенировании участка генома VP1 было обнаружено, что он является сильно дивергировавшим вариантом вакцины. Этот факт указывает на необходимость внедрения альтернативных подходов ВТД, поскольку текущие методы могут пропускать подобные эпидемиологически значимые полиовирусы. В настоящее время ведется определение первичной структуры всего генома для некоторых штаммов, изолированных в ходе вспышки, с целью характеристики особенностей их природной эволюции. Для определения напряженности популяционного иммунитета к полиовирусу было проанализировано 340 сывороток крови на предмет наличия вирусспецифических нейтрализующих антител. Сыворотки были получены как от больных ОВП, так и от здорового населения Таджикистана. Значительная доля сывороток демонстрировала высокие титры антител (от 1:64 до 1:1024 и выше) к полиовирусу серотипа 1 при отсутствии антител (<1:8) к двум другим серотипам. Эти данные свидетельствуют о недостаточном уровне популяционного иммунитета до развития вспышки полиомиелита.

Для предотвращения дальнейшего развития вспышки на территории Таджикистана с мая по июнь 2010 г. было проведено 4 раунда иммунизации моновалентной (серотипа 1) оральной полиовирусной вакциной (ОПВ). Два раунда иммунизации были проведены для детей в возрасте до 6-ти лет и еще два – для детей в возрасте до 15-ти лет. Эти мероприятия привели к значительному снижению количества новых случаев ОВП. Необходимо отметить, что хотя применение моновалентной ОПВ привело к завершению вспышки полиомиелита и прекращению широкого распространения дикого полиовируса серотипа 1, уровень популяционного иммунитета к полиовирусам серотипов 2 и 3 по-прежнему остается очень низким. Поэтому существует острая необходимость иммунизации населения трехвалентной ОПВ, содержащей вирусы всех трех серотипов.

Вспышка полиомиелита в Таджикистане является самой крупной вспышкой из всех зарегистрированных с 2005 г. Это свидетельствует об исключительной опасности импорта дикого полиовируса из эндемичных регионов в страны с низким уровнем популяционного иммунитета. Очевидно, что крайне важно поддержание высокого уровня иммунизации населения полиовирусной вакциной. Кроме того, необходима срочная разработка адекватного серологического надзора за эффективностью иммунизации, особенно в регионах повышенного риска.

Работа выполнена при финансовой поддержке Всемирной Организации Здравоохранения, гранта президента РФ для молодых ученых МК-2600.2009.4, гранта РФФИ 08-04-00494а.

Раздел 10.

ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫЕ ИНФЕКЦИИ

АНАЛИЗ ИНФЕКЦИЙ, ПЕРЕНОСИМЫХ КЛЕЩАМИ, В ПРИРОДНЫХ ОЧАГАХ ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ

Гришечкин А.Е.¹, Морозова О.В.^{1,2}, Конькова-Рейдман А.Б.³,
Злобин В.И.^{1,4}

¹НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, Москва, 123098,

^{1,2} Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, 630090, Россия;

³ кафедра инфекционных болезней ГОУ ВПО «ЧелГМА», Челябинск,

⁴Иркутский государственный медицинский университет Росздрава, 664003 г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1.

Введение.

Среди 20 известных инфекционных агентов, переносимых клещами, наиболее распространены и изучены вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) внеклеточные спирохеты комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato* (s.l.) и внутриклеточные риккетсии и бартоanelлы. В Челябинской области заболеваемость клещевым энцефалитом за 2005–2008 гг. снизилась с 360 до 111 случаев. Количество зарегистрированных иксодовых клещевых боррелиозов за этот же период также снизилось с 384 до 170. Цель данной работы состояла в детекции и идентификации ВКЭ, боррелий и бартоanelл в имаго иксодовых клещей, собранных с растительности в Челябинской области.

Материалы и методы.

Голодных имаго таёжного клеща собирали в мае 2009 г. на флаг в природных очагах клещевого энцефалита в Каштакском бору вблизи поселка Каштак Челябинской области и в Еткульском районе Челябинской области (5509' с.ш., 61026' в.д.). Видовую принадлежность клещей определяли по морфологическим признакам. Всего исследовали 169 особей *Ixodes persulcatus* Schulze.

ИФА клещевых суспензий выполняли с применением тест-системы «ВектоВКЭ-антиген-стрип» и «ВектоВКЭ-антиген» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск, серия № D1154. Оптическую плотность измеряли на планшетном фотометре «Униплан» («Пикон», Россия) при длине волны 450 нм.

Нуклеиновые кислоты из индивидуальных клещевых суспензий выделяли с использованием набора РИБО-сорб производства «ИнтерЛабСервис» (г. Москва).

Детекцию ДНК боррелий проводили посредством ПЦР с тест-системой «Ампли-Лайм» (# КА-002-2) производства ООО «Омникс» (г. Санкт-Петербург).

Детекцию ДНК бартоanelл проводили посредством двухраундовой ПЦР с 0,5 мкМ каждого из праймеров: в первом раун-

де BART-F1 5'-GAAGAAACAАСТТСТGACTATG-3' и BART-R1 5'-CGCACAACСТТCACAGGATC-3' в режиме 940С 20 сек., 550С – 30 сек., 720С – 45 сек., 45 циклов; для второго раунда праймеры BART-F2 5'-CAGAAGТТGAAGTGAАAGАААА-3' и BART-R2 5'-TGСТТСТТCACCGGCATT -3' в режиме 940С 20 сек., 580С – 30 сек., 720С – 45 сек., 45 циклов. Электрофорез продуктов ПЦР проводили в 2% агарозном геле в буфере TBE.

Для подтверждения специфичности детекции боррелий, бартонелл и ВКЭ проводили определение нуклеотидных последовательностей продуктов ОТ-ПЦР с использованием праймеров для ПЦР и автоматического анализатора ДНК модели ABI 310 (Applied Biosystems, США), номера доступа в GU143820 - GU143822.

Результаты и обсуждение.

Среди имаго клещей *I. persulcatus* Schulze, собранных в мае 2009 г. в Челябинской обл., положительными в ИФА на антиген Е ВКЭ оказались 6,52±2,49%. По данным ОТ-ПЦР РНК ВКЭ обнаружена в 16,9±4,3%. На основании филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена Е все 13 изолятов ВКЭ от клещей из Челябинской области отнесены к сибирскому генетическому типу.

ДНК боррелий детектировали в 36,6±5,0% анализируемых образцов от клещей. Определены нуклеотидные последовательности продуктов ПЦР для межгенного спейсера генов 5S-23S рРНК, на основании гомологии которых с нуклеотидными последовательностями из базы данных GenBank и филогенетического анализа образцы ДНК отнесены к двум видам *Borrelia afzelii* и *Borrelia garinii*, что соответствует ранее определённым видам боррелий на территории Урала и Сибири. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента гена groEL бартонелл выявил наличие *Bartonella quintana* и *Bartonella henselae*, как показано нами ранее для таёжных клещей из Новосибирской, Томской и Омской областей.

Выводы.

Уровень вирусофорности таёжных клещей в Челябинской области в 2009 г. (16,9±4,3%) и сибирский генетический тип ВКЭ соответствовали наблюдениям в природных очагах России за последние годы. Частоты выявления ДНК боррелий (36,6±5,0%) и бартонелл (38,9±5,2%) также существенно не отличались от других природных популяций Урала и Сибири. Следовательно, снижение заболеваемости клещевым энцефалитом и иксодовыми клещевыми боррелиозами обусловлено не изменениями структур популяций циркулирующих в клещах патогенов человека, а успехами вакцинации против ВКЭ и санитарно-просветительной работы в отношении боррелий.

НОВЫЙ ПРОДУЦЕНТ БЕЛКА-АНТИГЕНА ВНЕШНЕЙ ОБОЛОЧКИ ХАНТАВИРУСА ДОБРАВА НА ОСНОВЕ ДРОЖЖЕЙ *YARROWIA LIPOLYTICA*

**Гусева М.А., Смирнова М.С., Баловнева М.В., Шибаета А.В.,
Зарипова Р.С., Белоусова Ж.В., Валиуллин Л.Ф., Малышева Е.В.,
Дудорова М.Г., Елагина Е.М., Леонович О.А.**

Учреждение российской академии медицинских наук Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН, МО, Россия
ФГУ «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных», Казань, Татарстан, Россия
Набережночелнинский государственный педагогический институт, Набережные Челны, Татарстан, Россия
Курский государственный университет, Курск, Россия
Смоленский государственный университет, Смоленск, Россия

В настоящее время хантавирусная инфекция в форме ГЛПС (геморрагическая лихорадка с почечным синдромом) представляет собой одно из наиболее распространенных на территории России природно-очаговых заболеваний. По данным Роспотребнадзора РФ, в 2006 году в 48 субъектах Российской Федерации зарегистрировано 7197 случаев заболеваний людей ГЛПС, показатель заболеваемости составил 5,0 на 100 тысяч населения. До настоящего времени в мире не существует вакцины, обеспечивающей специфическую защиту от ГЛПС, а средства специфической клинической диагностики этого заболевания остаются недостаточными. Во многом это обусловлено тем, что наиболее важный в серологическом отношении антиген хантавирусов – гликопротеид внешней оболочки G2, до настоящего времени не удалось получить в очищенном состоянии.

Нами была поставлена цель создать продуцент белка энVELOПА G2 вируса Добрава на основе экстремофильных дрожжей *Yarrowia lipolytica*, позволяющий получать и очищать необходимые количества антигена, установить его свойства, то есть подтвердить способность искусственно созданного белка специфически реагировать с антителами из сыворотки крови больных ГЛПС.

В порядке достижения поставленной цели были сформулированы и решены следующие задачи:

- Идентифицировать в составе М-сегмента хантавируса Добрава участок, кодирующий пептидный фрагмент, сохраняющий антигенную специфичность полноразмерного белка G2, но лишенный цитотоксического эффекта в отношении клеток гетерологичного продуцента.

- Создать конструкции, позволяющие получать иммунодоминантный пептид белка G2 хантавируса Добрава путем экспрессии в клетках *Y. lipolytica* в виде комплекса с белками-носителями.
- Получить штамм-продуцент *Y. lipolytica* с использованием идентифицированного нами индуцируемого щелочными условиями среды культивирования промотора гена α -кетоглутаратдегидрогеназы (KGDH).
- Оптимизировать метод культивирования продуцента, включающий индукцию промотора KGDH, позволяющий максимизировать выход целевого продукта.
- Разработать метод очистки иммунодоминантного пептида белка G2 хантавируса Добрава.

На основе анализа литературы, прежде всего, работы (Koch and Liang, 2003) нами предложена последовательность фрагмента белка G2, сохраняющая иммуногенность полноразмерного продукта, но не проявляющая токсичности по отношению к клеткам продуцента. Этот пептид длиной 65 а.о. получил рабочее название НТ.

В качестве исходного материала для создания гена, кодирующего целевой пептид, была использована кДНК хантавируса вируса Добрава Aa1854/Lipetsk.

Ранее в результате масс-спектроскопического исследования (MALDI-TOF) нами получены данные о том, что наиболее массовым белком, отвечающим за адаптацию *Y. lipolytica* к росту на среде с высоким значением рН, является продукт гена α -кетоглутаратдегидрогеназы (2-оксоисовалератдегидрогеназы). Этот результат был подтвержден с помощью репортерной системы на основе зеленого флуоресцентного белка GFP. Использование в экспериментах 96-луночных планшетов позволило изучить работу промотора KGDH в широком диапазоне значений рН среды, детально характеризовать их чувствительность к изменению количественного и качественного состава среды по таким параметрам, как доступность белково-пептидного гидролизата, сахаров, фосфора.

Репортёрная конструкция НК6 на основе гена KGDH была использована для конструирования продуцента пептида НТ в виде трифункционального слитого производного с зеленым флуоресцентным белком и фрагментом гена белкового ингибитора Кунитца из клубней картофеля РКР1-В1. Оценку выхода целевого продукта в продуцентах осуществляли с помощью электрофоретического анализа суммарных белков рекомбинантного продуцента по Лэммли. В условиях щелочной индукции на полноценной среде рекомбинантный продукт секретировался и накапливался в культуральной жидкости. Полученную культуральную жидкость подвергали очистке с помощью гельфильтрации. Проведенный электрофоретический анализ показал, что в результате

очистки удалось получить препарат белка НК6 с гомогенностью около 85% с выходом около 25% от исходного. Иммунореактивность полученного продукта была подтверждена методом непрямого иммуноферментного анализа с сыворотками 20 индивидуальных больных ГЛПС. В качестве отрицательного контроля служила панель из 20 сывороток здоровых доноров. При разведении сыворотки в 100 раз реакционная способность сывороток больных и здоровых доноров распределилась в две неперекрывающиеся группы, что позволяет использовать белок НК6 в качестве основы для создания тест-системы для диагностики хантавирусной инфекции.

Настоящая работа выполнена при поддержке Государственных контрактов № 14.740.11.0184, №П807, №П1253, №П1263, № 16.740.11.0027, №14.740.11.0123, № 14.740.11.0122; проектов в рамках мероприятия 1.2.2 шифры заявок (2010-1.2.2-203-002-038, 2010-1.2.2-207-003-082, 2010-1.2.2-141-022-040, 2010-1.2.2-141-022-018); мероприятия 1.3.1 шифры заявок (2010-1.3.1-207-003-043, 2010-1.3.1-203-002-017, 2010-1.3.1-203-002-018, 2010-1.3.1-220-006-021, 2010-1.3.1-141-022-028); а также гранта РФФИ № 09-04-99002-р_офи.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВСПЫШЕК, ВЫЗВАННЫХ ВИРУСОМ ЛИХОРАДКИ ЗАПАДНОГО НИЛА В ВОЛГОГРАДСКОЙ И РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТЯХ

Карань Л.С.¹, Шопенская Т.А.¹, Федорова М.В.¹, Колясникова Н.М.^{1,2}, Платонов А.Е.¹, Шипулин Г.А.¹, Русакова Н.М.³, Шишкина Л.В.³, Ткаченко Г.А.⁴, Говорухина М.В.⁵, Мазрухо Т.В.⁵, Валенцева А.А.⁶, Найда Е.А.⁷, Клиновая Е.П.⁸

¹ ФГУН «Центральный НИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора РФ, Москва, Россия;

² ГУ Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им.М.П. Чумакова РАМН; Московская обл., Россия;

³ ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Волгоградской области», Волгоград, Россия;

⁴ ФГУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», Волгоград, Россия

⁵ ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области», Ростов-на-Дону, Россия;

⁶ МУЗ Городская больница №1 им. Семашко г.Ростов-на-Дону, Ростов-на-Дону, Россия;

⁷ МУЗ Городская поликлиника №16 г.Ростов-на-Дону, Ростов-на-Дону, Россия;

⁸ МУЗ Центральная районная больница Сальского района г.Ростов-на-Дону, Ростов-на-Дону, Россия;

Введение. Лихорадка Западного Нила (ЛЗН) – острая вирусная природно-очаговая, трансмиссивная, летне-осенняя арбовирусная инфекционная болезнь, которая характеризуется лихорадочно-интоксикационным синдромом и частым поражением центральной нервной системы, встречается в странах с умеренным климатом. Возбудитель лихорадки Западного Нила (ЛЗН) – вирус Западного Нила (ВЗН), принадлежит к роду *Flavivirus* семейства *Flaviviridae* и является членом антигенного комплекса вируса японского энцефалита. По результатам сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей внутри вида различают 5 генотипов (не утверждены на момент 2009 года международным комитетом по таксономии вирусов, и порядок цифрового обозначения генотипов различается в российских и зарубежных публикациях): I – эпидемические штаммы, циркулирующие повсеместно: в Евразии, Африке, Америке и Австралии (вирус Кунджин из Австралии рассматривается как вариант ВЗН первого генотипа); II – изоляты из Южной и Центральной Африки и с Мадагаскара, изоляты из Украины, в 2002 г. РНК ВЗН этого генотипа обнаружена в комарах *Cq. richiardii* и *An.hyrceanus* в Астраханской области, в 2004 г. – в ястребе-тетеревятнике *Accipiter gentilis* в Венгрии и у больных в Ростовской области, в 2007 ВЗН II генотипа вызвал вспышку ЛЗН в Волгоградской области; V – штаммы из Индии, IV – два штамма из Краснодарского края, многочисленные изоляты от комаров *Uranotaenia unguiculata* и озерных лягушек *Rana ridibunda* в Волгоградской области, единичные находки в *An.hyrceanus* в Астраханской области; III – штамм *Rabensburg*, выделенный в Чехии.

С 1994 г. стали регистрироваться крупные вспышки ЛЗН, в том числе и в тех странах, где ранее случаи этого заболевания не наблюдались. В 1999 г. ЛЗН была зарегистрирована на востоке США и затем распространилась по всей территории этой страны. В Российской Федерации крупная вспышка ЛЗН также произошла в 1999 г. и охватила Волгоградскую, Астраханскую области и Краснодарский край (около 500 случаев). В последующие годы в этих регионах, а также в Ростовской области, продолжают регистрироваться случаи заболевания с подъемами в 2005 г. (Астраханская область, 73 случая) и в 2007 г. (Волгоградская область – 64 случая). В 2010 году зарегистрирована самая крупная вспышка ЛЗН на юге России, с 1999 года зарегистрировано более 360 случаев заболевания в Волгоградской области и более 40 – в Ростовской области.

Клиническая картина ЛЗН в последние 20 лет претерпела изменения, резко возросла тяжесть ее течения, летальность во время вспышек составляет 4-6%. В связи с этим ЛЗН вошла в число болезней, представляющих серьезную угрозу для здоровья населения. Своевременный выбор адекватной терапии в современных условиях должен основываться на комплексе лабораторных методов, позволяющих обеспечить раннюю дифференциальную экспресс-диагностику заболевания при поступлении больного в стационар.

Цель. Генетический анализ вспышек, вызванных вирусом ЛЗН на эндемичных территориях юга России.

Материалы и методы. Во время вспышки 2010 г. ЛЗН исследовано 139 сывороток крови из Волгоградской области и 38 из Ростовской области, а также аутопсийный материал от 5 умерших пациентов из Волгоградской области. Детекцию вирусной РНК осуществляли по разработанной нами методике, основанной на ПЦР в режиме реального времени и включающей праймеры и зонд, специфичный 5' нетранслируемой области и участку С гена ВЗН. Тест-система была апробирована на штаммах Eg-101, астраханском штамме Нр-94, африканском штамме (Wengler), азербайджанских штаммах А-72 и А-1640, а затем в течение 3 лет испытывалась на клиническом материале: сыворотках крови, спинно-мозговой жидкости от больных, у которых диагноз ЛЗН был поставлен на основании клинико-эпидемиологических данных и обнаружения специфических IgM к вирусу ЛЗН, а также на материале из внешней среды: тканях мозга птиц, комарах и клещах. Аналитическая чувствительность тест-системы составляет 5×10^3 коп/мл. Специфичность при анализе гетерологичных штаммов вирусов составила 100%.

Основные результаты. В ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора изучение ЛЗН началось в 1999 году на материале из Волгоградской области, в течение последующих лет (2000, 2001, 2002, 2003, 2007) велись динамические наблюдения за присутствием вируса в комарах и птицах, в клиническом материале от больных лихорадками, менингитами и энцефалитами в эпидемический сезон в данном регионе. В 2004 и 2010 гг. исследовалась сыворотки от больных из Ростовской области на наличие вирусной РНК с ее последующим генотипированием.

При исследовании переносчиков и резервуарных хозяев инфекции в 2000 – 2003 гг. на территории Волгоградской области вирусная РНК обнаружена в комарах *Culex pipiens* и воронах *Corvus corone*.

В эти годы все случаи заболевания и инфицирования комаров и птиц были вызваны вирусом Западного Нила I генотипа и относились

к так называемому «волгоградскому клону». При секвенировании полноразмерной последовательности генома от умершего больного в 1999 г. была установлена высокая степень гомологии данного изолята со штаммом, выделенном в Румынии из комаров во время вспышки ЛЗН в 1996 году. Данный «волгоградский» изолят циркулировал на территории Волгоградской области вплоть до 2003 года. В 2003, 2004 годах на территории Волгоградской области не наблюдалось случаев заболевания ЛЗН.

Возвращение эпидемической активности вируса зарегистрировано в 2005 году (4 случая), она продолжалась в 2006 году (7 больных) и новый подъем отмечался в 2007 году (64 больных).

В 2007 году нами был исследован следующий клинический материал из Волгоградской области: 16 проб лейкоцитарной фракции крови и 77 образцов сывороток крови от 56 больных ЛЗН. Вирусная РНК была обнаружена в 10 пробах. При секвенировании РНК 9 изолятов выявлена их принадлежность ко II генотипу ВЗН, ранее не встречавшемуся в Европе, США и Азии.

Также вирусная РНК была обнаружена в тканях мозга 1 погибшего от ЛЗН в 2007 году в Волгоградской области пациента, и проведено секвенирование полноразмерного генома данного изолята. При секвенировании показана уникальность данной вирусной популяции, вызвавшей вспышку ЛЗН в Волгограде в 2007 г. Близкого «генетического родственника» для волгоградских изолятов 2007 года найдено не было среди когда-либо изученных штаммов, нуклеотидные последовательности которых расшифрованы и депонированы в GenBank.

Во время этой вспышки была показана способность ВЗН II генотипа вызывать все виды клинического течения ЛЗН: от лихорадки легкой степени тяжести до энцефалитов с летальным исходом.

