

ОАО «ИЗДАТЕЛЬСТВО
"МЕДИЦИНА"»

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

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

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

Д КЛИНИЧЕСКАЯ Том 65 ЛАБОРАТОРНАЯ 12 • 2020 И А Г Н О С Т И К А

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

декабрь

Журнал основан в январе 1955 г.

Почтовый адрес

ОАО «Издательство "Медицина"»
115088, Москва, Новоостроповская ул.,
д. 5, строение 14

Телефон редакции:

8-495-430-03-63,

E-mail: clin.lab@yandex.ru

Зав. редакцией Л.А. Шанкина

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

Художественный редактор

Е.М. Архипова

Сдано в набор 10.12.2020.

Подписано в печать 25.12.2020. Формат

60 × 88%.

Печать офсетная.

Печ. л. 8,00

Уч.-изд. л. 9,67.

E-mail: oao-meditsina@mail.ru

WWW страница: www.medlit.ru

ЛР N 010215 от 29.04.97 г.

Все права защищены. Ни одна часть этого издania не может быть занесена в память компьютера либо воспроизведена любым способом без предварительного письменного разрешения издателя.

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

Индекс 71442 — для подписчиков

Подписка через Интернет: www.aks.ru,

www.pressa-ef.ru

Подписка на электронную версию:

elibrary.ru

ISSN 0869-2084. Клини. лаб. диагностика.
2020. № 12. 665–728.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор А.Ю. МИРОНОВ

А.Б. ДОБРОВОЛЬСКИЙ, В.В. ДОЛГОВ, Г.Н. ЗУБРИХИНА, А.А. ИВАНОВ, С.А. ЛУГОВСКАЯ, С.Г. МАРДАНЛЫ, В.Т. МОРОЗОВА, Л.М. СКУИНЫ, А.А. ТОТОЛЯН, Г.Г. ХАРСЕЕВА (ответственный секретарь), И.П. ШАБАЛОВА

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

А.Н. АРИПОВ (Ташкент), Т.В. ВАВИЛОВА (Санкт-Петербург), I. WATSON (Великобритания, Ливерпуль), А.Ж. ГИЛЬМАНОВ (Уфа), Д.А. ГРИЩЕНКО (Красноярск), В.С. ГУДУМАК (Кишинёв), Н.Г. ДАШКОВА (Москва), В.А. ДЕЕВ (Киев), Т.И. ДОЛГИХ (Омск), С.А. ЕЛЪЧАНИНОВА (Барнаул), А.В. ИНДУТНЫЙ (Омск), А. KALLNER (Швеция, Стокгольм), А.И. КАРПИЩЕНКО (Санкт-Петербург), К.П. КАШКИН (Москва), А.В. КОЗЛОВ (Санкт-Петербург), В.Г. КОЛБ (Минск), Г.В. КОРШУНОВ (Саратов), Г.М. КОСТИН (Минск), А.Г. КОЧЕТОВ (Москва), Н.Е. КУШЛИНСКИЙ (Москва), Г.Г. ЛУНЕВА (Киев), А.Р. МАВЗЮТОВ (Уфа), В.Н. МАЛАХОВ (Москва), Д.Д. МЕНЬШИКОВ (Москва), Е.Н. ОВАНЕСОВ (Москва), Ю.В. ПЕРВУШИН (Ставрополь), И.В. ПИКАЛОВ (Новосибирск), Ю.П. РЕЗНИКОВ (Москва), Д.Б. САПРЫГИН (Москва), С.Н. СУПЛОТОВ (Тюмень), О.А. ТАРАСЕНКО (Москва), И.С. ТАРТАКОВСКИЙ (Москва), А.Б. УТЕШЕВ (Алматы), Л.А. ХОРОВСКАЯ (Санкт-Петербург), С.В. ЦВИРЕНКО (Екатеринбург), А.Н. ШИБАНОВ (Москва), В.Л. ЭМАНУЭЛЬ (Санкт-Петербург), Г.А. ЯРОВАЯ (Москва)



«Издательство "МЕДИЦИНА"»

ОАО ИЗДАТЕЛ'СТВО
"МЕДИЦИНА"

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

D KLINICHESKAYA LABORATORNAYA diagnostika

Volume 65
12 • 2020

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

december

The Journal is founded in 1955.

Mailing address:
Izdatelstvo "MEDITSINA"

115088, Moscow
Novoostapovskaya str., 5, building 14

Editorial office phone:
8-495-430-03-63,

E-mail: clin.lab@yandex.ru

Managing editor L.A. Shankina

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

Art editor *E.M. Arkhipova*

E-mail: oao-meditsina@mail.ru

WWW page: www.medlit.ru

LR № 010215 of 29.04.1997

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

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

ISSN 0869-2084.

EDITOR BOARD:

Editor-in-Chief A.