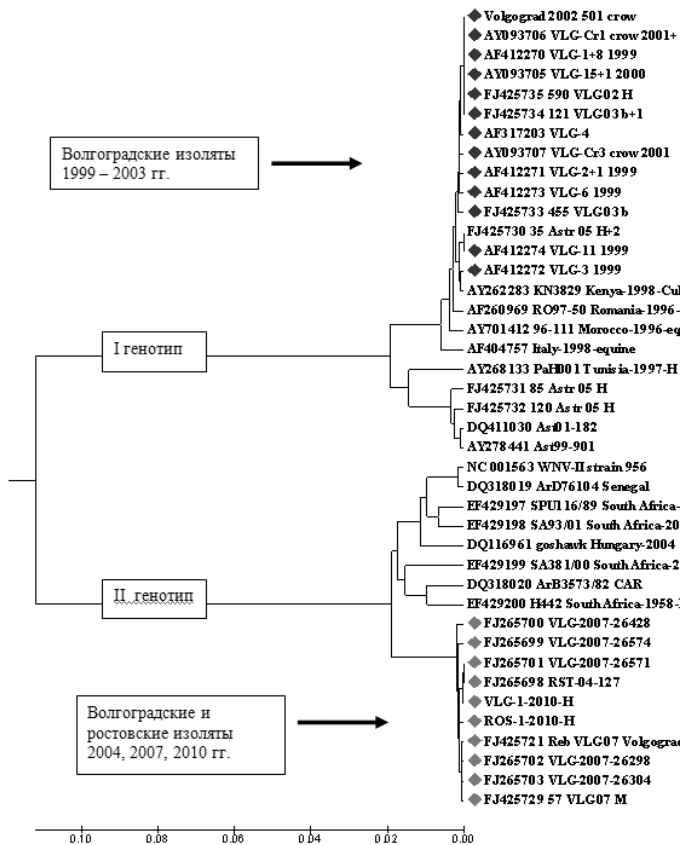
В 2010 году во время вспышки ЛЗН в Волгоградской области вирусная РНК обнаружена в аутоптатах 3 умерших пациентов и в 43 из 139 исследованных сывороток. При секвенировании 4 образцов показана 99,6% гомология ВЗН, вызвавшего вспышку в 2010 году в Волгоградской области, с изолятами 2007 года с этой же территории (рис.1).

Впервые клинический материал из Ростовской области, полученный от больных ЛЗН эпидсезона 2004 года, нами был изучен ретроспективно в 2007 году. При исследовании 6 сывороток от 6 больных ЛЗН вирусная РНК была выявлена в 2 пробах и при генотипировании отнесена ко II генотипу ВЗН, аналогичному изолятам вируса, вызвавшего вспышку в Волгоградской области в 2007 году. В 2010 году РНК ВЗН выявлена в 11 пробах из 38 исследованных. При секвенировании 2 образцов было показано, что вспышка вызвана WNV II генотипа, и вирус идентичен волгоградским образцам 2007 и 2010 годов (рис.1).

Заклучение. ЦНИИ эпидемиологии предложена лабораторная методика, позволяющая выявлять РНК вируса ЛЗН в сыворотках крови пациентов, в аутопсийном материале от инфицированных людей с целью применения как одного из диагностических методов, а также в ткани мозга птиц и комарах при проведении вирусологического мониторинга на территориях эндемичных по данному заболеванию.

Рис.1 Дендрограмма генетического родства изолятов ВЗН, основанная на нуклеотидной последовательности участка E гена.

Дендрограмма построена с помощью программы Mega 3.1 и использованном Neighbor Joining и модели расстояния Kimura 2-parameter.



ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИЙ, ПЕРЕДАЮЩИХСЯ ИКСОДОВЫМИ КЛЕЩАМИ, НА ОСНОВЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Колясникова Н.М.^{1,2}, Карань Л.С.², Топоркова М.Г.³, Махнева М.А.³,
Надеждина М.В.³, Есаулкова А.Ю.⁴, Романенко В.В.⁴, Сбитнева Н.Н.⁵,
Оленькова О.М.⁵, Платонов А.Е.²

¹ ГУ Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им.М.П. Чумакова
РАМН; Московская обл., Россия;

² ФГУН «ЦНИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия;

³ Городская клиническая больница №33, г. Екатеринбург, Россия;

⁴ Центр гигиены и эпидемиологии в Свердловской области, г.
Екатеринбург, Россия;

⁵ Клинико-диагностический центр, г. Екатеринбург, Россия.

Введение. В условиях существования сочетанных очагов клещевых инфекций и роста числа людей, пострадавших от укусов клещей, большое значение приобретает дифференциальная лабораторная диагностика. Иксодовые клещи являются переносчиками различных патогенных для человека микроорганизмов: вируса клещевого энцефалита (ВКЭ), боррелий, возбудителей гранулоцитарного анаплазмоза человека, моноцитарного эрлихиоза человека, риккетсий, бабезиоза, бартонеллеза и других. Клиническая дифференциальная диагностика этих заболеваний крайне затруднена, в то время как терапия вирусных и бактериальных заболеваний принципиально различна. Поэтому своевременный выбор адекватной терапии в современных условиях должен основываться на комплексе лабораторных методов, позволяющих обеспечить дифференциальную экспресс-диагностику при поступлении больного в стационар.

Цель. Разработка комплекса тест-систем ПЦР для экспресс-диагностики патогенных микроорганизмов, переносимых клещами, в клиническом материале и объектах окружающей среды.

Материалы и методы. В 2009-2010 годах исследованы кровь и ликвор от 426 пациентов, госпитализированных в ГКБ № 33 г. Екатеринбурга с заболеваниями, развившимися после присасывания клеща или посещения природных зон в эпидемический сезон. Для детекции возбудителей клещевых инфекций: ВКЭ, боррелий комплекса *B.burgdorferi sensu lato*, *A.phagocytophillum*, *E.muris*/*E.chaffeensis* и *B.miyamotoi* использовали коммерческую тест-систему «Amplisens TBEV, *B.burgdorferi sensu lato*, *A.phagocytophillum*, *E.muris*/*E.chaffeensis-Fl*» (ЦНИИ Эпидемиологии, Москва), для диагностики *B.miyamotoi* - разработанную нами тест-систему на основе

РРВ-ПЦР. Для изоляции нуклеиновых кислот из суспензий клещей, лейкоцитарной фракции крови, спинномозговой жидкости (СМЖ), тканей мозга применяли набор «Рибо-преп» (Амплисенс, Москва), позволяющий одинаково эффективно экстрагировать из биоматериала РНК и ДНК. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием набора «Reverta-L» (Амплисенс, Москва). Для проведения РВ-ПЦР использовали амплификаторы RotorGene 6000 (Corbette Researche, Австралия) и iQ5 (BioRad, США).

Основные результаты. Эффективность комплекса методик оценена путем исследования проб крови больных иксодовым клещевым боррелиозом, клещевым энцефалитом и микст-инфекцией – клещевой энцефалит/боррелиоз – из Свердловской области. Показано, что при ПЦР исследовании проб крови, взятых при поступлении больного, возможно установление этиологии заболевания у 39% больных, в то время как на основании серологических данных диагноз, как правило, ставится не ранее второй недели лечения. Ложноположительные результаты ПЦР диагностики отсутствовали. Заболевания, вызванные анаплазмой или эрлихиями, методом ПЦР не выявлены. Показано, что более 50% случаев клещевого боррелиоза в безэритемной форме были вызваны *B.miyamotoi*, среди возбудителей боррелиоза в эритемной форме выявлена *B.garinii*. Диагностическая чувствительность созданной ПЦР методики определялась относительно данных серологического анализа или присутствия патогномичного признака боррелиоза – эритемы, и для детекции ВКЭ составила 29%, для боррелий комплекса *B.burgdorferi sensu lato* – 20%, данные результаты исследования позволяют использовать этот метод только в качестве метода экспресс-диагностики клещевого энцефалита и иксодового боррелиоза в первые дни госпитализации, который обязательно должен быть дополнен серологическим исследованием парных проб сыворотки крови в динамике.

Новым явлением, обнаруженным в ходе данной работы, является присутствие рНК *B.miyamotoi* в 53% проб от больных ИКБ в безэритемной форме в Свердловской области. Клинически инфекция *B.miyamotoi* характеризовалась лихорадкой и общеинтоксикационным синдромом, что во многих чертах совпадало с клинической картиной клещевого энцефалита в лихорадочной форме и препятствовало своевременному началу антибиотикотерапии. Открытие нового варианта иксодовых клещевых боррелиозов требует немедленного создания и внедрения серологических и ПЦР методик для дифференциальной диагностики данного заболевания и выяснения степени его распространенности в Евразии, а также детального исследова-

ния клинической картины и разработки предпочтительных способов терапии.

Закключение. Одновременная детекция четырех патогенов, передаваемых одним видом переносчика, существенно сокращает время дифференциальной диагностики и является удобным форматом исследования для врача-лаборанта. Включение в комплекс методик тест-системы для выявления *V.miyamotoi* представляет уникальную на настоящий день возможность для диагностики этой «новой», ранее неизвестной инфекции.

РАЗРАБОТКА И ПРИМЕНЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В ОБЛАСТИ ДИАГНОСТИКИ КОКСИЕЛЛЕЗА

Лазарева Е.Н.¹, Федорова М.В.², Карань Л.С.², Колясникова Н.М.²,
Ниталиева С.Ж.³, Малеев В.В.², Галимзянов Х.М.¹, Буркин А.В.³,
Хок М.М.³, Бабаева М.А.³

¹ Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Астраханская государственная медицинская академия, Астрахань, Россия

²ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

³ Областная инфекционная клиническая больница, г. Астрахань, Россия

Ку-лихорадка — острая инфекция из группы риккетсиозов, характеризующаяся поражением ретикулоэндотелиальной системы, интоксикацией, лихорадкой. Возбудитель заболевания — риккетсия *Coxiella burnetii* рода *Coxiella* трибы *Rickettsiae* семейства *Rickettsiaceae*. Лихорадка Ку относится к зоонозам с природной очаговостью. Резервуарами возбудителя в природе являются мелкие млекопитающие (преимущественно грызуны), птицы, а также иксодовые, аргасовые, гамазовые и краснотелковые клещи. Существование стойких природных очагов инфекции способствует заражению различных видов домашних животных и формированию вторичных антропоургических очагов. Основными источниками инфекции в антропоургических очагах сельской местности являются мелкий и крупный рогатый скот, а в городах — собаки и кошки.

Заболевание регистрируют повсеместно, особенно в районах с развитым животноводством. Территориями, эндемичными по Ку-лихорадке, являются западная часть США, Австралия, Африка, Великобритания, страны Средиземноморского бассейна. В РФ заболеваемость Ку-лихорадкой составляет в среднем 0,02 на 100 тыс. насе-

ления, очаги коксииеллеза зарегистрированы в Западно-Сибирском и Поволжском регионах, в Центрально-Черноземном регионе и на Северном Кавказе. В настоящее время наибольший показатель заболеваемости регистрируется в Астраханской области. Неравномерность территориального распределения заболеваемости скорее всего связана с недостаточной эффективностью выявления этой инфекционной патологии.

Диагностика Ку-лихорадки затруднена из-за отсутствия патогномичной симптоматики и практически невозможна без лабораторного обследования больного в реакции со специфическими антигенами. Наиболее часто заболевание проходит под диагнозом ОРВИ, реже – лихорадка неясной этиологии, бронхит, пневмония, гепатит [1].

Целью данной работы было изучение возможности использования для лабораторного подтверждения коксииеллеза метода выявления ДНК *Coxiella burnetti*, основанного на ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

Материал.

Исследовали 70 проб крови больных с подозрением на инфицированность *S.burnetti*, поступивших в Астраханскую областную инфекционную больницу в 2010 г

Результаты.

Диагноз Ку-лихорадка подтвержден методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени у 54 пациентов, при этом сроки забора крови для проведения ПЦР варьировали от 1 до 15 дней от момента заболевания.

Преимущественно заболевали мужчины (83%) в возрасте от 15 до 74 лет. Среди них 47% составили пациенты в возрасте 20-30 лет, в эпиданамнезе которых указан выезд на природу, употребление сырой некипяченой воды и мясных продуктов после недостаточной термической обработки. В числе иных возможных источников заражения отмечены употребление в пищу сырого коровьего и козьего молока, работа в степи и на фермах с домашними животными.

Возраст заболевших женщин колебался от 30 до 60 лет; к моменту начала заболевания большинство пациенток пребывали за городом и в качестве возможной причин заболевания называют употребление сырого молока.

Начала заболевания характеризовались острым началом с подъема температуры тела до 38-39°C у 48% больных, а 28% – выше 39°C. И только в 24% случаев в первые сутки заболевания отмечался субфебрилитет. У 78% наблюдаемых больных преимущественно на третьи сутки лихорадки отмечался озноб. Продолжительность лихорадоч-

ного периода варьировала от 4 до 29 дней, в среднем составляла 7-8 дней.

Многие отечественные клиницисты такие симптомы как слабость, головная боль связывают с проявлениями риккетсиозной интоксикацией. Однако нами было отмечено, что у наблюдаемых больных в 97% случаев слабость сохранялась и в период регрессии клинической симптоматики, а в 87% - до момента выписки из стационара. Головная боль носила преимущественно разлитой характер с умеренной интенсивностью и регистрировалась при подъеме температуры тела.

На 3-4 сутки заболевания у 42% пациентов наблюдалась миалгия конечностей, интенсивность которой была связана с лихорадкой. Помимо этого 30% больных предъявляли жалобы на боли в суставах стоп и кистей. Продолжительность этих симптомов составляла в среднем трое суток и с нормализацией температуры они регрессировали.

С момента поступления в среднем до 10 дня болезни у 28% больных регистрировали увеличение печени, в этой группе больных 87% составляли мужчины. В 95% случаев гепатомегалия сопровождалась желтушностью кожных покровов с отсутствием зуда.

Практически у всех наблюдаемых больных регистрировалась тромбоцитопения. Уровень тромбоцитов в крови колебался в диапазоне от 53×10^9 до 293×10^9 и в среднем составлял 114×10^9 / л.

Заключение.

Результаты проведенных исследований показывают, что предложенный метод ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени может быть использован для ранней диагностики данного инфекционного заболевания, не обладающего специфичными клиническими симптомами.

1. Природная очаговость болезней: исследования института Гамалеи. Москва. Русаки. 2003.

Раздел 11.
ОСОБО ОПАСНЫЕ ИНФЕКЦИИ

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* МЕТОДОМ DFR

Ефременко Д.В.¹, Кузнецова И.В.¹, Остапович В.В.¹, Жаринова Н.В.¹, Платонов М.Е.², Евсева В.В.², Чиркова Е.В.², Гпельченкова Т.В.², Дентовская С.В.², Анисимов А.П.², Куличенко А.Н.¹

¹ФГУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия

²ФГУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболensk, Россия

В мире ежегодно регистрируются заболевания чумой. В настоящее время в связи с наличием активных природных очагов чумы в Северо-Кавказском федеральном округе России и на приграничных территориях Казахстана, Монголии и Китая, существует постоянная угроза возникновения вспышек этой инфекции на территории Российской Федерации. Возбудитель чумы *Yersinia (Y.) pestis* входит в список патогенных биологических агентов, представляющих наибольшую угрозу в качестве средства биотерроризма.

Y. pestis – эволюционно молодой вид бактерий, который относительно недавно произошел от *Y. pseudotuberculosis*. Приобретение множества чужеродных генов и утрата некоторого количества своих способствовало повышению вирулентности и патогенности *Y. pestis* и переходу возбудителя к облигатному паразитизму. Однако, непродолжительная история эволюционирования возбудителя чумы затрудняет внутривидовую дифференциацию данного микроба, необходимую для целей молекулярной эпидемиологии.

Отличающийся участок ДНК (DFR-локус) – это участок генома, по наличию которого отличаются штаммы одного вида. В геноме *Y. pestis* было выявлено 23 DFR-локуса. На основании учета присутствующего в геноме *Y. pestis* набора DFR-локусов была разработана технология генотипирования штаммов чумного микроба. Так как в каждом природном очаге чумы циркулируют штаммы *Y. pestis* преимущественно одного DFR-генотипа, метод DFR-типирования может быть использован при решении молекулярно-эпидемиологических задач.

Целью нашей работы было изучение геномного полиморфизма штаммов чумного микроба из очагов Северного Кавказа и Средней Азии методом DFR-типирования.

В связи с тем, что три DFR-локуса *Y. pestis* расположены на плазмиде pFra и, следовательно, отсутствие этих DFR-локусов у штаммов чумного микроба, содержащих данную плазмиду и штаммов с pFra-, имеет принципиальное отличие, для исследования нами были выбраны только штаммы с pFra+.

В работе были использованы 40 штаммов *Y. pestis* из рабочей коллекции патогенных микроорганизмов ФГУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, выделенных в группе Средне-Азиатских пустынных (7 штаммов), Центрально-Кавказском высокогорном (6 штаммов), Восточно-Кавказском высокогорном (5 штаммов), Иорском равнинно-предгорном (1 штамм), Дагестанском равнинно-предгорном (5 штаммов), Прикаспийском песчаном (5 штаммов), Терско-Сунженском низкогорном (1 штамм), Таласском высокогорном (7 штаммов), Гянджа-Казахском равнинно-предгорном (3 штамма) природных очагах чумы. Изучение штаммов чумного микроба проводили с помощью полимеразной цепной реакции с учетом результатов методом геле-электрофореза.

Для определения генотипа исследованных штаммов использовали данные о ранее описанных 92 DFR-генотипах *Y. pestis*.

На основании проведенных исследований было определено, что 32 штамма *Y. pestis* вошли в состав ранее описанных DFR-типов: 15 (16 штаммов), 46 (6 штаммов), 17 (4 штамма), 01b (3 штамма), 79 (2 штамма), 04 (один штамм). Оставшиеся 8 штаммов чумного микроба обладали ранее не встречавшимся DFR-профилем и были отнесены нами к DFR-типам 92 (5 штаммов), 93 (один штамм), 94 (один штамм), 95 (один штамм). В таблице 1 представлено распределение DFR-типов исследованных штаммов по различным природным очагам чумы.

Таблица 1 – Результаты генотипирования штаммов *Y. pestis* методом DFR

Название природного очага чумы	DFR 01b	DFR 04	DFR 15	DFR 17	DFR 46	DFR 79	DFR 92	DFR 93	DFR 94	DFR 95
Терско-Сунженский низкогорный	–	–	1	–	–	–	–	–	–	–
Гянджа-Казахский равнинно-предгорный	–	–	3	–	–	–	–	–	–	–
Иорский равнинно-предгорный	–	–	1	–	–	–	–	–	–	–
Таласский высокогорный	2	1	–	–	–	2	–	1	1	–

Группа Средне-Азиатских пустынных	1	-	5	-	-	-	-	-	-	1
Центрально-Кавказский высокогорный	-	-	2	4	-	-	-	-	-	-
Восточно-Кавказский высокогорный	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-
Дагестанский равнинно-предгорный	-	-	3	-	2	-	-	-	-	-
Прикаспийский песчаный	-	-	1	-	4	-	-	-	-	-

Таким образом, на основании исследования 40 штаммов чумного микроба методом DFR, нами были получены данные о генетической вариабельности штаммов *Y. pestis*, изолированных из очагов Северного Кавказа и Средней Азии, которые могут быть использованы при решении молекулярно-эпидемиологических задач, обнаружены ранее не описанные DFR 92, DFR 93, DFR 94, DFR 95 генотипы.

РАЗРАБОТКА И ЛАБОРАТОРНЫЕ ИСПЫТАНИЯ МЕТОДОВ ЭКСПРЕССНОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСОБО ОПАСНЫХ ВИРУСНЫХ И БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ НА ОСНОВЕ МИКРОЧИПОВОЙ ТЕХНОЛОГИИ

Маркелов М.Л.¹, Чеканова Т.А.¹, Пудова Е.А.¹, Дедков В.Г.¹, Карань Л.С.¹, Яцышина С.Б.¹, Кузнецова С.В.¹, Зацепин Т.С.¹, Шемякин И.Г.², Бикетов С.Ф.², Соловьев П.В.², Шипулин Г.А.¹

¹ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

²ФГУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Россия

Оперативная дифференциальная лабораторная диагностика инфекционных заболеваний позволяет принимать адекватные, экономически целесообразные меры по предотвращению распространения инфекции. Об эффективности проводимых в Российской Федерации работ в этом направлении свидетельствуют примеры успешного мониторинга и предотвращения распространения завозимых из-за

рубежа возбудителей инфекций, таких как холера, ТОРС, гриппа H5N1, гриппа H1N1 и др. Современные методы лабораторной диагностики инфекционных заболеваний должны отличаться высокой технологичностью, информативностью, производительностью и низкой себестоимостью для одновременного выявления целого ряда патогенных микроорганизмов и быстрой дифференциальной диагностики инфекционных заболеваний.

Наиболее эффективным для достижения этих целей является подход, включающий в себя геномный и протеомный этапы молекулярной диагностики. Геномный этап позволяет проводить прямое определение специфического фрагмента генома микроорганизма - возбудителя инфекционного заболевания с использованием методов анализа нуклеиновых кислот (полимеразная цепная реакция (ПЦР), секвенирование и др.). Протеомный этап позволяет осуществлять анализ белковых антигенов микроорганизма и антител - иммунологических маркеров инфекции с использованием различных методов иммунологического анализа (ИФА, иммуноблоттинг, иммунофлуоресценция, иммунохемилюминесценция и др.).

Иммуночиповые технологии, являясь логическим продолжением развития методов диагностики на основе ИФА, обеспечивают возможность одновременного выявления маркеров не единичных инфекций, а десятков и даже сотен, сохраняя при этом высокую чувствительность скрининговых методов и высокую специфичность подтверждающих тестов. Ничтожно малые количества биологически активных молекул для сорбции на твердой фазе (в 100 и более раз меньше, чем в традиционных форматах ИФА), которые используются в тест-системах на основе иммуночипов, позволяют уменьшить стоимость и время проведения комплексного анализа в несколько раз. Тоже относится и к ДНК-чипам, которые не только активно используются для решения научных задач, связанных с необходимостью гибридационного анализа гетерогенных смесей ДНК и РНК, но и для решения прикладных задач мультиплексного анализа при генотипировании микроорганизмов и расшифровке вспышек инфекционных заболеваний неясной этиологии.

За счет многофакторного анализа с помощью биочипов можно осуществлять быструю одновременную детекцию множества видов возбудителей особо опасных инфекций с характеристикой их по важнейшим признакам (патогенность, таксономическая принадлежность), что особенно важно при угрозе биотеррористических актов. Начиная с 2006 года, на базе ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора проводятся научно-исследовательские работы по созданию иммуночипов и ДНК-чипов для диагностики инфекционных заболеваний.

В рамках реализации мероприятий по выполнению федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009-2013 годы)» совместно с ФГУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора проводятся работы по использованию иммуночипов и ДНК-чипов для выявления *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis* и *Francisella tularensis*. Данные микроорганизмы относятся к I-II группе патогенности и являются возбудителями особо опасных заболеваний человека и животных - сибирской язвы, чумы и туляремии, соответственно. Актуальность проведения данной работы обусловлена способностью данных микроорганизмов существовать в природных резервуарах в виде спор, чрезвычайно устойчивых к химическому и физическому воздействию (*Bacillus anthracis*), или долгое время персистировать в популяциях грызунов (*Yersinia pestis* и *Francisella tularensis*).

Выбор формата тест-систем на основе биочипов, приборно-аппаратной базы и особенностей процедур проведения анализов биологических препаратов определялся необходимостью создания открытой технологической платформы, позволяющей расширять перечень выявляемых патогенных организмов за счет увеличения количества ДНК/РНК и белковых маркеров инфекций до нескольких десятков и даже сотен. Учитывалась необходимость предоставления в распоряжения служб эпидемиологического контроля недорогих высокопроизводительных средств для быстрого анализа одновременно большого количества образцов на наличие нескольких маркеров патогенных микроорганизмов.

Благодаря наличию информации о структурных отличиях геномов и плазмид представителей рода *Yersinia*, патогенных для человека (*Y. pestis* (возбудитель бубонной и легочной чумы), *Y. pseudotuberculosis* (возбудитель дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки) и *Y. enterocolitica* (возбудитель иерсиниоза)) существует принципиальная возможность выбора специфических олигонуклеотидных праймеров для выявления соответствующих кластеров с помощью ПЦР.

В случае использования ДНК-чипов в качестве инструмента выявления продукта амплификации (так же как и при использовании олигонуклеотидных зондов для ПЦР в реальном времени) удастся существенно улучшить специфичность теста за счет процедуры гибридизационного анализа на ДНК-чипе с олигонуклеотидом (олигонуклеотидами) гомологичными последовательностям ампликона.

Для видовой идентификации *Y. pestis* нами были выбраны четыре локуса. Два локуса, расположенных на плаزمиде, кодирующих антигены вирулентности: *calF1* оперон на плазмиде pMT1; ген *pla* (протеаза

активирующая плазминоген = плазминогеновый активатор) на плазмиде рРСР. А также, два локуса расположенных на хромосоме *Y.pestis*, которые отсутствуют в хромосоме *Y.pseudotuberculosis*: YPO0394 и YPO0397. Данные кластеры были выявлены путем вычитающей гибридизации ДНК геномов штаммов *Y.pestis* и *Y.pseudotuberculosis* /1/.

При выборе олигонуклеотидных праймеров и зондов на указанные кластеры принималась во внимание необходимость исключения возможности формирования шпилечных структур внутри олигонуклеотидов и между парными праймерами. Для этих целей использовались ресурсы, предлагаемые на серверах <http://www.bioinfo.rpi.edu/> и <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligo.html>. Кроме того, структуры всех олигонуклеотидов сравнивались с помощью информационного ресурса NCBI BLAST с последовательностями ДНК, депонированными в базе данных GenBank. Данная процедура необходима для исключения из структур выбираемых олигонуклеотидов существенной гомологии с ДНК каких-либо других организмов. В качестве инструмента для дополнительного анализа и редактирования последовательностей ДНК использовался программный пакет Vector NTI (Invitrogen Corporation, США).

Таким образом, для оперона *calF1* были выбраны три пары праймеров и зондов, соответствующих фрагментам длиной 306, 169 и 78 пар оснований. Для гена *pla* - одна пара праймеров и зонд, соответствующие фрагменту длиной 191 пар оснований. И наконец, для хромосомных кластеров YPO0394 и YPO0397 - по одной паре праймеров и зондов, соответствующих длинам фрагментов 108 и 85 пар оснований.

Аналогичным образом был осуществлен дизайн праймеров и зондов для идентификации возбудителя туляремии *Francisella tularensis*. Для данного микроорганизма выбранные праймеры локализованы в пределах кластеров *iglABCD* (208 пар оснований), *forA* (159 п.о.), *RD1* (163 п.о.), *mvIN* (197 п.о.). Оперон *iglABCD* локализован на хромосоме туляремиального микроба в пределах острова патогенности FPI (от англ. – pathogenicity island of *F. tularensis*) размером 30 т.п.о., который фланкирован транспозазами. Ген *iglC* отвечает за синтез белка размером 23 кДа, который по литературным данным /2/ играет решающую роль в персистенции возбудителя в макрофагах. С учетом распространенности в природных источниках условно патогенного вида *Francisella philomiragia* при дизайне праймеров и зонда на данный локус мы стремились свести к минимуму гомологию олигонуклеотидов к оперону *iglABCD* этого микроорганизма.

Выбор фрагмента гена *forA*, кодирующего белок внешней мембраны, обусловлен имеющимися литературными данными о возможности детекции *F. tularensis* на основании выявления с помощью ПЦР

данного фрагмента /3/. Кроме того, указанный локус имеет повышенный G+C состав на фоне общего низкого G+C (36-39%) состава ДНК генома *F. tularensis*, что позволяет выбрать праймеры с повышенной температурой плавления для увеличения специфичности ПЦР.

Праймеры и зонд в пределах последовательности RD1-области (от англ. – regions of difference) были положены на участок размером 262 п.о., который идентичен для всех на сегодняшний день описанных подвидов и биоваров *F. tularensis* /4/.

Ген *mviN* кодирует интегральный белок мембраны, ассоциирован с вирулентностью туляремийного микроба и в связи с этим также представляет интерес в качестве мишени для идентификации *F. tularensis*.

Все выявленные на сегодняшний день вирулентные штаммы *Bacillus anthracis* содержат плазмиды pXO1 и pXO2. Гены белков, контролирующих синтез токсина, локализованы на плазмиде pXO1. Гены белков, участвующих в синтезе капсулы, локализованы на плазмиде pXO2. Известно, что утрата одной из плазмид приводит к потере штаммом вирулентности. Принимая это во внимание, в качестве мишеней для ПЦР нами были выбраны гены *capA* и *capB* (capsule biosynthesis protein), находящиеся на плазмиде pXO2, и ген *pagA* (protective antigen precursor), находящийся на плазмиде pXO1. Выбранным мишеням соответствуют продукты амплификации следующих размеров: *capA* (289 п.о.), *capB* (182 п.о.), *pagA* (466 п.о.).

Специфичность всех выбранных праймеров для ПЦР была подтверждена экспериментально на клиническом материале и ДНК бактериальных штаммов микроорганизмов, полученных из отдела коллекционных культур и отдела особо опасных инфекций ФГУН ГНЦПМБ. Контроль размеров фрагментов проводился с помощью гель-электрофореза в агарозном геле (или акриламидном геле). Первичная последовательность ампликонов анализировалась с помощью автоматического секвенирования (Applied Biosystems, США). Кроме того, все фрагменты были проклонированы в плазмиды *E.coli* для дальнейшего использования их в качестве контрольных образцов.

Как отмечалось выше, использование ДНК-чипа наиболее целесообразно при анализе сложных смесей ДНК или РНК, включающих от 10 до нескольких тысяч вариантов индивидуальных молекул (фрагментов генов). Даже без предварительной процедуры амплификации с помощью ДНК-чипов можно выявлять 1000 и более индивидуальных фрагментов генов в объеме 10-100 мкл гибридационного раствора.

Процедура проведения анализа в предлагаемом нами варианте тест-системы включает следующие стадии:

- выделение ДНК/РНК возбудителя из биологического материала;

- амплификация с помощью ПЦР фрагментов генов-маркеров микроорганизма;
- включение молекулярных меток в гибридизационную пробу;
- собственно гибридизация пробы на ДНК чипе;
- сканирование биочипа – получение цифрового образа ДНК чипа;
- математический анализ результатов гибридизации.

Продуктом амплификации при проведении ПЦР является двухцепочечная ДНК, которую перед гибридизацией на ДНК-чипе необходимо денатурировать прогреванием или обработкой щелочью. В ряде случаев целесообразно удалять из раствора некоплементарную олигонуклеотидную зонду (иммобилизованную на ДНК-чипе) цепь ДНК. Однако эти процедуры удорожают анализ, кроме того время гибридизации без предварительного концентрирования пробы может составлять несколько часов. Для увеличения эффективности процесса гибридизации на ДНК-чипе мы ввели дополнительную стадию синтеза РНК. Для этого в структуру одного из праймеров для каждого ампликона ввели последовательность промотора РНК-полимеразы бактериофага T7. После проведения ПЦР в реакционную смесь добавляли рибонуклеотидтрифосфаты и РНК-полимеразу бактериофага T7. Кроме того, в реакционную смесь включали biotin-UTP, или Cy3-UTP, или Cy5-UTP. После дополнительной инкубации в течение 15 минут при 37°C к реакционной смеси добавляли гибридизационный буфер и наносили непосредственно на ДНК-чип. Следует отметить, что на одном стандартном слайде (препаративное стекло 25x75мм) проводили анализ одновременно 12-16 образцов за счет использования специальных рамок, делящих слайд на индивидуальные ячейки-эрреи. В пределах каждой ячейки на поверхности слайда в виде индивидуальных точек (диаметром 300 мкм) иммобилизованы в трех повторах специфические олигонуклеотиды, гомологичные соответствующим ампликонам. В соответствии с количеством выбранных мишеней в пределах каждого эррея находилось 13 вариантов зондов к выявляемым кластерам микроорганизмов и 1 зонд для контроля гибридизации. Всего с учетом повторов на площади 6x6 мм располагалось по 42 точки (14x3). Нанесение препаратов аминированных олигонуклеотидов на поверхность активированных слайдов производили с помощью специальных наноплоттеров с пьезоэлектрическими диспенсерами (GeSim, Германия).

За счет использования дополнительной стадии транскрипции в процессе гибридизации участвовала не ДНК, а одноцепочечная РНК в высокой концентрации (до 10 мкг в 50 мкл гибридизационного раствора). В итоге время гибридизации составляло всего 15 минут. Последующие отмывки с использованием автоматического 3D воше-

ра биочипов (BIOSAN, Латвия) составляли не более 30 минут для 64 образцов, размещенных на 4 слайдах и зафиксированных в специальных рамках с шагом между соседними ячейками равным 9 мм, т.е. в формате стандартной 96-ти луночной плашки.

Флуоресцентное изображение слайда и последующий анализ проводился с использованием сканеров ScanArray Express (PerkinElmer) и MarS (Ditabis, Германия) и программного обеспечения для обработки изображения.

Без учета времени экстракции ДНК и проведения ПЦР анализ продуктов амплификации с использованием ДНК-чипов составляет около 2 часов. С учетом того, что чувствительность использованных сканеров составляет 0,05-1 единиц флуорофора на один кв. мкм теоретически чувствительность детекции специфических продуктов амплификации с помощью ДНК-чипов существенно превышает электрофоретические методы и даже ПЦР в реальном времени, что расширяет возможности подбора условий проведения мультипраймерной амплификации с использованием ПЦР. Т.е. даже при низкой эффективности амплификации отдельных фрагментов за счет высокой чувствительности детекции на чипах возможна уверенная регистрация наличия в смеси таких фрагментов. Нами были подобраны соотношения праймеров для всех 13 выбранных мишеней для мультипраймерной амплификации, при которой одновременно выявляются все выбранные локусы для *Bacillus anthracis* и *Francisella tularensis* и 4 локуса для *Yersinia pestis* при условии наличия в реакционной смеси 1, 10 и 1 эквивалента генома соответственно.

Таким образом, нам удалось разработать тест-систему на основе олигонуклеотидных биочипов, для одновременной экспресс-идентификации возбудителей чумы, сибирской язвы и туляремии.

Альтернативным подходом для выявления и идентификации возбудителей особо опасных инфекций по-прежнему являются иммунохимические методы с использованием высокоспецифичных антител. В рамках программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009-2013 годы)» нами была разработана и апробирована на клиническом материале тест-система в формате иммуночипа для выявления антигенов возбудителей особо опасных инфекций на примере сибирской язвы и чумы.

Принцип работы иммуночипа построен на иммуноферментном сэндвич-методе с помощью флуоресцентной детекции. Наиболее высокая чувствительность теста в отношении выявления штаммов сибирской язвы *Bacillus anthracis* достигается при иммобилизации высокоспецифичных моноклональных антител SA26 и последующей специфической детекции образовавшегося комплекса антиген-

антитело с помощью конъюгата биотинилированных антител анти-TSA (фракция 4Б). С целью выявления *Y.pestis* предпочтительно использовать поликлональные антитела IgG F1 для иммобилизации на поверхность микроскопных слайдов, а в качестве детектирующих антител моноклональные антитела F19, которые были нами биотинилированы. Моноклональные и поликлональные антитела ранее были получены в ФГУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск. Антитела SA26 и IgG F1, а также маркеры печати (BSA, меченый Су5) были иммобилизованы в виде индивидуальных спотов на поверхности слайдов в подобранных рабочих концентрациях в трех повторах.

Рабочая схемы постановки анализа на иммуночипе предусматривает одновременную инкубацию исследуемого материала на иммуносорбенте и смеси биотинилированных конъюгатов детектирующих антител к возбудителям сибирской язвы (анти-TSA) и чумы (F19) в течение 90 мин при температуре 37°C, дальнейшую промывку слайдов рабочим раствором PBS-T после инкубации и 30-минутную экспозицию с конъюгатом стрептавидина, меченого Су5. Перед сканированием слайды промывают рабочим раствором PBS-T, ополаскивают дистиллированной водой и высушивают.

Титрование гомологичных штаммов возбудителя сибирской язвы *Bacillus*

anthracis и возбудителя чумы *Y.pestis* продемонстрировало высокую чувствительность тест-системы в формате иммуночипа. Так, например, было установлено, что тест-система способна детектировать споровые формы возбудителя сибирской язвы *Bacillus anthracis* вакцинного штамма СТИ-1-СП и СТИ-ПР-СП в конечной концентрации 9×10^3 /мл, а возбудителя в вегетативной форме на примере изучения штамма СТИ-1 (вегетативная форма) - в конечной концентрации 4×10^3 /мл. Титрование клинического материала, содержащего протективный антиген *Y.pestis* V, показало, что иммуночип способен выявлять антигены чумы в конечной концентрации 105 м.к./мл.

При исследовании материала, содержащего споры гетерологичных штаммов *Bacillus* (*Bacillus cereus* 8, *Bacillus cereus* 751, *Bacillus subtilis* 35, *Bacillus subtilis* 56, *Bacillus thuringiensis* КМ 67(1), *Bacillus thuringiensis* 67956, *Bacillus megaterium* 1, *Bacillus globigii*) в концентрациях 1×10^7 - 1×10^8 спор/мл, туляреминого антигена в концентрации 108 м.к./мл, клеток *E. coli* 928, а также при изучении сывороток крови практически здоровых доноров нами не было выявлено перекрестных реакций.

Данные аттестации экспериментальной тест-системы на гомологичных и гетерологичных штаммах продемонстрировали высокие показатели специфичности и чувствительности нового теста в форма-

те иммуночипа в отношении идентификации антигенов возбудителя сибирской язвы и чумы. Работа в рамках программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации» будет продолжена.

1. Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis*. P. S. G. Chain, E. Carniel, F. W. Larimer, et al; PNAS. 2004, September 21, vol. 101 no. 38.; pp. 13826–13831

2. A method for allelic replacement in *Francisella tularensis*. Golovliov I, Sjöstedt A, Mokrievich A, Pavlov V.; FEMS Microbiol Lett. 2003, May 28;222(2); pp. 273-80.

3. Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Francisella tularensis*. Fujita O, Tatsumi M, Tanabayashi K, Yamada A.; Jpn J Infect Dis. 2006 Feb;59(1); pp. 46-51.

4. Genome-wide DNA microarray analysis of *Francisella tularensis* strains demonstrates extensive genetic conservation within the species but identifies regions that are unique to the highly virulent *F. tularensis* subsp. *tularensis*. Martien Broekhuijsen, Pär Larsson, Anders Johansson, et al; Journal of clinical microbiology, July 2003, pp. 2924–2931

Раздел 12.

**ИНФЕКЦИИ В ТРАНСФУЗИОЛОГИИ
И ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ**

ОРГАНИЗАЦИЯ ВХОДНОГО КОНТРОЛЯ НА ВИРУСНУЮ БЕЗОПАСНОСТЬ СЫРЬЯ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ЛЕЧЕБНЫХ ПРЕПАРАТОВ ИЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ ДОНОРОВ

Филатова Е.В.*, **Зубкова Н.В.***, **Горлова И.С.***, **Спиридонова Н.А.***,
Казьянин А.В.**, **Перевозчиков А.Б.****, **Волкова Р.А.*****,
Воробьева М.С.***, **Лаптева Л.К.*****, **Шалунова Н.В.*****

** Филиал ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ «Нижегородское предприятие по производству бактериальных препаратов «ИмБио», г.Нижний Новгород, Россия*

*** филиал ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ Пермское предприятие «Биомед», г.Пермь, Россия*

**** ФГУН НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им.Л.А.Тарасевича, г.Москва, Россия*

Требования отечественных нормативных документов предполагают использование в производстве лечебных препаратов из плазмы крови сырья, свободного от вирусов или с минимальной вирусной нагрузкой. Несмотря на то, что на предприятия фракционирования поступает плазма, прошедшая первичный скрининг, риск получения инфицированных донаций остается достаточно высоким и по данным наших исследований только в отношении вируса гепатита С составляет около 60 случаев на 1 миллион единиц плазмы.

В связи с этим разработка отечественного нормативного документа, регулирующего процедуру входного контроля сырья на предприятиях фракционирования методами иммуноферментного анализа (ИФА) и полимеразной цепной реакции (ПЦР), являлась актуальной задачей.

Проект методических указаний, разработанный совместно с ГИСК им. Л.А.Тарасевича и Пермским филиалом ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ, гармонизирован с требованиями Европейской Фармакопеи, Национального стандарта Российской Федерации ГОСТ Р 52249-2009, Технического регламента о требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии №29 от 26.01.10 года, а также с рекомендациями Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и Комиссии Европейского сообщества (ЕС).

Впервые в России разработан нормативный документ, в котором четко определены обязательные тесты на вирусные маркеры, методы минипулирования, требования к максимальному размеру минипула, критерии к обеспечению качества исследований методами иммуноферментного анализа (ИФА) и полимеразной цепной реакции (ПЦР),

разработаны условия специальной подготовки проб при исследовании фракций плазмы методом ПЦР. Корректность применения метода ПЦР для контроля фракций плазмы подтверждена при параллельном тестировании производственных пулов и соответствующих осадков.

Методические указания апробированы на Нижегородском филиале ФГУП «НПО «Микроген» и активно внедряются на других филиалах НПО «Микроген» МЗ РФ в качестве инструмента для организации входного контроля такого специфического сырья, каким является плазма для фракционирования.

Раздел 13.

МЕДИЦИНСКАЯ ГЕНЕТИКА

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ЛИПОПРОТЕИНАЛИПАЗЫ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ ФОРМОЙ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА

Оседко О.Я., Говорун В.М., Котловский М.Ю., Котловский Ю.В.,
Оседко А.В., Ковалева О.А.

ГОУ ВПО КрасГМУ им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого ЦНИЛ, Красноярск,
Россия

ФГУ «НИИ физико-химической медицины Росздрава», Москва, Россия

С внедрением методов молекулярной генетики в практику медико-биологических исследований стало возможным изучение полиморфизма ДНК генов с помощью генетических маркеров, в том числе обуславливающих возникновение ишемической болезни сердца: генов липидного обмена, т.к. белковые продукты этих генов определяют метаболизм атерогенных фракций липопротеидов. Анализ генетических маркеров ишемической болезни сердца (ИБС) имеет значение не только для определения наследственной предрасположенности к заболеванию и выделения группы риска, но и для определения метода лечения, прогноза развития осложнений. Липопротеиновая липаза – ключевой фермент метаболизма липидов, который является основным компонентом триглицерид-насыщенных хиломикронов и липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП). LPL является многофункциональным белком, участвующем в гидролизе фосфолипидов и триглицеридов. Существует несколько полиморфных маркеров гена LPL, которые ассоциированы с разным уровнем липидов в крови и развитием ИБС: N291S, S447X.

Цель исследования. Определить частоты аллелей гена липопротеинлипазы (LPL) у больных хронической формой ишемической болезни сердца в зависимости от показателей липидного обмена.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили 119 образцов ДНК, которые были получены методом фенольно-хлороформной экстракции из 10 мл цельной венозной крови. В контрольную группу вошли 26 относительно здоровых людей (16 женщин, 10 мужчин), проживающих в городе Красноярске. Средний возраст женщин составлял $51,8 \pm 1,6$, мужчин – $50,2 \pm 2,0$ лет. Критериями исключения являлись: наличие ИБС, острые заболевания, хронические заболевания в стадии обострения, наличие сахарного диабета, выраженные нарушения липидного обмена, тяжелые нарушения функции печени и почек, артериальная гипертония 3-й степени. В качестве больных ИБС было отобрано 93 человека (32 женщины, 61 мужчина). Средний возраст женщин данной группы составлял

56,53±1,1, мужчин – 54,54±0,8 лет. Для данной группы обследованных критериями исключения являлись: инфаркт миокарда, прогрессирующая стенокардия, инсульт, тромбоэмболия легочной артерии менее чем за 6 месяцев до обследования, стенокардия напряжения 3-4 функционального класса, тяжелые нарушения функции печени, почек, острые и хронические заболевания в стадии обострения. Анализ однонуклеотидных полиморфизмов генов липидного обмена проводили методом минисеквенирования с последующим масс-спектрометрическим фракционированием олигонуклеотидных зондов при помощи MALDI-TOF масс-спектрометрии. Статистическая обработка результатов проводилась с помощью пакета статистических программ SPSS 18.0. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты. Достоверное увеличение показателей ЛПНП и холестерина у больных с хронической формой ИБС по сравнению со здоровыми людьми отмечается в гомозиготных и гетерозиготных вариантах аллелей гена LPL (S447X, N291S). В то же время анализ распределения частот аллелей гена N291S в исследованных группах показал, что в группе здоровых людей не встречались носители генотипов AG и GG, а в группе больных ИБС выявлены носители генотипов AG. Сравнительный анализ распределения генотипов гена S447X показал, что в исследованных группах больных ИБС и здоровых людей не встречались носители генотипа GG. Анализ распределения генотипов CC и CG в исследованных группах не выявил достоверных различий.

Заключение. Показано распределение частоты аллельных вариантов генов липидного обмена среди пациентов, страдающих ИБС и людей без сердечно-сосудистых заболеваний в зависимости от показателей липидного обмена. Необходимо продолжить исследования в большой популяции пациентов с этим заболеванием.

ДЕТЕКЦИЯ МУТАЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА ЧЕЛОВЕКА 652INSG ПРИ АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ ПОРАЖЕНИЯХ СОСУДОВ ЧЕЛОВЕКА

Сазонова М.А.⁽¹⁾, Иванова М.М.^(1,2), Желанкин А.В.⁽²⁾, Митрофанов К.Ю.⁽²⁾, Хасанова З.Б.⁽³⁾, Собенин И.А.^(1,2), Мясоедова В.А.^(1,2), Постнов А.Ю.⁽³⁾, Орехов А.Н.^(1,2)

¹Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии Российской академии медицинских наук; ²Научно-исследовательский институт атеросклероза Российской академии естественных наук;

³ ФГУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России, г. Москва.

Введение.

В России, как и в большинстве индустриальных стран, сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) занимают первое место в структуре инвалидизации и смертности, в том числе, преждевременной, а также ведут к эскалации расходов на здравоохранение. Поскольку морфологической основой смертности от сердечно-сосудистых заболеваний в 90% случаев является атеросклероз, то вклад заболеваний атеросклеротического генеза и их последствий в России в общую смертность является наиболее весомым. Одной из причин этого неблагоприятного дисбаланса является недостаточное количество верифицированных биомаркеров ССЗ, и, в частности, атеросклероза.

По литературным данным, в патологии человека показана ассоциация различных заболеваний с некоторыми мутациями митохондриального генома [1-3]. Согласно одной из гипотез, мутации митохондриального генома вызывают окислительный, который и является причиной широкого круга патологических процессов.

Следует отметить, что в каждой митохондрии содержится несколько копий ее генома. Митохондриальный геном наследуется по материнскому типу и отличается выраженной нестабильностью, в нем часто возникают мутации. Пенетрантность и экспрессивность таких мутаций варьируют в широких пределах от семьи к семье и между родственниками (по материнской линии) одной семьи и зависят от многих факторов, но главным образом, от генотипа и уровня гетероплазмии (смесь мутантных и нормальных молекул ДНК). Поэтому при изучении ассоциации митохондриальных мутаций с заболеваниями людей необходима не только качественная (наличие/отсутствие мутации), но и количественная оценка мутантного аллеля митохондриального генома (процент гетероплазмии).

В настоящей работе проведен молекулярный анализ мутации 652insG митохондриального генома человека в образцах ДНК из лейкоцитов крови пациентов, больных атеросклерозом и здоровых доноров. Мутация локализована в кодирующей области митохондриального генома, в частности, в гене рРНК 12S. Данная мутация вызывает дефект малой субъединицы рибосомальной РНК, вследствие чего нарушается синтез митохондриальных белков. По литературным данным, мутация 652insG ассоциирована с митохондриальными миопатиями [4].

Цель и задачи.

Целью данного исследования является нахождение ассоциации мутации митохондриального генома человека 652insG с атероскле-

ротической патологией интимы сонных артерий различной степени тяжести.

Для достижения цели работы были поставлены следующие задачи:

- 1) Тестировать образцы ДНК, выделенные из лейкоцитов крови индивидов на наличие мутации 652insG;
- 2) Расчитать процент гетероплазии мутации 652insG в данных образцах;
- 3) На основании полученных данных определить, имеется ли у индивида предрасположенность к возникновению и развитию атеросклероза.

Материалы и методы.

Материалом для данного исследования служили образцы лейкоцитов крови пациентов, прошедших ультразвукографическое исследование.

Общая выборка проб крови из 190 образцов была разделена на 3 приблизительно равные группы: 1) образцы крови пациентов, у которых отсутствовали поражения атеросклеротического характера - «норма», 2) образцы крови пациентов, у которых было выявлено диффузное утолщение интимы аорты, которое является одной из ранних стадий формирования атеросклеротической бляшки - «диу» и 3) образцы крови пациентов, у которых наблюдались атеросклеротические бляшки - «асб».

Выделение тотальной ДНК из образцов крови проводилось с помощью метода фенол-хлороформной экстракции. После проведения ПЦР амплификаты были пиросеквенированы для выявления инсерции G в гене субъединицы 12S в позиции 652 митохондриального генома человека. Исследования проводили на автоматическом пиросеквенаторе PSQTMHS96MA.

Статистическую обработку данных проводили при помощи статистического пакета SPSS 14.0 (SPSS Inc., США).

Основные результаты

Для количественной оценки мутантного аллеля, содержащего инсерцию G в позиции 652 митохондриального генома человека, мы использовали метод пиросеквенирования в нашей модификации. Благодаря разработанному авторами статьи методу возможна не только качественная (есть мутация или ее нет), но и количественная оценка мутантного аллеля митохондриального генома (процент гетероплазии) в биологических образцах.

В нашей выборке выявлены значительные отличия в проценте гетероплазии мутантного аллеля митохондриального генома 652insG между образцами ДНК пациентов, имеющими атеросклеротические

поражения в сонных артериях и здоровыми донорами. С помощью двух независимых статистических методов программы SPSS 14.0 был определен средний пороговый уровень для гетероплазии по мутации 652insG в митохондриальной ДНК лейкоцитов крови человека, равный 20%. Значение, превышающее данный пороговый уровень, соответствует низкой предрасположенности к атеросклерозу и формированию атеросклеротических бляшек. Значение, не достигающее данного порогового уровня, соответствует высокой предрасположенности к атеросклерозу и формированию стенозирующих атеросклеротических бляшек.

Заключение.

Определенный процент гетероплазии мутации митохондриального генома 652insG может служить прогностическим признаком атеросклероза сонных артерий у человека. Разработанный авторами метод определения процента гетероплазии данной мутации позволяет повысить точность диагностики риска развития сосудистых осложнений.

Список литературы.

1. Andreassi M.G. Coronary atherosclerosis and somatic mutations: an overview of the contributive factors for oxidative DNA damage. // *Mutat. Res.*, 2003, Jan., V. 543(1), P. 67-86. Review.
2. Andreassi M.G., Botto N. DNA damage as a new emerging risk factor in atherosclerosis.// *Trends. Cardiovasc. Med.* , 2003, Oct;13(7), P.270-275. Review.
3. Andreassi M.G., Botto N., Colombo M.G et al. Genetic instability and atherosclerosis: can somatic mutations account for the development of cardiovascular diseases?// *Environ. Mol. Mutagen*, 2000,35(4), P.265-269. Review.
4. Han CB, Ma JM, Xin Y, Mao XY, Zhao YJ, Wu DY, Zhang SM, Zhang YK.. Mutations of mitochondrial 12S rRNA in gastric carcinoma and their significance.// *World J Gastroenterol.* 2005 Jan 7;11(1):31-5.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МИНИСАТЕЛЛИТНЫХ ПОВТОРОВ ДНК В2-VNTR И 5-HTTLPR ПРИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Сучкова И.О.¹, Ямалтдинова Т.А.¹, Гриневич Е.Е.¹, Пицик Е.В.¹,
Соловьев К.В.¹, Аленина Н.В.², Глотов А.С.³, Бадер М.², Баранов В.С.³,
Денисенко А.Д.¹, Паткин Е.Л.¹

¹НИИ Экспериментальной Медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург,
Россия.;

²Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine, Berlin-Buch, Germany;

³НИИ Акушерства и Гинекологии им. Д.О.Отта РАМН, Санкт-Петербург,
Россия.

Введение. На современном этапе в клинической медицине становится важным не только своевременная диагностика заболевания, но и идентификация генетических маркеров предрасположенности к заболеванию. Владение такой информацией может помочь не только в постановке диагноза, но позволяет предсказать возможный характер течения заболевания и дает возможность выбора более эффективного индивидуализированного терапевтического лечения. В настоящее время накоплено много данных, указывающих на существенный вклад генетических факторов в патогенезе болезней сердца и сосудов. Так, например, установлена существенная роль генов BDKRB2 (ген рецептора В2 брадикинина) и 5HTT (ген транспортера серотонина) в функционировании сердечно-сосудистой системы и сейчас активно исследуется их вклад в патогенезе артериальной гипертензии, ишемической болезни сердца (ИБС) и инфаркта миокарда.

Следует отметить, что исследования генетической составляющей некоторых распространенных мультифакториальных полигенных заболеваний человека часто обнаруживают их ассоциацию с некодирующими белки тандемными повторами ДНК, которые в свою очередь могут выступать как цис- или транс-факторы регуляции экспрессии генов. В связи с этим является актуальными исследования генов 5HTT и BDKRB2, т.к. в промоторе и 3'-нетранслируемом районе этих генов локализованы минисателлитные тандемные повторы 5-HTTLPR и В2-VNTR, соответственно. Уже установлено, что оба минисателлита могут принимать участие в модуляции активности генов, в которых они находятся. Так, наличие аллеля «L» (из 16 повторов) 5-HTTLPR повышает уровень транскрипции гена 5-HTT, а аллель «43» (из 43 повторов) В2-VNTR действует как потенциальный негативный регулятор экспрессии на пре-трансляционном уровне. Поэтому можно ожидать, что генетические изменения и/или эпигенетические модификации в минисателлитах 5-HTTLPR и В2-VNTR могут быть связаны с заболеваниями сердечно-сосудистой системы.

Цель и задачи. Цель данной работы заключалась в проверке предположения о связи минисателлитов B2-VNTR и 5-HTTLPR генов BDKRB2 и 5HTT с такими сердечно-сосудистыми заболеваниями как артериальная гипертензия, ИБС и инфаркт миокарда. В задачи исследования входили: анализ ассоциаций полиморфизмов по длине аллелей B2-VNTR и 5-HTTLPR с этими патологиями; анализ метилирование ДНК минисателлитов B2-VNTR и 5-HTTLPR у пациентов с этими заболеваниями в связи с тем, что метилирование ДНК является одним из основных эпигенетических механизмов регуляции активности генов, а tandemные повторы ДНК часто являются потенциальными мишенями для такого рода модификации.

Материал и методы. Минисателлиты B2-VNTR и 5-HTTLPR были исследованы с помощью ПЦР и метил-чувствительной ПЦР на образцах ДНК из лейкоцитов периферической крови пациентов с артериальной гипертензией (N=86), ИБС (N=145), инфаркт миокарда (N=49) и контроля (N=137).

Результаты. В исследованных выборках пациентов с вышеупомянутыми заболеваниями не было выявлено статистически значимых различий с контролем по частоте встречаемости различных аллелей как для минисателлита B2-VNTR, так и 5-HTTLPR. Анализ метилирования показал, что 5-HTTLPR во всех проверенных выборках находится в неметилированном состоянии, независимо от длины аллеля минисателлита. В то же время для B2-VNTR были выявлены разные варианты эпигенотипов: гомозиготы по аллелям «43» и «33», где оба аллеля неметилированы; гетерозиготы «43/33», где оба аллеля метилированы либо метилирован только короткий аллель «33» (из 33 повторяющихся единиц); и гомозиготы «43/43» с метилированным длинным аллелем «43» (из 43 повторяющихся единиц). Следует отметить, что метилированные формы длинного аллеля B2-VNTR были обнаружены как у гетерозигот «43/33», так и гомозигот «43/43» только у пациентов с ИБС, причем доля таких людей была намного выше среди тех, кто уже перенес инфаркт миокарда (24,5% и 73,9% , соответственно).

Заключение. Таким образом, нами не было выявлено ассоциации полиморфизмов по длине минисателлитов B2-VNTR и 5-HTTLPR генов BDKRB2 и 5HTT с артериальной гипертензией, ИБС и инфарктом миокарда, но была обнаружена связь между метилированием длинного аллеля «43» B2-VNTR с ИБС и инфарктом миокарда. Поэтому можно предположить, что наличие метилированной формы длинного аллеля B2-VNTR может служить в качестве прогностического эпигенетического маркера предынфарктного состояния.

Работа поддержана грантом РФФИ № 10-04-00676-а.

Раздел 14.

**КРИМИНАЛИСТИКА
И СУДЕБНАЯ МЕДИЦИНА**

МАССОВЫЕ ДНК-СКРИНИНГИ НАСЕЛЕНИЯ: ЗА И ПРОТИВ

Перепечина И.О.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Идентификация лица, оставившего следы на месте происшествия, может осуществляться разными способами, в зависимости от следственной ситуации. При наличии подозреваемого идентификационное исследование выполняется традиционно для судебной экспертизы, путем сравнительного исследования объекта с места происшествия с образцом этого лица. В отсутствие подозреваемого идентификация может быть проведена с помощью автоматизированной регистрационной системы (если таковая создана); для этого необходимо, чтобы лицо, оставившее следы на месте происшествия, ранее уже подверглось ДНК-типированию, и его генотип был внесен в базу данных. Когда и это не осуществимо, остается еще один способ выявления лица, оставившего следы, - добровольные массовые ДНК-скрининги населения. Высокая затратность скринингов сдерживает пока их использование в отечественной практике. Тем не менее, необходимо иметь сформированную позицию в отношении данного способа применения ДНК-анализа при расследовании преступлений.

Цель и задачи работы. Дать криминалистическую и правовую оценку ДНК-скринингов; охарактеризовать их положительные и отрицательные стороны.

Криминалистические аспекты. Анализ зарубежных данных свидетельствует о высокой эффективности ДНК-скринингов для раскрытия преступлений. По сообщениям Европейской сети научных криминалистических учреждений (European Network of the Forensic Science Institutions - ENFSI) [1], из 439 ДНК-скринингов, выполненных в странах Европы, 315 (т.е. 72%) оказались успешными, позволив идентифицировать преступника. Это побуждает правоохранительные органы все чаще обращаться к ДНК-скринингам, в особенности, в случаях, когда другие средства оказались исчерпаны, и расследование зашло в тупик. Только в Англии и Уэльсе проведено уже 282 ДНК-скрининга, в ходе которых протестировано более 80 тыс. образцов.

Содержание мероприятий при добровольных массовых ДНК-скринингах населения позволяет отнести их к тактическим операциям. Результативность ДНК-скрининга определяется, прежде всего, двумя факторами: а) правильным определением круга потенциальных подозреваемых, что зависит от качества оперативно-

розыскной информации, и б) возможностью охватить тестированием как можно большее число лиц из этого круга.

Хотя анализ ДНК проводится на добровольной основе, преступникам не так легко его избежать, поэтому задача выявления лица, оставившего следы на месте происшествия, принципиально осуществима. Понимая, что отказ от участия в скрининге вызовет подозрения у правоохранительных органов, часть из них на свой страх и риск все же сдает образцы, в надежде, что как-нибудь «обойдется». Те же, которые отказываются это сделать, действительно, попадают под подозрение и дают полиции повод провести в отношении их тщательную проверку. Нередко эта проверка заканчивается тем же анализом ДНК. Еще один сценарий – когда преступник избежал тестирования, однако его прошел его близкий родственник. Полученные в этом случае генетические данные также будут информативны, давая основания для привлечения к ДНК-типированию родственников лица, прошедшего скрининг. Все это делает ДНК-скрининги криминалистически целесообразными мероприятиями.

Следует, однако, иметь в виду, что ДНК-скрининги, потенциально, таят для расследования опасность – искушая правоохранительные органы дожидаться от экспертов подозреваемых, вместо того чтобы форсированно вести расследование в обычном порядке.

Финансовые и организационные аспекты. ДНК-скрининги характеризуются высокой стоимостью и трудоемкостью; осуществимы лишь при условии мощной организационно и методически сформированной системы, позволяющей в короткие сроки проводить взятие и исследование большого количества образцов.

Правовые аспекты. Массовые ДНК-скрининги населения затрагивают гражданские права и свободы: добровольность их весьма условна, по сути, они являются закамуфлированным принудительным актом. Последствия непредоставления образца для тестирования далеко не безобидны, поскольку данное лицо попадает в орбиту прицельной оперативной разработки, что, так или иначе, означает вторжение в сферу его частной жизни. Отказ от участия в скрининге может иметь негативные социальные последствия, отражаясь на репутации, сказываясь на бизнесе и т.д. Отдельная тема – риски, связанные с экспертными ошибками, от которых, увы, не застрахована экспертная практика. Опасения вызывает также то, что массовые ДНК-скрининги могут негласно стать поставщиками генетической информации для государственных систем ДНК-регистрации, используемых при расследовании преступлений.

Поскольку круг потенциальных подозреваемых часто весьма неопределенный, тестированию в связи с одним случаем подвергаются

сотни, а иногда и тысячи людей. Это означает существенное вторжение органов правопорядка в жизнь общества, вызывая в некоторых странах протест со стороны населения. Апеллируя к конституционным ценностям, оппоненты ДНК-скринингов предостерегают о подмене принципа презумпции невиновности, исповедуемого правосудием всех цивилизованных стран, по сути, противоположным принципом – презумпции виновности. В отсутствие каких-либо данных о причастности к преступлению, «провинившись» перед законом чаще всего лишь проживанием в районе, в котором, предположительно, проживает преступник, лицо, фактически, становится подозреваемым и вынуждено доказывать свою невиновность. Это становится новым порядком в обществе, поскольку доказывать свою добропорядочность должна будет не отдельная личность, а большие, исчисляемые сотнями и тысячами, группы граждан.

Заключение/выводы. Добровольные массовые ДНК-скрининги населения криминалистически целесообразны и, согласно зарубежной статистике, имеют высокую эффективность. В то же время, они существенно затрагивают гражданские права и свободы. Это создает коллизию между интересами уголовного правосудия и правами личности. Таким образом, внедрению ДНК-скринингов в жизнь нашего общества должно предшествовать обязательное решение вопроса о допустимости их использования правоохранительными органами. В случае принятия решения о введении ДНК-скринингов - необходима строгая правовая регламентация ДНК-скринингов, минимизирующая отрицательные последствия их использования.

Литература.

1. Wenzel R. ENFSI report on criminal cases in Europe solved by ILS (DNA mass testing): http://www.enfsi.eu/get_doc.php?uid=228.

Раздел 15.

**ГЕОГЕЛЬМИНТОЗЫ,
ПАРАЗИТАРНЫЕ И ТРОПИЧЕСКИЕ
ЗАБОЛЕВАНИЯ**

ПОИСК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ МИШЕНЕЙ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ПАРАЗИТА *OPISTHORCHIS FELINEUS*

Помазной М. Ю.¹, Татьков С. И.¹, Брусенцов И. И.¹, Сивков А.Ю.¹,
Наякшин А.М.², Гусельников С.В.², Бреннер Е.В.², Васильев Г.В.²,
Катохин А.В.¹, Мордвинов В.А.¹.

¹ – Институт Цитологии и Генетики Сибирского Отделения РАН (ИЦИГ СО РАН), Новосибирск, Россия

² – Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН (ИХБФМ СО РАН), Новосибирск, Россия

Описторхоз на сегодняшний день по-прежнему остается серьезной проблемой в области здравоохранения. Возбудителями этого заболевания являются паразиты из семейства описторхид, одним из представителей которого является объект настоящего исследования *O. felineus*, распространенный на территории некоторых стран восточной Европы и, в особенности, на территории бассейна реки Обь.

Несмотря на большую практическую важность видов данного семейства, на настоящий момент отсутствуют высоко чувствительные и в то же время высоко специфичные методы диагностики этого заболевания. Представляется перспективным привлечение иммунологических методов (наработка антител к рекомбинантным белкам паразита), а также методов, связанных с полимеразной цепной реакцией. Однако последнее невозможно без подробного изучения транскриптома. Одним из наиболее надежных и информативных методов в этой области является создание кДНК библиотеки с ее последующим масштабным секвенированием. Он позволяет достаточно быстро и точно определить наиболее транскрипционно активные гены, которые являются наиболее перспективными мишенями для диагностики.

В ходе проведенной работы была создана невыровненная кДНК библиотека взрослой стадии (мариты) паразита *O. felineus* объемом 10 тыс. клонов, и к настоящему моменту для 1 тыс. из них получены EST (короткие последовательности, соответствующие экспрессируемой РНК). После подготовки EST для анализа и сборки в контиги для них был проведен поиск гомологий с помощью программы BlastX в общественных белковых базах, таких как Non-redundant и Swissprot. В общей сложности установлено более 200 белков с различными функциями. Организмами, чьи белки дают наиболее статистически значимые выравнивания, оказались родственные трематоды, такие как *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*, *Clonorchis sinensis*.

А наиболее транскрипционно активными генами являются миоглобин, яичный белок вителлин, разновидность глутатион трансфераз, NADH дегидрогеназа, катепсин F и сапозино-подобные белки.

Таким образом, получена информация о транскрипционно активных генах *O. felineus*, что в дальнейшем поможет в создании системы диагностики на основе иммунологических и ПЦР-методов.

Раздел 16.
ВЕТЕРИНАРИЯ

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ МЕТОДОМ ПЦР С ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Астахова Т.С., Козлова А.Д.

ФГУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Африканская чума свиней (АЧС) была занесена на территорию Российской Федерации дикими кабанями, мигрировавшими из Грузии в 2007г. В период с 2008г. по настоящее время АЧС выявлена на территории 13 субъектов Российской Федерации и постоянно продолжают регистрироваться новые неблагополучные пункты.

Вирус АЧС устойчив в окружающей среде и легко распространяется среди восприимчивого поголовья. Поэтому при обнаружении вируса в хозяйстве все поголовье уничтожается бескровным методом, вводится карантин и запрет на импорт свиноводческой продукции. Все это приводит к значительным экономическим потерям.

Эффективных средств иммунопрофилактики и лечения африканской чумы свиней до настоящего времени не разработано, поэтому единственным методом борьбы строгое соблюдение мер по недопущению распространения заболевания.

Один из рисков распространения АЧС связан с запоздалой постановкой диагноза. Поэтому актуальной задачей является разработка и внедрение в практику высокочувствительного метода обнаружения вируса в биологическом материале, который позволит оперативно обнаруживать возбудителя на ранних стадиях и выявлять животных-вирусоносителей.

Целью нашей работы была разработка тест-системы для обнаружения вируса АЧС методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» в различных видах биологического материала.

Материалы и методы.

Выделение ДНК из материала проводили набором «ДНК-сорб-В» (Amplisens, ФГУН «ЦНИИЭ»), согласно инструкции. Амплификацию выделенной ДНК проводили на приборах RotorGene 6000 (Corbett, Австралия) и iQCyler (BioRad, США).

Результаты.

На основе анализа литературных данных и данных банков нуклеотидных последовательностей для детекции вируса АЧС были выбраны праймеры и зонд на VP72 ген.

Специфичность праймеров проверялась на штаммах гетерологичных вирусов, вызывающих болезни свиней – цирковирус свиней 2-го типа, парвовирус свиней (шт. ВЛ-94), вирус репродуктивного и респираторного синдрома свиней (шт. БД (американской генотип), Amervac (европейский генотип)), вируса болезни Ауески (шт. ГНКИ, Арский, МБА, из вакцины Аускипра), классической чумы свиней (шт. Синлак, ГМ-94), трансмиссивного гастроэнтерита и эпидемической диареи свиней. В результате проведенных экспериментов было показано отсутствие амплификации геномов гетерологичных штаммов. Диагностическая специфичность тест-системы оценивали при тестировании проб цельной крови и суспензий внутренних органов от здоровых животных. Специфичность тест-системы составила 100%, все пробы от здоровых животных не давали положительного сигнала в ПЦР.

Для определения аналитической чувствительности тест-системы был получен рекомбинантный положительный контроль (ПКО ASFV) путем клонирования участка гена-мишени в фаг λ . Для проведения экспериментов была приготовлена панель образцов цельной крови, сыворотки крови, 10%-й суспензии внутренних органов, содержащих ПКО ASFV в концентрациях $5 \cdot 10^4$, $5 \cdot 10^3$, 10^3 и $5 \cdot 10^2$ коп/мл. Чувствительность тест-системы при тестировании сыворотки крови свиньи составила 103 коп/мл, а при тестировании цельной крови и суспензии патматериала – $5 \cdot 10^2$ коп/мл. Данная чувствительность является достаточной для обнаружения вируса АЧС в биологическом материале.

Тест-система прошла межлабораторные испытания в ФГУ ВГНКИ, получено регистрационное свидетельство.

Заключение

Разработана тест-система для выявления возбудителя африканской чумы свиней методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Данный метод позволяет использовать для исследования различные виды биологического материала, проводить диагностику на ранних стадиях, а также может использоваться как подтверждающий результаты серологических исследований.

ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ ПАРВОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ СВИНЕЙ

Козлова А.Д., Астахова Т.С.

ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Парвовирусная инфекция свиней (ПВИС) – контагиозное вирусное заболевание, проявляющееся клинически только у супоросных свиноматок и характеризующееся малочисленными пометами, гибелью эмбрионов, рассасыванием плодов или их мумифицированием, рождением мертвых или слабых поросят, бесплодием, повторным приходом в охоту и (реже) абортами.

Возбудителем заболевания является ДНК-содержащий вирус рода *Parvovirus*, семейства *Parvoviridae*.

В нашей стране ПВИС впервые была выявлена в 1982г. В настоящее время, несмотря на проводимые меры специфической профилактики, циркуляция вируса на территории России сохраняется. Данное заболевание наносит значительный экономический ущерб.

Диагноз на ПВИС ставят комплексно, с учетом эпизоотологических, клинических и патологоанатомических данных с обязательным проведением лабораторных исследований. Классическими методами определения парвовирусного антигена и антител к нему являются РГА и РТГА с эритроцитами морской свинки. Однако данные методы не всегда выявляют ПВИС. Так, мертворожденные поросята и инфицированные плоды после 70 дня супоросности содержат антитела, которые агрегируют с вирусным антигеном и мешают его выявлению в РГА (1). Для наработки достаточного для детекции титра антител требуется время, что делает невозможным раннюю диагностику заболевания в РТГА.

Часто ПВИС развивается как следствие иммуносупрессии в результате инфицирования цирковирусом 2 типа. При коинфицировании данными вирусами заболевание протекает тяжелее и хуже поддается лечению.

Наиболее точным и удобным в использовании методом представляется ПЦР, так как данный метод обладает большей чувствительностью и позволяет выявлять вирусный геном даже в тех случаях, когда использование классических методов диагностики невозможно по тем или иным причинам.

В связи с этим целью нашей работы была разработка и апробация ПЦР-тест-системы с гибридационно-флуоресцентной детекцией результатов в режиме «реального времени» для выявления парвовирусов свиней.

Материалы и методы.

В работе использовали штамм парвовируса свиней «ВЛ-94» и гетерологичные штаммы.

Выделение суммарной ДНК из материала проводили набором «Рибо-преп» (Amplisens, ФГУН «ЦНИИЭ»), согласно инструкции. Амплификацию проводили на приборах с флуоресцентным методом детекции в режиме «реального времени» RotorGene 6000 (Corbett, Австралия) и iQCyler (BioRad, США) с использованием реактивов Amplisens (ФГУН «ЦНИИЭ»).

Результаты.

На основе анализа литературных данных и банков нуклеотидных последовательностей для инициации амплификации ДНК парвовируса были выбраны праймеры и зонд на наиболее консервативный участок генома – NS1 ген.

Специфичность праймеров проверялась на штаммах ПВС (шт. ВЛ-94), ЦВС, РРСС (шт. БД (американской генотип), шт. VP046 (европейский генотип)), вируса болезни Ауески (шт. ГНКИ, Арский, МБА, из вакцины Аускипра), классической чумы свиней (шт. Синлак, ГМ-94), трансмиссивного гастроэнтерита и эпидемической диареи свиней. В результате экспериментов была подтверждена специфичность работы праймеров и зондов, а также доказано отсутствие неспецифической амплификации гетерологичных штаммов.

Для определения аналитической чувствительности тест-системы был получен рекомбинантный положительный контроль (ПКО) путем клонирования участка гена-мишени в фаг λ . Затем измерялась концентрация полученного ПКО и готовились разведения $5 \cdot 10^4$, $5 \cdot 10^3$, 10^3 и $5 \cdot 10^2$ коп/мл на суспензиях фекалий и патматериала от свиней. Чувствительность тест-системы при выделении через суспензии фекалий и патматериала составила $5 \cdot 10^2$ коп/мл.

У хряков ПВИС протекает бессимптомно, но вирус выделяется со спермой, при этом, не снижая ее качества. ПВС заносится в ранее благополучное хозяйство во время искусственного оплодотворения инфицированной спермой. В связи с этим актуальной задачей является определение вируса в сперме. Чувствительность тест-системы при выделении из спермы определялась так же, как из суспензии фекалий и патматериала и составила $5 \cdot 10^3$ коп/мл.

Важным фактором в работе тест-системы является контроль качества экстракции нуклеиновых кислот из материала и возникновения

ложноотрицательных результатов. Поэтому в тест-систему были введены праймеры и зонд для внутреннего неконкурентного экзогенного контрольного образца, который вносится в каждую пробу на этапе выделения ДНК.

Следующим этапом работы была апробация тест-системы на клиническом материале. Из нескольких хозяйств Белгородской области был получен биологический материал: фекалии, сыворотка крови, патматериал – селезенка, лимфатические узлы, легкие, печень, сердце, кишечник; абортплоды, плацента и сперма от свиней. Всего было исследовано 286 образцов.

В 24 пробах, что составляет 8,4% исследованных образцов, обнаруживалась ДНК ПВС. Весь полученный материал также был исследован на циркулирующую инфекцию 2 типа. В 22 из 24 (91,6%) положительных на ПВС образцов содержали ЦВС-2.

В хозяйствах, из которых был получен данный клинический материал, проводят вакцинацию против ПВС (инактивированная вакцина ИНТЕРВЕТ) и проверяют напряженность иммунитета методом РТГА, но не исследуют на наличие вирусной ДНК. Полученные нами данные показывают, что, несмотря на проводимые меры профилактики, циркуляция вируса в хозяйствах сохраняется.

Заключение.

Разработана и апробирована на клиническом материале тест-система для выявления парвовируса свиней для амплификаторов с двумя и более каналами детекции. Показано, что, несмотря на проводимые меры профилактики, циркуляция вируса на свинокомплексах сохраняется. Возможно, это связано с тем, что данная инфекция часто осложняется циркулирующим парвовирусом свиней, который снижает эффективность вакцинации.

Литература.

1. Елисеева О.В. Выявление парвовируса свиней и вирусспецифических антител методами полимеразной цепной реакции и иммуноферментного анализа. *Вопр. Вир.* 2008 нояб–дек;53(6):46-8.

РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЦИРКОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ СВИНЕЙ 2 ТИПА МЕТОДОМ ПЦР С ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ

Козлова А.Д., Астахова Т.С.

ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Развитие свиноводства в России привело к широкому распространению заболеваний, ранее не встречавшихся в нашей стране. Наиболее значимой проблемой в промышленных свинокомплексах стала цирковиральная инфекция свиней.

Свиные цирковирусы представляют собой вирусы небольших размеров (17 нм) без оболочки, содержащие геном в виде одноцепочечной ДНК кольцевой формы. Эти вирусы относят к семейству *Circoviridae*. Существует два типа цирковирусов. Цирковир свиней 1-го типа (ЦВС-1), обнаруженный впервые в 1974г., охарактеризован как нецитопатогенный контаминант перевиваемой культуры клеток почек поросят РК-15 и заболевания свиней не вызывает. Цирковир свиней 2-го типа (ЦВС-2) выделенный впервые в 1991 году, является основной причиной синдрома мультисистемного истощения поросят-отъемышей. Среди других синдромов, с которыми связан ЦВС-2, можно отметить синдром дерматита и нефропатии поросят, врожденный тремор новорожденных поросят, синдром репродуктивной недостаточности, иммунодефицитные состояния, подострая/хроническая пролиферативно-некротическая пневмония. Возникновению данного комплекса заболеваний способствует развитие смешанных инфекций ЦВС-2 с другими патогенами вирусной и бактериальной природы, такими, как, например, вирус РРСС, парвовирус свиней, *H. parasuis* и др. Циркуляция в хозяйстве ЦВС снижает эффективность вакцинации против других патогенов.

Цирковиральную инфекцию трудно диагностировать на основании только клинических симптомов из-за частого осложнения другими патогенами и развития смешанных инфекций. Широко применяемый в настоящее время метод ИФА является малоинформативным, так как почти 100% стад РФ серопозитивны на ЦВС-2 с первых дней жизни.

В связи с этим целью нашей работы была разработка и апробация ПЦР-тест-системы с гибридационно-флуоресцентной детекцией результатов амплификации в режиме «реального времени» для выявления цирковирусов свиней 2 типа.

Материалы и методы.

В работе использовали штаммы цирковируса свиней и гетерологичные штаммы.

Выделение тотальной ДНК из материала проводили набором «Рибо-преп» (Amplisens, ФГУН «ЦНИИЭ»), согласно инструкции. Амплификацию проводили на приборах RotorGene 6000 (Corbett, Австралия) и iQCyler (BioRad, США) с использованием реактивов Amplisens (ФГУН «ЦНИИЭ»).

Результаты.

На первом этапе работы нами была проанализирована научная литература, характеризующая структуру геномов цирковирусов 1 и 2 типов.

На втором этапе работы был проведен анализ геномов цирковирусов представленных в базе данных GenBank. Сравнение нуклеотидных последовательностей ЦВС-1 и ЦВС-2 выявило их существенное различие. При этом геномы различных штаммов ЦВС-2 довольно консервативны. В качестве мишени для подбора праймеров и зондов выбран ген ORF1. Были выбраны праймеры, которые иницируют амплификацию участка генома цирковирусов только второго типа.

Специфичность проверялась на штаммах ЦВС, ПВС (шт. ВЛ-94), РРСС (шт. БД (американский генотип), шт. VP046 (европейский генотип)), вируса болезни Ауески (шт. ГНКИ, Арский, МБА, из вакцины Аускипра), классической чумы свиней (шт. Синлак, ГМ-94), трансмиссивного гастроэнтерита и эпидемической диареи свиней. Праймеры работают специфично и не иницируют амплификацию геномов гетерологичных штаммов.

Для определения чувствительности тест-системы был получен рекомбинантный положительный контроль (ПКО) путем клонирования участка гена-мишени в фаг λ . На следующем этапе измерялась концентрация полученного ПКО и готовились разведения $5 \cdot 10^4$, $5 \cdot 10^3$, 10^3 и $5 \cdot 10^2$ коп/мл на сперме, суспензиях фекалий и патматериала от свиней. Чувствительность тест-системы при выделении через суспензии фекалий и патматериала составила $5 \cdot 10^2$ коп/мл, а при выделении из спермы – $5 \cdot 10^3$ коп/мл.

Одним из важных моментов работы тест-системы является контроль качества выделения ДНК и возникновения ложноотрицательных результатов. Поэтому в тест-систему были введены праймеры и зонд для внутреннего экзогенного контрольного образца, который вносится в каждую пробу на этапе выделения нуклеиновых кислот.

На следующем этапе работы проводилась апробация тест-системы на клиническом материале (фекалии, сыворотка крови, патматериал – селезенка, лимфатические узлы, легкие, печень, сердце, кишечник;

абортплоды, плацента и сперма) от свиней из нескольких хозяйств Белгородской области.

Результаты, полученные при тестировании клинического материала, показали, что ЦВС циркулирует во всех исследованных хозяйствах, что согласуется с данными полученными методом ИФА. Возможно, это объясняется тем, что вакцинация против ЦВС на данных свинокомплексах не проводится.

При анализе распространенности ЦВС в разных возрастных группах были получены результаты, представленные в табл. 1.

	всего	ЦВС +	% ЦВС+
сосуны	74	8	10.8
дорашивание	62	23	37.1
откорм	67	59	88.1
отъем	2	0	0
ремонтные свинки	3	3	100
свиноматка	2	2	100
Всего	210	95	45.2

Закключение.

Разработана и апробирована на клиническом материале тест-система для выявления цирковируса свиней 2 типа для амплификаторов с двумя и более каналами детекции. Метод позволяет обнаруживать ЦВС-2 в различном биологическом материале и на разных стадиях заболевания.

Раздел 17.

**КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА
И БЕЗОПАСНОСТИ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ**

ЭКСПРЕСС-МЕТОД АНАЛИЗА СТАФИЛОКОККОВОГО ЭНТЕРОТОКСИНА В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ

Любавина И.А.¹, Шепеляковская А.О.², Бровко Ф.А.², Зинченко А.А.¹, Сидина Е.И.^{2,3}, Бозиев Х.М.², Ламан А.Г.², Вертиев Ю.В.⁴, Гришин Е.В.¹

¹ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

² Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Московская обл. г. Пущино, Россия

³ Пущинский Государственный университет, Московская обл., г. Пущино, Россия

⁴ Государственное учреждение научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Москва, Россия

Стафилококковые энтеротоксины, продуцируемые грамположительными бактериями *Staphylococcus aureus*, являются наиболее частой причиной пищевых отравлений. Известно несколько серологических типов энтеротоксинов (SE), обозначаемых А, В, С1, С2, С3, D и Е. Механизм действия энтеротоксинов состоит в стимулировании массового высвобождения цитокинов, вызывающих различные токсические поражения центральной нервной системы и ее симпатических отделов, а также нарушение проницаемости стенок кишечника. Все стафилококковые энтеротоксины очень устойчивы к воздействию окружающей среды, включая экстремальные значения pH. Хотя сами клетки стафилококков разрушаются при нагревании, SE термостабильны и выдерживают высокотемпературные обработки с сохранением функциональной активности. При благоприятных условиях возможно интенсивное развитие стафилококков и секреция токсинов в самых различных пищевых продуктах (молочные, мясные, рыбные, овощные), наиболее благоприятной средой для развития стафилококков является молоко и молочные продукты, а также мясо и мясные полуфабрикаты.

Наиболее распространен в продуктах питания стафилококковый энтеротоксин А (SEA). В соответствии с методическими указаниями МУК 4.2. 2429-08 развитие стафилококкоза у человека вызывает содержание в пищевых продуктах SEA в количестве 100-200 нг и выше.

Основными задачами при диагностике стафилококковых энтеротоксинов является их обнаружение в продуктах питания для контроля качества продуктов и недопущения массовой вспышки заболевания.

Для тестирования продуктов питания на содержание в них SE используют биологические методы (тестирование на животных), различные инструментальные методы (масс-спектрометрия, высокоэффективная жидкостная хроматография, капиллярный электрофорез и т.д.), а также иммунологические методы анализа (ИФА, метод иммунодиффузии и т.д.). В настоящее время наибольшее распространение получили иммунохимические методы тестирования, характеризующиеся высокой чувствительностью и специфичностью. Предел обнаружения SEA с помощью диагностического набора RIDASCREEN® SET A, B, C, D, E (метод качественного ИФА) 0,7 нг/мл. Предел обнаружения метода иммунодиффузии 0,1 мг/мл. Набор RIDASCREEN® SET A, B, C, D, E рекомендован как метод определения SE в пищевых продуктах (МУК 4.2. 2429-08) Роспотребнадзором. В тоже время использование методов ИФА тестирования ограничено кругом лабораторий, имеющих необходимое оборудование и высококвалифицированных специалистов. Время проведения ИФА составляет несколько часов и для выполнения требуется квалифицированный персонал. Очевидно, что для контроля качества пищевых продуктов производителями, а также сотрудниками контролирующих организаций необходимы методы, простые в исполнении, не требующие сложного оборудования и позволяющие проводить тестирование в короткие сроки и имеющий невысокую стоимость.

Целью нашей работы и являлась разработка одностадийного качественного иммунохроматографического метода тестирования SEA в различных продуктах питания. Иммунохроматографический тест представляет собой иммуноаналитический твердофазный метод, проходящий в формате хроматографии. Его проведение обеспечивает тест полоска, состоящая из нескольких мембран производства фирмы Arista, США. В качестве неподвижной фазы выступают моноклональные антитела, связанные на поверхности тест-полоски. Подвижную фазу образуют анализируемый на содержание SEA образец, в который добавляют вторые антитела, конъюгированные с наночастицами коллоидного золота. Конъюгаты высокостабильны, яркая окраска наночастиц коллоидного золота позволяет визуально оценивать результаты тестирования. Тест проводится в одну стадию, поэтому не требуется дополнительное время на стадии инкубации и отмывания. Время анализа составляет 15-20 мин. Процедура тестирования не требует использования никакого дополнительного оборудования и отличается простотой, результаты анализа легко интерпретировать. Тест имеет невысокую стоимость. Для его проведения не требуются квалифицированные специалисты. В качестве тестового токсина в работе использовался рекомбинантный SEA, сравнительный анализ

проводился также на энтеротоксине А продуцируемом стафилококками. Моноклональные антитела получали по стандартной методике. Специфичность антител на взаимодействие с другими энтеротоксинами стафилококков проверяли в иммуноферментном анализе (ИФА), всего было получено 19 антител. При подборе пар антител для сэндвич варианта ИФА проводили биотинилирование антител, анализ проводили в стрептавидин-биотиновой системе. Пары антител характеризовали по специфичности и чувствительности. Предел детекции в сэндвич варианте ИФА составлял 0,5 нг/мл. Полученные пары антител конъюгировали с наночастицами коллоидного золота и отбирали произвольной комбинацией пары пригодные для иммунохроматографического определения SEA. В качестве положительного контроля использовали поликлональные овечьи анти-мышинные антитела.

Оценка результатов тестирования качественная, она отвечает на вопрос, содержится или нет токсин в пробе в количестве, превышающем чувствительность теста.

Тестирование проходит при комнатной температуре. Срок хранения теста в течение 1 года.

В результате наших исследований мы создали иммунохроматографический тест, имеющий предел обнаружения 4 нг/мл SEA. Время анализа составляло 15 мин.

Для проверки теста на реальных продуктах, тестирование SEA проводили в образцах 3% молока, 9% творога, яблочного сока, в ветчине, в бутылированной и водопроводной воде и в растворе водно-солевого буфера в качестве контроля. Растворы образцов пищевых продуктов готовили в соответствии с МУК 4.2. 2429-08, а затем вносили в них SEA в различных концентрациях. Предел обнаружения SEA для всех образцов был одинаков и составил 4 нг/мл время анализа при этом составляло 15 минут.

Специфичность тест-системы характеризовали, определяя с ее помощью стафилококковые энтеротоксины А, В, D, С1, Е и термолabile токсин - LT E.coli. В диапазоне концентраций 1 мкг/мл связывания не наблюдали. Полученные результаты говорят о высокой специфичности разработанного метода, позволяющей проводить высокоселективную диагностику.

В качестве контроля на всех этапах разработки теста мы использовали метод сэндвич-ИФА. Чувствительность ИФА для определения SEA составляла 0,5 нг/мл.

Таким образом, создан экспресс-метод обнаружения стафилококкового энтеротоксина А в различных пищевых продуктах с помощью иммунохроматографии. Метод прост в применении и оценке результатов, не требует специальных помещений и оборудования и

может быть использован в пищевой промышленности и организациях Роспотребнадзора для контроля за качеством продукции.

Мировой опыт показывает, что подобные экспресс-тесты широко используются для контроля качества и безопасности пищевых продуктов. Так, для контроля содержания SEB широко используются иммунохроматографические тесты SEB BioThreat Alert® Kit, Германия (чувствительность 6 нг/мл); SMART™ Staph Enterotoxin B, США (чувствительность 10 нг/мл); BADD™ (чувствительность 4 нг/мл), США.

Раздел 18.

**НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ
МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ**

РЕКОМБИНАНТНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ, СОПРЯЖЕННЫЕ С G-БЕЛКОМ, КАК ОСНОВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ НАНОДЕТЕКТОРОВ

Герасимов А.С., Шульга А.А., Зейналов О.А., Скрябин К.Г.

Центр «Биоинженерия» РАН, Москва, Россия

Рецепторы, сопряженные с G-белком (G-protein coupled receptors, GPCR), представляют собой суперсемейство интегральных мембранных протеинов человека. Они являются медиаторами клеточного сигналинга, ключевыми элементами механизмов молекулярного распознавания и саморегуляции *in vivo* [Barth et al., 2005; Narolska et al., 2005]. Уникальные свойства GPCR предполагают их использование в качестве основы для нанодетекторов, а многообразие белков подчеркивает перспективность данного направления в области диагностики и аналитического контроля [Lundstrom K et al., 2008]. Следует отметить тот факт, что молекула рецептора способна взаимодействовать с несколькими веществами, с различной аффинностью, что позволяет качественно характеризовать исследуемые субстанции.

Основная проблема заключается в низком уровне биосинтеза рецепторов в хозяйских клетках, поэтому получение рекомбинантных белков с помощью методов генетической инженерии является ключевым этапом. Целью данной работы является гетерологическая экспрессия генов GPCR в клетках метилотрофных дрожжей *P. pastoris*. Поставлена задача получения перспективных штаммов-продуцентов некоторых интегральных мембранных белков человека.

В ходе работы сконструированы векторные конструкции pVR2His9GPCR, с гетерологичными генами рецепторов, находящиеся под контролем индуцибельного промотора AOX1 (индуктор – метанол). В качестве селективного маркера использовался ген *Zeo*, определяющий устойчивость к блеомицину. На 3'-конец генов GPCR искусственно добавлен нонагистидиновый таг с целью очистки целевых белков методом металлоафинной хроматографии. С целью вставки гена в определенный локус хромосомы путем гомологичной рекомбинации, клетки *Pichia pastoris* st.GS115 были трансформированы рекомбинантной ДНК электропорацией. Отбор трансформантов осуществляли на плотной питательной среде, содержащей блеомицин. Биосинтез рекомбинантного белка осуществлялся при культивировании клеток на индукционной среде ВММУ, содержащей 1 объемный % метанола. Клеточную локализацию целевого протеина и уровень экспрессии определяли с помощью иммунодотблотинга белковых фракций, используя моноклональные антитела против полигистидинового тага.

В результате работы получены штаммы-продуценты интегральных мембранных рецепторов человека: β 2-адренергического рецептора (hADR β 2), дофаминового-3 ингибирующего рецептора (hDRD3), галанинового-1 рецептора (hGALR1), рецептора 174 (hGPR174), меланокортинового-2 рецептора (hMC2R). Выход целевого белка, локализованного в цитоплазматической мембране клеток дрожжей, составил не менее 20 мг с литра культуры. Штаммы характеризуются более медленным ростом, относительно исходного штамма, на среде с метанолом, что говорит об inserции нескольких копий рекомбинантной ДНК в гомологичные локусы АОХ. Для некоторых рецепторов показана функциональная активность путем взаимодействия с мечеными лигандами. К тому же оптимизация процесса культивирования позволяет увеличить выход целевых белков в 1,5 – 2 раза.

Таким образом, штаммы-продуценты *P.pastoris* интегральных мембранных рецепторов человека способны производить высокие количества рекомбинантного функционально активного белка, что предполагает их использование в качестве основы для нанодетекторов лекарственных субстанций, наркотических веществ, пептидных гормонов, низкомолекулярных веществ. К тому же, разработки систем детекции на основе одних GPCR будут служить образцом и платформой для других систем со структурно и функционально более сложными рецепторами, такими как обонятельные и рецепторы вкуса.

НОВОЕ НАПРАВЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ – ИММУНОФЕРМЕНТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ КОМПОНЕНТОВ КЛАССИЧЕСКОГО И АЛЬТЕРНАТИВНОГО ПУТЕЙ КОМПЛЕМЕНТА

Козлов Л.В., Алёшкин В.А., Андина С.С., Баталова Т.Н., Бичучер А.М., Гора Н.В, Гузова В.А., Дьяков В.Л., Колесникова Е.А., Лахтин В.М., Лахтин М.В., Матвеевская Н.С., Новикова Л.И., Романов С.В., Скороходова Т.Г.

ФГУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия.

Функциональная активность компонентов комплемента является важным диагностическим критерием, как в инфекционной, так и в аутоиммунной патологии. Однако, из-за отсутствия удобных для клинического применения методов определение функциональной активности компонентов комплемента не нашло пока своего места

в клинической иммунологии и биохимии. Гемолитический метод не удобен, устарел и дает в ряде случаев ошибочно завышенные результаты в результате реактивного лизиса, характерного для острофазного состояния. Современные иммуноферментные методы позволяют определять количество белка-антигена, но не его функциональную активность.

Как правило, определение количественного содержания в крови компонентов комплемента не выявляет существенных различий при различных заболеваниях, кроме случаев врожденного или приобретенного дефицита. И, наоборот, как было нами показано, во многих случаях функциональный профиль комплемента может быть характерен для данной нозологии. Очень часто функциональная комплементограмма позволяет отличить инфекционное поражение от аутоиммунного заболевания.

Характерной особенностью системы комплемента является способность в ходе каскада ее активации к образованию комплексных протеолитических ферментов, иммобилизованных на поверхности мишени. Эти обстоятельства оказались благоприятными для изучения ферментативных процессов системы комплемента с использованием твердофазных методов с иммуноферментными способами обнаружения иммобилизованных участников ферментативного процесса. Перед нами стояла задача создания современных унифицированных методов определения функциональной активности индивидуальных компонентов комплемента, как в сыворотке крови, так и в изолированном виде, что позволяло бы определять эту активность не только в крови, но и в других биологических жидкостях, например, в слюне, где содержание компонентов чрезвычайно мало и отсутствуют другие компоненты, необходимые для выявления активности определяемого.

В результате решения этой задачи были разработаны методы определения функциональной активности компонентов классического пути C1q, C1rs. C2, C3, C4 (обоих изотипов – C4A и C4B), C9, C1 ингибитора (его активности в классическом и альтернативном путях) и факторов альтернативного пути В и D. Все эти системы легко дополняются иммуноферментными системами типа сэндвич для определения количества соответствующих компонентов и факторов, что позволяет рассчитывать также их удельную активность. В рамках этих методов были разработаны также способы выявления действия веществ на систему комплемента на стадиях связывания C1q на мишени (ингибирования связывания C1q) и образования C3- и C5-конвертаз (соответственно «перехват» активированных C4b и C3b).

Разработанные методы позволяют изучать действие на комплемент лекарственных веществ с целью, с одной стороны, выявлять их способность к побочному, нежелательному действию, с другой стороны обеспечить поиск средств для направленного блокирования комплемента, что полезно в противовоспалительной терапии, трансплантологии, лечении инфаркта миокарда, инсульта и других случаев реперфузионных повреждений, отмены разрушительного действия комплемента и при инфекционной патологии, например, при менингитах или постгриппозных осложнениях.

Развитие методов определения количества и функциональной активности C1 ингибитора позволило создать пакет методов для дифференциальной диагностики отеков, что дает возможность отличить аллергические отеки от наследственных ангионевротических отеков первого и второго типа. Полученные данные о независимости реактивных центров ингибитора, участвующих в классическом и альтернативном путях, позволяют ожидать открытия новой нозологической особенности в рамках наследственного ангионевротического отека II типа, когда мутантный белок по-разному изменяет активности для ингибирования классического и альтернативного путей.

Особый интерес представляет изотипирование компонента C4. Разработанные методы позволяют отдельно определять изотипы C4A и C4B. Этот компонент наиболее богат наличием врожденных дефицитов. В среднем в популяции имеется 15% индивидуумов с врожденным дефицитом C4A и столько же с врожденным дефицитом C4B. Небольшое различие в химическом строении этих изотипов ведет к отличиям в реакционной способности. Такие дефициты мы склонны называть «скрытыми иммунодефицитами», поскольку, не приводя, на первый взгляд, к каким-либо серьезным нарушениям, они являются причиной предрасположенности к различным заболеваниям аутоиммунной и инфекционной природы и, в частности, к бактерионосительству и невосприимчивости к иммунизации. Характерно отсутствие этих дефицитов у лиц пожилого возраста, что говорит об ответственности таких иммунодефицитов за преждевременную смерть. Остается выяснить, какие из заболеваний являются смертельно опасными для лиц пожилого возраста с врожденными дефицитами изотипов четвертого компонента комплемента.

Интересно отметить, что дефициты изотипов C4 очень часто встречаются при невынашиваемости беременности. Это известно из литературных данных и подтверждено нашими исследованиями. Как следует из литературных данных одновременный дефицит изотипов C4 у обоих родителей является почти 100%-ным критерием риска выкидыша. Из этого следует, что критичным для сохранения плода

является отсутствие именно у него, а не у матери, наследуемых дефицитов изоформ компонента С4.

Что касается инфекционной патологии, то нами была показана предрасположенность к хламидиозам лиц с дефицитом С4В и абсолютная зависимость от дефицита С4А хеликобактериоза с желудочной локализацией.

Изучение с помощью иммуноферментных методов способности циркулирующих иммунных комплексов связывать комплемент позволило дифференцировать антитела, их образующие, как естественные (существующие изначально) и иммунные (в адаптивном ответе). Оказалось, что при иммунизации группы лиц у них образуются несколько типов адаптивных антител, если судить по способности связывать комплемент иммунными комплексами, образованными этими антителами с антигеном. Эти антитела по вышеуказанным свойствам резко отличаются от естественных антител. Число типов ограничено, каждому типу соответствует своя небольшая подгруппа иммунных лиц и, как мы полагаем, определяется числом различных эпитопов антигена. Данный подход будет полезен для оценки результатов вакцинации и при оценке действенности новых вакцин.

НОВЫЙ МЕТОД ОДНОСТАДИЙНОЙ ДЕТЕКЦИИ АНТИГЕН-АНТИТЕЛЬНОГО СВЯЗЫВАНИЯ

**Маракасова Е.С., Шибаева А.В., Белоусова Ж.В., Валиуллин Л.Ф.,
Малышева Е.В., Дудорова М.Г., Осипенкова О.В., Гусева М.А., Елагина Е.М.**

Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина, Москва, Россия

ФГУ «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных», Казань, Татарстан, Россия

*Набережночелнинский государственный педагогический институт,
Набережные Челны, Татарстан, Россия*

Курский государственный университет, Курск, Россия

Учреждение российской академии медицинских наук Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН, МО, Россия

Смоленский государственный университет, Смоленск, Россия

В течение многих лет антиген-антительное распознавание в варианте твердофазного иммуноферментного анализа, в частности, с использованием моноклональных антител, повсеместно применяется в диагностике инфекционных заболеваний и служит простым и универсальным средством обнаружения широкого круга самых раз-

нообразных химических соединений в составе различных сложных смесей. По данным Роспотребнадзора РФ в нашей стране ежегодно производится и потребляется более 90 млн. наборов для ТИФА на сумму более 20 млрд. руб. Однако, для разработки такого типа тестов необходима оборудованная лаборатория. В последнее время получили распространение такие разновидности иммуноферментного анализа, как гомофазные и «быстрые» тесты, которые могут быть разработаны вне оборудованных лабораторий. Эти тесты нашли широкое применение при выявлении химических загрязнителей, антибиотиков, психотропных и других лекарственных средств, идентификации химического состава материалов органического происхождения. Одними из отличительных черт гомофазных тестов являются быстрота получения самих тестов и результата, а также независимость этого типа иммунохимических тестов от приборного оснащения. Перечисленные преимущества «быстрых» тестов вызывают большой интерес технологов предприятий, природоохранных и правоохранительных организаций, а также индивидуальных потребителей. Не смотря на то, что тесты данного типа уже выпускаются в нашей стране, до настоящего времени их широкое применение было ограничено недостаточной чувствительностью, делающей их непригодными для большинства задач медицинской и ветеринарной диагностики.

Целью данной работы было разработать универсальный наноразмерный набор, пригодный для моментальной одностадийной детекции антиген-антительного связывания. В соответствии с данной целью были поставлены следующие задачи: полученный набор должен быть 1) совместим с широким спектром уже известных и перспективных моно- и поликлональных антител, 2) обеспечивать возможность разработки диагностикумов силами широкого круга лабораторий. 3) Стоимость производства и применения нового набора не должна превышать стоимости существующих «быстрых» тестов. 4) Набор не должен уступать современным системам твердофазного ИФА III поколения по чувствительности.

Разработанный нами метод основан на новом физическом принципе: выявлении конформационной перестройки константной области иммуноглобулина в результате связывания антигена. Молекулярный наносенсор, позволяющий визуализировать перемещение доменов константной области антитела, был получен на основе слияния двух бифункциональных белков, гены которых были экспрессированы в клетках *E. coli* в растворимой форме. Способность компонента C1q связываться с участком домена CH₂, экспонируемым в раствор в результате антиген-зависимой перестройки иммуноглобулина была основным фактором для слияния. Именно это связывание лежит в

основе передачи сигнала на начало активации комплемента с вновь образованными иммунными комплексами. Детекцию сигнала проводили следующими способами:

1) За счет цветного ферментативного теста с ферментом β -галактозидазы - накопление сигнала и оптимизация чувствительности в предлагаемой схеме достигалась за счет того, что субстрат β -галактозидазы X-gal – растворим и бесцветен, а продукт его расщепления имеет синий цвет и не растворим.

2) За счет переноса лучистой энергии между двумя флуоресцирующими сенсорами при их сближении (FRET - fluorescence resonance energy transfer). В этом случае комплекс моноклонального антитела формировался не с двуцепочечным производным β -галактозидазы, а только с одной ее цепью, содержащей лектин (белок 1). Репортерный белок 2 был получен и очищен отдельно.

Полученный наноразмерный молекулярный сенсор позволяет визуализировать перемещение доменов константной области антитела, вызываемое связыванием антигена в активных центрах антител. В дальнейшем предлагается использовать сенсор для препаративного получения комплексов с антителом против какого-либо модельного гаптена и в модельных экспериментах по отработке схемы кинетического контроля реассоциации β -галактозидазы. Основным преимуществом разработанного метода детекции является возможность использования таких традиционных подходов и объектов белковой инженерии, как β -галактозидазы *E. coli*, что практически исключает сложности и риски, связанные низкими выходами белка и необходимостью рефолдинга белков *in vitro*. Это обусловлено возможностью получения рекомбинантных производных β -галактозидазы *E. coli* непосредственно в растворимой форме с высокими выходами. Использование аффинных тегов (6His) позволило провести хроматографию в мягких условиях, исключающих разрушение неустойчивого комплекса. Высокая аффинность лектина VIP36 к пентаманнозному кору олигосахаридной цепи иммуноглобулина позволила исключить сложности при получении и очистке комплекса молекулярного сенсора с антителом. Разработка универсального белка, дающего прочные комплексы с полисахаридными группировками иммуноглобулинов и обладающего ферментативной активностью, может представлять самостоятельную ценность для создания систем иммуноферментного анализа. На основании полученных данных предлагается разработать серию белков, различающихся длиной и аминокислотным составом линкера, которые могут быть испытаны в практических экспериментах по конструированию систем быстрой иммунохимической детекции.

Полученные результаты представляют самостоятельную ценность, которые планируется защитить патентами. Настоящая работа выполнена при поддержке Государственных контрактов № 14.740.11.0184, №П807, №П1253, №П1263, № 16.740.11.0027, №14.740.11.0123, № 14.740.11.0122; проектов в рамках мероприятия 1.2.2 шифры заявок (2010-1.2.2-203-002-038, 2010-1.2.2-207-003-082, 2010-1.2.2-141-022-040, 2010-1.2.2-141-022-018); мероприятия 1.3.1 шифры заявок (2010-1.3.1-207-003-043, 2010-1.3.1-203-002-017, 2010-1.3.1-203-002-018, 2010-1.3.1-220-006-021); проектов № 2.1.1/2468, № 2.1.1/4510, № 2.1.1/2516 ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 – 2013 годы.

МЕТОД ОДНОВРЕМЕННОГО КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИММУНОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА СЕМИ ЭНТЕРОТОКСИНОВ СТАФИЛОКОККОВ НА ГИДРОГЕЛЕВОМ БИОЧИПЕ

Филиппова М.А.¹, Рубина А.Ю.¹, Фейзханова Г.У.¹, Шепеляковсея А.О.², Сидина Е.И.^{2,5}, Бозиев Х.М.², Ламан А.Г.², Бровко Ф.А.², Вертиев Ю.В.⁴, Заседателев А.С.¹, Гришин Е.В.³

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва

² Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Московская обл. г. Пущино

³ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

⁴ Государственное учреждение научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Москва

⁵ Пущинский Государственный университет, Московская обл., г. Пущино

Стафилококки в процессе роста могут продуцировать набор токсинов, наиболее опасными из которых являются энтеротоксины. Отравление пищевыми продуктами, содержащими энтеротоксины стафилококков, широко распространено и находится на втором месте после отравлений, вызываемых сальмонелльными инфекциями. При пищевых отравлениях возможны различные осложнения, включая развитие аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит, атопический дерматит, и разного рода аллергий. Также SEs вовлечены в синдром токсического шока.

SEs являются небольшими белками с молекулярными массами от 27 до 30 кДа и относятся к семейству суперантигенов. Наиболее

распространенными являются энтеротоксины А-Е, они являются наиболее частой причиной пищевых отравлений. Энтеротоксины G и I могут быть не только причиной пищевых отравлений, но также вызывать токсический синдром. Для энтеротоксина А необходимый уровень определения составляет 200 нг/100 г продукта. При анализе интоксикации детей предел обнаружения в биологических жидкостях и продуктах питания должен быть еще ниже. Необходимо также учитывать потенциальную возможность использования энтеротоксинов в качестве биологического оружия. Все эти данные делают актуальным создание высокочувствительных и специфичных методов обнаружения и мониторинга всех известных SEs.

Для идентификации и анализа стафилококковых энтеротоксинов в настоящее время используются различные лабораторные методы. Наиболее чувствительным и удобным методом является твердофазный иммуноанализ.

К недостаткам традиционных иммунологических методов относится невозможность одновременно тестировать образец на наличие нескольких токсинов. Для решения таких многопараметрических задач был предложен новый аналитический инструмент - биологический микрочип (биочип). В Институте Молекулярной Биологии им. В.А.Энгельгардта РАН создана технология изготовления гидрогелевых биочипов, которая позволяет создавать массивы гелевых элементов, содержащие иммобилизованные молекулярные зонды различной природы (белки, ДНК, РНК и олигосахариды) и проводить различные типы реакций в ходе одного анализа на биочипе.

Целью данной работы являлось создание прототипа диагностической тест-системы для одновременного количественного определения энтеротоксинов стафилококка А, В, С, D, Е, G и I. К диагностическим системам для определения патогенов и энтеротоксинов в частности, предъявляется ряд требований, таких как простота процедуры подготовки образцов и методики проведения анализа, высокая чувствительность и специфичность анализа, воспроизводимость получаемых данных. Практически всем вышеназванным требованиям удовлетворяет тест-система на основе гидрогелевых биочипов для одновременного определения семи энтеротоксинов стафилококка, созданию которой посвящена данная работа.

В качестве антигенов для получения моноклональных антител использовали рекомбинантные энтеротоксины, экспрессируемые в E coli и выделенные металлхелатной хроматографией. Моноклональные антитела получали по стандартной методике, в общей сложности было получено 113 специфических моноклональных антител.

Используя возможности метода многопараметрического анализа на биочипах, из полученной панели моноклональных антител для каждого энтеротоксина были отобраны пары антител, обладающих высокой аффинностью и не дающие перекрестных взаимодействий с другими энтеротоксинами. Иммуноспецифичность отобранных антител была подтверждена в параллельном анализе с коммерческими препаратами нативных энтеротоксинов А и В.

Для одновременного анализа семи типов стафилококковых энтеротоксинов были созданы биочипы, содержащие иммобилизованные антитела против данных энтеротоксинов. В качестве метода был выбран двухстадийный сэндвич-иммуноанализ с флуоресцентной регистрацией сигнала. Был разработан протокол одновременного анализа семи энтеротоксинов на биочипе и получены основные характеристики метода: аналитическая чувствительность от 0,1 нг/мл до 0,5 нг/мл (для различных энтеротоксинов) и коэффициент вариации, который для всех токсинов не превышал 15 %. Время анализа составляло 17 часов.

Разработанный метод анализа апробировали на образцах биологических сред. Смесь семи энтеротоксинов добавляли в различных концентрациях в буферный раствор, молоко, сливки, творог и кашу для детского питания, содержащую сухое молоко. Выбор молока и продуктов на основе молока в качестве образцов для анализа основан на литературных данных о возможном наличии в молочных продуктах энтеротоксинов, появляющихся, как правило, вследствие использования молока от животных больных маститами. После проведения пробоподготовки образцы биологических сред тестировались на биочипах. Минимальная достоверно определяемая концентрация энтеротоксинов в биологических образцах не превышала 1,1 нг/мл. В результате проведенных экспериментов не было получено ни ложноположительных, ни ложноотрицательных результатов и было показано, что разработанный метод одновременного количественного анализа энтеротоксинов на биочипах позволяет адекватно определять их содержание в различных пищевых продуктах.

При определении биотоксинов важным параметром является время анализа. Использование отражающих металлизированных подложек при производстве биочипов позволило разработать экспресс-вариант анализа, сократив время его проведения с 17 часов до двух часов без потери чувствительности.

Таким образом, на примере анализа семи типов энтеротоксинов стафилококка была продемонстрирована возможность создания тест-системы на основе гидрогелевых биологических микрочипов для

одновременного определения нескольких биопатогенов в образце. Полученный прототип тест-системы может быть положен в основу для создания аналитического инструмента, предназначенного для определения различных антигенов.

Раздел 19.

ДРУГОЕ

ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ КАК НОВЫЙ МЕТОД ДЕТЕКЦИИ ОСТАТОЧНОЙ ДНК КЛЕТОК VERO В ПРЕПАРАТАХ ВИРУСОВ ВАКЦИННОГО НАЗНАЧЕНИЯ

Смирнова М.С., Баловнева М.В., Шибаета А.В., Зарипова Р.С., Белоусова Ж.В., Валиуллин Л.Ф., Малышева Е.В., Дудорова М.Г., Гусева М.А., Елагина Е.М.

*Учреждение российской академии медицинских наук Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН, МО, Россия
ФГУ «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных», Казань, Татарстан, Россия*

*Набережночелнинский государственный педагогический институт,
Набережные Челны, Татарстан, Россия*

Курский государственный университет, Курск, Россия

Смоленский государственный университет, Смоленск, Россия

В настоящее время иммуноферментный анализ и гибридизационный метод с использованием радиоактивных изотопов являются основными для детекции содержания остаточной геномной ДНК в препаратах, используемых для получения вакцин. Однако существует более простой, дешевый и безопасный метод для определения содержания остаточной ДНК в вакцинных препаратах – это полимеразная цепная реакция в реальном времени (реал-тайм ПЦР). Данный метод является удобной альтернативой вышеупомянутым методам, однако, до настоящего времени не применялся в нашей стране.

Главной целью данной работы было разработать методику количественного определения остаточной ДНК клеток Vero в очищенных инактивированных препаратах хантавируса Пуумала и вируса клещевого энцефалита, предназначенных для получения вакцин.

Вторичные концентраты хантавируса Пуумала и вируса клещевого энцефалита являлись вакцинным материалом в настоящем исследовании. Для проведения аналитических измерений использовали анализатор нуклеиновых кислот и фотометрический колориметр со встроенными функциями обработки данных фирмы Amersham. Для того чтобы получить контрольный препарат геномной ДНК клетки культуры Vero выращивали на среде Игла MEM с 4% раствором сыворотки, затем из клеток осажденных специально разработанным способом выделяли геномную ДНК в соответствии с рекомендациями производителя набора «Комплект реагентов для выделения

геномной ДНК из тканей животных» (ЗАО Синтол). Полученный осадок клеток инкубировали с раствором протеиназы К (№1) в течение 14-16 часов при +50°C. Далее проводили двойное переосаждение изопропанолом и 70%-ым этанолом. Концентрацию полученного осадка ДНК измеряли спектрофотометрически без построения калибровочного графика с использованием прибора Amersham Bioscience Ultraspec Pro 6300, пользуясь встроенным методом «Определение концентрации ДНК». Фенольную экстракцию ДНК из препаратов вторичного концентрата (полуфабрикат вакцины) проводили с 750 мкл исследуемого препарата вторичного концентрата. ДНК инкубировали с фенолом и хлороформом при 65°C в течение 5 минут. Разделение водной и органической фаз проводили центрифугированием и осадок переосаждали хлороформом, изопропанолом и этанолом, и высушивали при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 10 мин, растворяя затем в воде. До проведения ПЦР-анализа полученный препарат экстрагированный из вакцинного препарата нуклеиновой кислоты может храниться в течение 24 часов при 2-8°C. Непосредственно перед использованием, находившийся на хранении раствор ДНК должен быть прогрет в течение 5 минут при +65°C. Из полученного препарата очищенной ДНК отбирали 5 мкл раствора в качестве образца для внесения в реакционную смесь ПЦР. Для получения серийных разведений стандартной ДНК клеток Vero с шагом в 4 раза, первичный рабочий раствор ДНК с концентрацией 1 мкг/мл разводили с водой и прогревали в течение 15 минут при +65°C. Полученный контрольный ряд разведений хранят при температуре $4 \pm 2^\circ\text{C}$ не более 1 суток.

Состав реакционной смеси для проведения ПЦР содержал (мкм): реакционная смесь (dNTP 500 мкМ каждого, термобуфер B9004S (New England Biolabs), MgCl_2 2,5 мМ) – 10; праймеры – 5 пмоль/мкл каждого – 2; зонд (3 пмоль/мкл) – 1; вода – 7; ДНК-полимераза (Антительный хот-старт, 10 ед/мкл) – 0,2. В каждую из пробирок с реакционной смесью вносили по 5 мкл ДНК. В качестве ряда серийных разведений контрольной ДНК для построения калибровочного графика использовали 6 образцов с концентрацией ДНК 977 пг/мл, 3906 пг/мл, 15625 пг/мл, 62500 пг/мл, 250000 пг/мл, 1000000 пг/мл. Для проведения ПЦР использовали следующую программу: предварительная денатурация 95°C – 300 сек; основной режим (50 циклов) – 95°C – 50 сек; – 60°C – 50 сек.

Результаты анализировали при условии величины сигнала в ПКЮ, рассчитанной в автоматическом режиме, менее 10^5 пг/мл и величины сигнала ОКО не более 5×10^4 пг/мл, затем проводили построение калибровочного графика. Для расчета истинной концентрации ДНК в исследуемых препаратах полученные в результате значения определенной геномной ДНК делили на 75, чтобы учесть эффект концентрирования препарата в процессе его фенольной экстракции. Расчет концентрации остаточной ДНК в образце проводили по формуле:

$$[C_0] = \frac{[C_{r1}]C_{tr2} - [C_{r2}]C_{tr1}}{C_{tr2} - C_{tr1}}$$

$[C_0]$ – условная точка, соответствующая параметру C_t при нулевой концентрации ДНК в образце (результат линейной экстраполяции).

$[C]$ – lg концентрации ДНК, пг/мл; –

$[C_t]$ – значения

$[C_{r1}]$ – произвольных точки R1 и R2 с точно известными координатами

Концентрацию ДНК в экспериментальной точке X (в виде lg концентрации ДНК, пг/мл) рассчитывали по формуле:

$$[C_x] = \frac{[C_0] - ([C_0] - [C_{r1}])C_{tx}}{C_{tr1}}$$

В настоящем работе впервые описана процедура количественного определения остаточной ДНК клеток Vero в очищенных инактивированных препаратах хантавируса Пуумала и вируса клещевого энцефалита, предназначенных для получения вакцин.

Настоящая работа выполнена при поддержке Государственных контрактов № 14.740.11.0184, №П807, №П1253, №П1263, № 16.740.11.0027, №14.740.11.0123, № 14.740.11.0122; проектов в рамках мероприятия 1.2.2 шифры заявок (2010-1.2.2-203-002-038, 2010-1.2.2-207-003-082, 2010-1.2.2-141-022-040, 2010-1.2.2-141-022-018); мероприятия 1.3.1 шифры заявок (2010-1.3.1-207-003-043, 2010-1.3.1-203-002-017, 2010-1.3.1-203-002-018, 2010-1.3.1-220-006-021); проектов № 2.1.1/2468, № 2.1.1/4510, № 2.1.1/2516 ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 – 2013 годы, а также гранта РФФИ № 09-04-99002-р_офи.

ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО И ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА У БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН С РАЗЛИЧНЫМИ ФОРМАМИ ВПГ I, II ИНФЕКЦИИ

Тупиков В.А., Гафурова Д.Н.

ГОУ ВПО «ЧелГМА Росздрава», Челябинск, Россия

Введение. В последние годы в акушерстве, гинекологии, неонатологии большую клиническую значимость приобрела проблема вирусных инфекций у беременных и новорожденных. Европейским региональным бюро ВОЗ вирусные поражения урогенитального тракта женщин (герпетическая, цитомегало- и папилломавирусная инфекции) внесены в группу болезней, которые определяют будущее инфекционной патологии. Среди них особое место принадлежит герпетической инфекции, которая до настоящего времени остается недостаточно изученной. (Исаков В.А. и соавт., 2006; Макацария А.Д., Долгушина Н.В., 2004; Самгин М.А., Халдин А.А., 2002; Серов В.Н. и соавт., 2001). В современной литературе остаются недостаточно изученными и противоречивыми данные, касающиеся изменений в иммунной системе у беременных с вирусной инфекцией.

Цель и задачи. Изучить уровни иммунологических показателей периферической крови у беременных женщин с различными формами герпетической инфекции.

Материалы и методы. Изучение клеточных и гуморальных факторов системного иммунитета было проведено 152 беременным женщинам с ВПГ I, II-инфекцией в I триместре гестации. Из них 66 беременных женщин были с генитальной локализацией ВПГ I, II-инфекцией (36 – с инфекцией в стадии активации и 30 – с инфекцией в латентной стадии) и 86 респондентов с ВПГ I, II-инфекцией не уточненной локализации (28 – с инфекционным процессом в стадии активации и 58 – в латентной стадии). Группу контроля составили 24 практически здоровых беременных женщин того же гестационного срока.

При исследовании клеточных факторов общей противoinфекционной защиты было определено абсолютное количество лейкоцитов, относительное и абсолютное число нейтрофилов, моноцитов, лимфоцитов и их субпопуляций в периферической крови, а также подробно оценен функциональный профиль нейтрофильных лейкоцитов. Для изучения гуморального звена системного иммунитета проводилось исследо-

вание концентраций иммуноглобулинов классов А, М, G, компонентов комплемента С1 – С5 и цитокинов (ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-8, ИЛ-10, ФНО- α , ИФН- α , ИФН- γ , РАИЛ) в сыворотке крови.

Основные результаты. При исследовании клеточных факторов общей противoinфекционной защиты было установлено, что количество лейкоцитов у инфицированных беременных не отличалось от данного показателя группы контроля, при этом абсолютное и относительное количество нейтрофильных лейкоцитов достоверно выше было у беременных с ВПГ I, II-инфекцией и не зависело от локализации и стадии инфекционного процесса. Абсолютное и относительное количество моноцитов было повышенным у инфицированных женщин по сравнению с группой практически здоровых беременных, при этом активация инфекционного процесса приводила к еще большему увеличению данных показателей. У беременных женщин с ВПГ I, II-инфекцией достоверно чаще имело место снижение абсолютного и относительного количества лимфоцитов, при этом зависимости от локализации и стадии инфекционного процесса установлено не было.

При оценке основных субпопуляций лимфоцитов было выявлено снижение количества CD3 и CD4 лимфоцитов в периферической крови беременных женщин с ВПГ I, II-инфекции, как при неуточненной локализации инфекции, так и при генитальном герпесе, по сравнению с аналогичными показателями группы контроля, при этом данные изменения наиболее выражены при активации герпетической инфекции. Также нами было зарегистрировано повышение количества CD8 позитивных лимфоцитов у всех инфицированных беременных по сравнению с группой практически здоровых женщин, и как следствие этого, снижение соотношения CD4/CD8 лимфоцитов у всех инфицированных женщин. У беременных с ВПГ инфекцией имеет место увеличение количества натуральных киллеров (CD16), при этом активация инфекционного процесса приводит к более выраженному увеличению числа данных клеток. Количество лимфоцитов, несущих активационные рецепторы, также было повышенным у инфицированных беременных по сравнению с группой контроля. Содержание клеток, экспрессирующих адгезивные молекулы (CD11b), падает, а количество лимфоцитов несущих маркеры апоптоза (CD95), увеличивается только у инфицированных беременных женщин в стадии активации, при этом отличий в зависимости от локализации

инфекции установлено нами не было.

При оценке нейтрофильного звена иммунитета у беременных женщин с ВПГ I, II-инфекцией было установлено, что кислородзависимый метаболизм нейтрофилов крови, изучаемый в НСТ-тесте, соответствует его уровню у практически здоровых беременных. Показатели фагоцитарной функции у беременных с ВПГ I, II-инфекцией снижаются относительно аналогичных показателей группы контроля. Активация герпетической инфекции приводит к более значимому снижению данных показателей при любой локализации инфекционного процесса.

При изучении гуморальных факторов иммунитета было зарегистрировано снижение концентрации неспецифических иммуноглобулинов класса М у инфицированных беременных, при этом более значимое снижение имело место у женщин с генитальным герпесом в стадии активации. Уровень неспецифического иммуноглобулина класса А и G оставался неизменным у беременных с ВПГ I, II-инфекцией по сравнению с аналогичным показателем группы контроля. Общая активность комплемента сыворотки крови инфицированных беременных женщин, изучаемая по 50% гемолизу, соответствует показателям практически здоровых беременных. Уровни отдельных компонентов системы комплемента по-разному изменяются у инфицированных беременных женщин.

При изучении цитокинового профиля было установлено, что уровни противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-10) были снижены у инфицированных беременных вне зависимости от стадии и локализации инфекции по сравнению с их уровнем у беременных группы контроля. Концентрация провоспалительных цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-8) у обследуемых беременных женщин была повышена по сравнению с аналогичными показателями практически здоровых беременных женщин. Концентрация другого провоспалительного цитокина (ИЛ-1 β) была статистически значимо снижена у беременных с ВПГ I, II-инфекцией в стадии активации по сравнению с показателем группы контроля, по всей вероятности, за счет высокой продукции его рецепторного антагониста. При оценке интерферонового статуса женщин нами было установлено, что уровень ИФН- α был повышен у всех инфицированных женщин, а концентрация ИФН- γ была снижена при активации ВПГ I, II-инфекции.

Выводы. У беременных женщин с ВПГ I, II-инфекцией зарегистрированы изменения уровней иммунологических показателей периферической крови: увеличение количества нейтрофилов, моноцитов, снижение общего количества лимфоцитов, CD3, CD4 клеток, соотношения CD4/CD8, при этом имеется увеличение CD8 лимфоцитов, натуральных киллеров, незрелых клеток и клеток с маркерами активации и апоптоза; происходит снижение показателей фагоцитарной функции нейтрофилов, формируется дискомплементемия, повышается уровень провоспалительных и снижается уровень противовоспалительных цитокинов.

ИМЕННОЙ УКАЗАТЕЛЬ (ТОМ V)

А

Агол В. – 75
Акинина З.Ф. – 50
Алексеева Ю.А. – 51
Аленина Н.В. – 113
Алёшкин В.А. – 138
Андина С.С. – 138
Андосова Л.Д. – 32
Андрюшина Т.Ю. – 51
Анисимов А.П. – 93
Асафьева О.Ю. – 67
Астахова Т.С. – 67, 123, 125, 128

Б

Бабаева М.А. – 89
Бадер М. – 113
Байкова О.Ю. – 75
Баловнева М.В. – 80, 149
Баранов В.С. – 113,
Барышев П.Б. – 7, 14
Барышева Н.Н. – 44, 46
Баталова Т.Н. – 138
Бейкин Я.Б. – 67
Белуосова Ж.В. – 80, 141, 149
Бикетов С.Ф. – 95
Бичучер А.М. – 138
Блатова О.Л. – 32
Богачев В.В. – 7, 14
Бозиев Х.М. – 132, 144
Бокарев А.А. – 44
Браславская С.И. – 62
Братусь И.В. – 61
Бреннер Е.В. – 120
Бровко Ф.А. – 132, 144
Брусенцов И. И. – 120
Бруснигина Н.Ф. – 44, 46
Будилова О. В. – 54
Бузицкая Ж.В. – 58
Бурдинская Ю.В. – 67

Буркин А.В. – 89
Бурцев О.А. – 35

В

Вакин В.С. – 71
Валенцева А.А. – 82
Валиуллин Л.Ф. – 80, 141, 149
Васильев Г.В. – 120
Васильева А.А. – 71
Васильева О.А. – 28
Вассиляк С. – 75
Вертиев Ю.В. – 132, 144
Винокурова И.С. – 61
Войцеховская Е.М. – 71
Волкова Р.А. – 105
Воробьева Е.Н. – 50,
Воробьева М.С. – 105
Вороненко С.Г. – 42

Г

Гаврилин Е.В. – 75
Гаврилова Е.В. – 24
Галимзянов Х.М. – 89
Гапельченкова Т.В. – 93
Гашникова Н.М. – 7, 14
Гафурова Д.Н. – 151
Герасимов А.С. – 137
Глотов А.С. – 113
Глушкова О.А. – 46
Гмыль А.П. – 75
Говорун В.М. – 108
Говорухина М.В. – 82
Гомберг М.А. – 35
Гоптарь И.А. – 51
Гора Н.В. – 138
Горлова И.С. – 105
Гриневич Е.Е. – 113
Гришечкин А.Е. – 78
Гришин Е.В. – 132, 144

Грудинин М.П. – 58
Гузова В.А. – 138
Гуляева С.А. – 67
Гусева М.А. – 80, 141, 149
Гусельников С.В. – 120
Гучев И.А. – 67
Гущин А.Е. – 35, 37

Д

Дедков В.Г. – 95
Денисенко А.Д. – 113
Дентовская С.В. – 93
Дешпанде Ж. – 75
Дзюблик И.В. – 42
Дикленко Т.В. – 61
Долгин В.А. – 17
Дудорова М.Г. – 80, 141, 149
Дьяков В.Л. – 138

Е

Евсеева В.В. – 93
Егоров А.Ю. – 71
Елагина Е.М. – 80, 141, 149
Елпаева Е.А. – 58
Еремеева Т.П. – 75
Есаулкова А.Ю. – 87
Ерофеева М.К. – 71
Ефременко Д.В. – 93

Ж

Жаринова Н.В. – 93
Желанкин А.В. – 109
Жеребко Н.Н. – 42
Жукова Е.Н. – 50

З

Зайцев И.Ф. – 50
Зарипова Р.С. – 80, 149
Заседателев А.С. – 144
Зацепин Т.С. – 95
Зациорская С.Л. – 54

Зейналов О.А. – 137
Зинченко А.А. – 132
Злобин В.И. – 78
Золотоверхая Е.А. – 54
Зубкова Н.В. – 95
Зубчонок Н.В. – 62

И

Иванов А.П. – 75
Иванова М.М. – 109
Иванова О.Е. – 75
Иванчик Н.В. – 67
Исаева О.В. – 75

К

Коновалов А.С. – 20
Конторщикова К.Н. – 32
Конькова-Рейдман А.Б. – 78
Костенко И.Г. – 42
Котловский Ю.В. – 108
Котловский М.Ю. – 108
Кречикова О.И. – 67
Кривицкая В.З. – 71
Куделькина С.Ю. – 32
Кузнецова И.В. – 93
Кузницова С.В. – 51, 95
Куевда Д.А. – 8, 20
Кудрявцева А.В. – 6
Куличенко А.Н. – 93
Кусая В.В. – 11
Кью О. – 75

Л

Лазарева Е.Н. – 89
Ламан А.Г. – 132, 144
Лаптева Л.К. – 105
Лаптева Т.А. – 7, 14
Лахтин В.М. – 138
Лахтин М.В. – 138
Леонович О.А. – 80
Липская Г.Ю. – 75

Луконкина О.А. – 50
Любавина И.А. – 132

М

Маврутенков В.В. – 61
Маврутенкова Т.В. – 61
Мазепа В.Н. – 44, 46
Мазрухо Т.В. – 82
Максакова В.Л. – 71
Максютов Р.А. – 24
Малеев В.В. – 89
Мальшева Е.В. – 80, 141, 149
Манзенюк И.Н. – 51
Маракасова Е.С. - 141
Маркелов М.Л. – 51, 95
Мартин Р.З. – 75
Матвеевская Н.С.- 138
Махнева М.А. – 87
Махова М.А. – 44, 46
Мещерякова Ю.В. – 7, 14
Миллер Ю.В. – 50
Миненко А.Н. – 62
Митрофанов К.Ю. – 109
Михайлов М.И. – 75
Михалева О.В. – 32
Мордвинов В.А. – 120
Морозова О.В. – 78
Мухортова О.А. – 50
Мясоедова В.А. – 109

Н

Назарова Р.В. – 50
Надеждина М.В. – 87
Найда Е.А. – 82
Наякшин А.М. – 120
Неверов А.Д. – 17
Никонорова Ю.В.- 7, 14
Ниталиева С.Ж. – 89
Новикова Л.И. – 138

О

Обертинская О.В. – 42
Оленькова О.М. – 87
Орехов А.Н. – 109
Орлова К.А. – 44, 46
Оседко А.В. – 108
Оседко О.Я. – 108
Осипенкова О.В. – 141
Остапович В.В. – 93
Охапкина Е.А. – 71
Очкасова Ю.В. – 62

П

Паткин Е.Л. – 113
Паянкова А.А. – 58
Перевозчиков А.Б. – 105
Перепечина И.О. – 116
Писарева М.М. – 58
Пицик Е.В. – 113
Пиянзин А.И. – 50
Платонов А.Е. – 82, 87
Платонов М.Е. – 93
Поздеев В.К. – 71
Помазной М. Ю. – 120
Постнов А.Ю. – 109
Пудова Е.А. – 51, 95

Р

Рачина С.А. – 67
Романенко В.В. – 87
Романов С.В. – 138
Романова Ю.Р. – 71
Романовская-Романько Е.А. – 58, 71
Романюк Т.Н. – 51, 54
Рубина А.Ю. – 144
Русакова Н.М. – 82
Рыбина Е.В. – 54
Рыжих П.Г. – 35, 37

С

Савичева А.М. – 54
Сазонова М.А. – 109
Самборская И.Ф. – 42
Сапкина М.Р. – 50
Сафонова А.П. – 51
Сафронов П.Ф. – 7, 14
Сбитнева Н.Н. – 87
Сивак В.П. – 11
Сивков А.Ю. – 120
Сидина Е.И. – 132, 144
Сильвейстрова О.Ю. – 51
Скачкова Т.С. – 51, 54
Скобло Л.Е. – 44, 46
Скороходова Т.Г. – 138
Скрябин К.Г. – 137
Смирнова М.С. – 80, 149
Собенин И.А. – 109
Соловьев К.В. – 113
Сорокина В.Б. – 62
Скрынник С.М. – 62
Слита А.В. – 58
Соловьев С.А. – 42
Соловьев П.В. – 95
Сперанская Е.В. – 44, 46
Спиридонова Н.А. – 105
Ставский Е.А. – 7, 14
Стукова М.А. – 58, 71
Сучкова И.О. – 113

Т

Татьков С. И. – 120
Ткаченко Г.А. – 82
Топоркова М.Г. – 87
Тотменин А.В. – 7, 14
Трохименко Е.П. – 42
Тупиков В.А. – 151

У

Унагаева Н.В. – 7, 14

Ф

Федорова М.В. – 82, 89
Фейзханова Г.У. – 144
Филатова Е.В. – 105
Филиппова М.А. – 144

Х

Хасанова З.Б. – 109
Ходякова И.А. – 62
Хок М.М. – 89

Ч

Чеканова Т.А. – 51, 95
Чемерис О.Л. – 61
Черневская О.М. – 44, 46
Черноусова Н.Я. – 7, 14
Чиркова Е.В.2 – 93
Чуланов В.П. – 17

Ш

Шакарян А.К. – 75
Шаль Е.П. – 67
Шалунова Н.В. – 105
Шемякин И.Г. – 95
Шепеляковская А.О. – 128, 144
Шибаета А.В. – 80, 141, 149
Шипицына Е.В. – 54
Шипулин Г.А. – 35, 37, 51, 54, 82, 95
Шипулина О.Ю. – 51, 54
Шишкина Л.В. – 82
Шматко Г.П. – 61
Шопенская Т.А. – 82
Шульга А.А. – 137
Шурыгина А.-П.С. – 71

Щ

Щукина И.А. – 62

Я

Ямалтдинова Т.А. – 113
Яковенко М.Л. – 75
Яцышина С.Б. – 62, 67, 95

ОГЛАВЛЕНИЕ

Раздел 1. ВИЧ И ВИЧ-АССОЦИИРОВАННЫЕ ИНФЕКЦИИ

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ИЗОЛЯТОВ CRF02_AG ВИЧ-1, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ

Гашникова Н.М., Тотменин А.В., Сафронов П.Ф., Богачев В.В.,
Барышев П.Б., Никонорова Ю.В., Унагаева Н.В., Лаптева Т.А.,
Мещерякова Ю.В., Черноусова Н.Я., Ставский Е.А.7

РАЗРАБОТКА И ВНЕДРЕНИЕ В ЛАБОРАТОРНУЮ ПРАКТИКУ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ АЛЛЕЛИ HLA В*5701 ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ С ЦЕЛЬЮ ИСКЛЮЧЕНИЯ СЛУЧАЕВ ВОЗНИКНОВЕНИЯ РЕАКЦИИ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ АБАКАВИР-СОДЕРЖАЩЕЙ ТЕРАПИИ

Киреев Д.Е., Куевда Д.А.8

НЕКОТОРЫЕ ВОПРОСЫ ДИАГНОСТИКИ, ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ ОНКОЗАБОЛЕВАНИЙ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ОСУЖДЕННЫХ

Кусая В.В., Сивак В.П.11

СОЗДАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ СОВРЕМЕННЫХ, ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ДЛЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ИЗОЛЯТОВ ВИЧ-1

Никонорова Ю.В., Сафронов П.Ф., Унагаева Н.В., Лаптева Т.А.,
Богачев В.В., Барышев П.Б., Тотменин А.В., Мещерякова Ю.В.,
Черноусова Н.Я., Ставский Е.А., Гашникова Н.М.14

Раздел 2. ВИРУСНЫЕ ГЕПАТИТЫ

РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ РНК ВИРУСА ГЕПАТИТА А (HAV) МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ (ПЦР) С ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ «АМПЛИСЕНС® HAV-FL»

Карандашова И.В., Неверов А.Д., Долгин В.А., Чуланов В.П.17

РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОДНОВРЕМЕННОГО ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК HBV И РНК HDV В КЛИНИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

Коновалов А.С., Карандашова И.В., Куевда Д.А.20

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ИЗОЛЯТОВ ВГВ В РАМКАХ РАЗРАБОТКИ РОССИЙСКОЙ РЕФЕРЕНС ПАНЕЛИ СЫВОРОТОК HBSAG

Максютов Р.А., Гаврилова Е.В., Канев А.Н.24

Раздел 3. ТУБЕРКУЛЕЗ

ОСОБЕННОСТИ АПОПТОЗА ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ПРИ ДЕЙСТВИИ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЁЗНЫХ ПРЕПАРАТОВ ОСНОВНОГО РЯДА IN VITRO

Васильева О.А. 28

Раздел 4. ВИРУСЫ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА И РШМ

ВЫЯВЛЕНИЕ ВПЧ ВЫСОКОГО КАНЦЕРОГЕННОГО РИСКА У ЖЕНЩИН РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА

Андосова Л.Д., Конторщикова К.Н., Куделькина С.Ю., Михалева О.В., Блатова О.Л. 32

Раздел 5. ИНФЕКЦИИ ОРГАНОВ РЕПРОДУКЦИИ

ВЫЯВЛЕНИЕ МУТАЦИЙ УСТОЙЧИВОСТИ MYCOPLASMA GENITALIUM К МАКРОЛИДАМ В ПРОЦЕССЕ ЛЕЧЕНИЯ ДЖОЗАМИЦИНОМ ПАЦИЕНТОВ С УРЕТРИТОМ

Гущин А.Е., Рыжих П.Г., Гомберг М.А., Бурцев О.А., Шипулин Г.А. 35

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ TRICHOMONAS VAGINALIS НА ОСНОВЕ ТЕХНОЛОГИИ НАСБА В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Рыжих П.Г., Гущин А.Е., Шипулин Г.А. 37

Раздел 6. ИНФЕКЦИИ С ФЕКАЛЬНО-ОРАЛЬНЫМ МЕХАНИЗМОМ ПЕРЕДАЧИ

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ В ИЗУЧЕНИИ ЦИРКУЛЯЦИИ РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОТИПОВ РОТАВИРУСОВ СРЕДИ ДЕТЕЙ В УКРАИНЕ

Дзюблик И.В., Обертинская О.В., Соловьев С.А., Костенко И.Г., Трохименко Е.П., Вороненко С.Г., Ковалишин Г.Г., Ковалюк О.В., Самборская И.Ф., Жеребко Н.Н. 42

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ HELICOBACTER PYLORI К МАКРОЛИДАМ МЕТОДОМ ПЦР

Махова М.А., Мазепа В.Н., Бруснигина Н.Ф., Черневская О.М., Орлова К.А., Сперанская Е.В., Барышева Н.Н., Скобло Л.Е., Кленина Н.Н., Бокарев А.А. 44

ВЫЯВЛЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОППОРТУНИСТИЧЕСКИХ ИНФЕКЦИЙ У ДЕТЕЙ С ПАТОЛОГИЕЙ ТОНКОГО КИШЕЧНИКА

Орлова К.А., Мазепа В.Н., Бруснигина Н.Ф., Черневская О.М., Сперанская Е.В., Скобло Л.Е., Махова М.А., Кленина Н.Н., Барышева Н.Н., Глушкова О.А. 46

Раздел 7. ИНФЕКЦИИ БЕРЕМЕННЫХ И НОВОРОЖДЕННЫХ

ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСА У НОВОРОЖДЕННЫХ В СТАЦИОНАРЕ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Сапкина М.Р., Пиянзин А.И., Зайцев И.Ф., Акинина З.Ф.,
Лукошкина О.А., Назарова Р.В., Миллер Ю.В., Мухортова О.А.,
Калина Е.В., Жукова Е.Н., Воробьева Е.Н. 50

РАЗРАБОТКА ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ В ФОРМАТЕ ИММУНОЧИПА ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ И МОНИТОРИНГА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ВНУТРИУТРОБНЫХ ИНФЕКЦИЙ, ОБЪЕДИНЕННЫХ В ГРУППУ TORCH

Чеканова Т.А., Пудова Е.А., Маркелов М.Л., Кирдяшкина Н.П.,
Гоптарь И.А., Шипулина О.Ю., Сафонова А.П., Скачкова Т.С.,
Сильвейстрова О.Ю., Романюк Т.Н., Кузницова С.В., Алексеева Ю.А.,
Андрюшина Т.Ю., Манзенюк И.Н., Шипулин Г.А. 51

КЛИНИЧЕСКАЯ АПРОБАЦИЯ НОВОГО ТЕСТА НА ОСНОВЕ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ СТРЕПТОКОККОВ ГРУППЫ В У БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН И НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ

Шипицына Е.В., Будиловская О. В., Золотоверхая Е.А.,
Зациорская С.Л., Рыбина Е.В., Шипулина О.Ю., Скачкова Т.С.,
Романюк Т.Н., Шипулин Г.А., Савичева А.М. 54

Раздел 8. ИНФЕКЦИИ ВЕРХНИХ И НИЖНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

ДИАГНОСТИКА И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВИРУСА ГРИППА А/Н1N1V В РОССИИ

Грудинин М.П., Комиссаров А.Б., Елпаева Е.А., Писарева М.М.,
Бузицкая Ж.В., Паянкова А.А., Романовская-Романько Е.А.,
Слита А.В., Стукова М.А. 58

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА КОКЛЮШНОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ БРОНХИТОМ

Маврутенков В.В., Братусь И.В., Маврутенкова Т.В., Чемерис О.Л.,
Дикленко Т.В., Шматко Г.П., Винокурова И.С. 61

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ОРНИТОЗА

Миненко А.Н., Яцышина С.Б., Карпов А.М., Скрынник С.М.,
Сорокина В.Б., Ходякова И.А., Очкасова Ю.В., Щукина И.А.,
Зубченок Н.В., Кудрявцева А.В., Браславская С.И. 62

СТРУКТУРА БАКТЕРИАЛЬНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИИ (ВП) В МНОГОПРОФИЛЬНЫХ СТАЦИОНАРАХ Г. СМОЛЕНСКА

Рачина С.А., Козлов Р.С., Шаль Е.П., Кречикова О.И., Иванчик Н.В.,
Асафьева О.Ю., Гучев И.А., Гуляева С.А., Бурдинская Ю.В.,
Яцышина С.Б., Астахова Т.С., Бейкин Я.Б. 67

ВАКЦИНЫ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ: КЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПАНДЕМИЧЕСКОЙ H5N1 DELNS1 ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ

- Шурьгина А.-П.С., Стукова М.А., Ерофеева М.К., Охапкина Е.А.,
 Максакова В.Л., Поздеев В.К., Романовская-Романько Е.А.,
 Войцеховская Е.М., Вакин В.С., Васильева А.А., Кривицкая В.З.,
 Романова Ю.Р., Егоров А.Ю., Киселев О.И. 71

Раздел 9. НЕЙРОИНФЕКЦИИ

ВСПЫШКА ПОЛИОМИЕЛИТА В ТАДЖИКИСТАНЕ В 2010 Г., ВЫЗВАННАЯ ДИКИМ ПОЛИОВИРУСОМ СЕРОТИПА1

- Яковенко М.Л., Иванова О.Е., Гмыль А.П., Еремеева Т.П., Иванов А.П.,
 Байкова О.Ю., Исаева О.В., Гаврилин Е.В., Мартин Р., Михайлов М.И.,
 Шакарян А.К., Липская Г.Ю., Кью О., Вассиляк С., Дешпанде Ж.,
 Агол В.И. 75

Раздел 10. ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫЕ ИНФЕКЦИИ

АНАЛИЗ ИНФЕКЦИЙ, ПЕРЕНОСИМЫХ КЛЕЩАМИ, В ПРИРОДНЫХ ОЧАГАХ ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ

- Гришечкин А.Е., Морозова О.В., Конькова-Рейдман А.Б., Злобин В.И. ... 78

НОВЫЙ ПРОДУЦЕНТ БЕЛКА-АНТИГЕНА ВНЕШНЕЙ ОБОЛОЧКИ ХАНТАВИРУСА ДОБРАВА НА ОСНОВЕ ДРОЖЖЕЙ YARROWIA LIPOLYTICA

- Гусева М.А., Смирнова М.С., Баловнева М.В., Шибаева А.В.,
 Зарипова Р.С., Белоусова Ж.В., Валиуллин Л.Ф., Мальшева Е.В.,
 Дудорова М.Г., Елагина Е.М., Леонович О.А. 80

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВСПЫШЕК, ВЫЗВАННЫХ ВИРУСОМ ЛИХОРАДКИ ЗАПАДНОГО НИЛА В ВОЛГОГРАДСКОЙ И РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТЯХ

- Карань Л.С., Шопенская Т.А., Федорова М.В., Колясникова Н.М.,
 Платонов А.Е., Шипулин Г.А., Русакова Н.М., Шишкина Л.В.,
 Ткаченко Г.А., Говорухина М.В., Мазрухо Т.В., Валенцева А.А.,
 Найда Е.А., Клиновая Е.П. 82

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИЙ, ПЕРЕДАЮЩИХСЯ ИКСОДОВЫМИ КЛЕЩАМИ, НА ОСНОВЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

- Колясникова Н.М., Карань Л.С., Топоркова М.Г., Махнева М.А.,
 Надеждина М.В., Есаулкова А.Ю., Романенко В.В., Сбитнева Н.Н.,
 Оленькова О.М., Платонов А.Е. 87

РАЗРАБОТКА И ПРИМЕНЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В ОБЛАСТИ ДИАГНОСТИКИ КОКСИЕЛЛЕЗА

- Лазарева Е.Н., Федорова М.В., Карань Л.С., Колясникова Н.М.,
 Ниталиева С.Ж., Малеев В.В., Галимзянов Х.М., Буркин А.В.,
 Хок М.М., Бабаева М.А. 89

Раздел 11. ОСОБО ОПАСНЫЕ ИНФЕКЦИИ

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* МЕТОДОМ DFR

- Ефременко Д.В., Кузнецова И.В., Остапович В.В., Жаринова Н.В.,
Платонов М.Е., Евсева В.В., Чиркова Е.В., Гапельченкова Т.В.,
Дентовская С.В., Анисимов А.П., Куличенко А.Н. 93

РАЗРАБОТКА И ЛАБОРАТОРНЫЕ ИСПЫТАНИЯ МЕТОДОВ ЭКСПРЕССНОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСОБО ОПАСНЫХ ВИРУСНЫХ И БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ НА ОСНОВЕ МИКРОЧИПОВОЙ ТЕХНОЛОГИИ

- Маркелов М.Л., Чеканова Т.А., Пудова Е.А., Дедков В.Г., Карань Л.С.,
Яцьшина С.Б., Кузницова С.В., Зацепин Т.С., Шемякин И.Г.,
Бикетов С.Ф., Соловьев П.В., Шипулин Г.А. 95

Раздел 12. ИНФЕКЦИИ В ТРАНСФУЗИОЛОГИИ И ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ

ОРГАНИЗАЦИЯ ВХОДНОГО КОНТРОЛЯ НА ВИРУСНУЮ БЕЗОПАСНОСТЬ СЫРЬЯ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ЛЕЧЕБНЫХ ПРЕПАРАТОВ ИЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ ДОНОРОВ

- Филатова Е.В., Зубкова Н.В., Горлова И.С., Спиридонова Н.А.,
Казьянин А.В., Перевозчиков А.Б., Волкова Р.А., Воробьева М.С.,
Лаптева Л.К., Шалунова Н.В. 105

Раздел 13. МЕДИЦИНСКАЯ ГЕНЕТИКА

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ЛИПОПРОТЕИНАСЫ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ ФОРМОЙ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА

- Оседко О.Я., Говорун В.М., Котловский М.Ю., Котловский Ю.В.,
Оседко А.В., Ковалева О.А. 108

ДЕТЕКЦИЯ МУТАЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА ЧЕЛОВЕКА 6521NSG ПРИ АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ ПОРАЖЕНИЯХ СОСУДОВ ЧЕЛОВЕКА

- Сазонова М.А., Иванова М.М., Желанкин А.В., Митрофанов К.Ю.,
Хасанова З.Б., Собенин И.А., Мясоедова В.А., Постнов А.Ю.,
Орехов А.Н. 109

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МИНИСАТЕЛЛИТНЫХ ПОВТОРОВ ДНК *V2-VNTR* И *5-HTTLPR* ПРИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

- Сучкова И.О., Ямалтдинова Т.А., Гриневич Е.Е., Пицик Е.В.,
Соловьев К.В., Аленина Н.В., Глотов А.С., Бадер М., Баранов В.С.,
Денисенко А.Д., Паткин Е.Л. 113

Раздел 14. КРИМИНАЛИСТИКА И СУДЕБНАЯ МЕДИЦИНА

МАССОВЫЕ ДНК-СКРИНИНГИ НАСЕЛЕНИЯ: ЗА И ПРОТИВ

Перепечина И.О..... 116

Раздел 15. ГЕОГЕЛЬМИНТОЗЫ, ПАРАЗИТАРНЫЕ И ТРОПИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

ПОИСК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ МИШЕНЕЙ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ПАРАЗИТА OPISTHORCHIS FELINEUS

Помазной М. Ю., Татъков С. И., Брусенцов И. И., Сивков А.Ю.,
Наякшин А.М., Гусельников С.В., Бреннер Е.В., Васильев Г.В.,
Катохин А.В., Мордвинов В.А..... 120

Раздел 16. ВЕТЕРИНАРИЯ

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ МЕТОДОМ ПЦР С ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Астахова Т.С., Козлова А.Д..... 123

ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ ПАРВОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ СВИНЕЙ

Козлова А.Д., Астахова Т.С..... 125

РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЦИРКОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ СВИНЕЙ 2 ТИПА МЕТОДОМ ПЦР С ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ

Козлова А.Д., Астахова Т.С..... 128

Раздел 17. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА И БЕЗОПАСНОСТИ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ

ЭКСПРЕСС-МЕТОД АНАЛИЗА СТАФИЛОКОККОВОГО ЭНТЕРОТОКСИНА В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ

Любавина И.А., Шепеляковская А.О., Бровко Ф.А., Зинченко А.А.,
Сидина Е.И., Бозиев Х.М., Ламан А.Г., Вертиев Ю.В., Гришин Е.В. 132

Раздел 18. НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

РЕКОМБИНАНТНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ, СОПРЯЖЕННЫЕ С G-БЕЛКОМ, КАК ОСНОВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ НАНОДЕТЕКТОРОВ

Герасимов А.С., Шульга А.А., Зейналов О.А., Скрябин К.Г. 137

НОВОЕ НАПРАВЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ – ИММУНОФЕРМЕНТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ КОМПОНЕНТОВ КЛАССИЧЕСКОГО И АЛЬТЕРНАТИВНОГО ПУТЕЙ КОМПЛЕМЕНТА

Козлов Л.В., Алёшкин В.А., Андина С.С., Баталова Т.Н., Бичучер А.М., Гора Н.В., Гузова В.А., Дьяков В.Л., Колесникова Е.А., Лахтин В.М., Лахтин М.В., Матвеевская Н.С., Новикова Л.И., Романов С.В., Скороходова Т.Г. 138

НОВЫЙ МЕТОД ОДНОСТАДИЙНОЙ ДЕТЕКЦИИ АНТИГЕН-АНТИТЕЛЬНОГО СВЯЗЫВАНИЯ

Маракасова Е.С., Шибаева А.В., Белоусова Ж.В., Валиуллин Л.Ф., Малышева Е.В., Дудорова М.Г., Осипенкова О.В., Гусева М.А., Елагина Е.М. 141

МЕТОД ОДНОВРЕМЕННОГО КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИММУНОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА СЕМИ ЭНТЕРОТОКСИНОВ СТАФИЛОКОККОВ НА ГИДРОГЕЛЕВОМ БИОЧИПЕ

Филиппова М.А., Рубина А.Ю., Фейзханова Г.У., Шепеляковсея А.О., Сидина Е.И., Бозиев Х.М., Ламан А.Г., Бровко Ф.А., Вертиев Ю.В., Заседателев А.С., Гришин Е.В. 144

Раздел 19. ДРУГОЕ

ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ КАК НОВЫЙ МЕТОД ДЕТЕКЦИИ ОСТАТОЧНОЙ ДНК КЛЕТОК VERO В ПРЕПАРАТАХ ВИРУСОВ ВАКЦИННОГО НАЗНАЧЕНИЯ

Смирнова М.С., Баловнева М.В., Шибаева А.В., Зарипова Р.С., Белоусова Ж.В., Валиуллин Л.Ф., Малышева Е.В., Дудорова М.Г., Гусева М.А., Елагина Е.М. 149

ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО И ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА У БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН С РАЗЛИЧНЫМИ ФОРМАМИ ВПГ I, II ИНФЕКЦИИ

Тупиков В.А., Гафурова Д.Н. 152

ИМЕННОЙ УКАЗАТЕЛЬ 156

**VII Всероссийская научно-практическая конференция
с международным участием**

«МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА – 2010»

СБОРНИК ТРУДОВ

Под редакцией академика РАМН В.И. Покровского

V ТОМ

Подписано в печать 24.02.2011

Отпечатано с оригинал-макета в ООО «Рекламное Агентство «ЭйВиДжи».

105082, РФ, г. Москва,

ул. Малая Почтовая, д. 12, стр. 5, www.avisiongroup.ru

Формат 60x90/16. Бумага офсетная. Печать цифровая.

Усл. печ. л. 10,5. Тираж 100 экз.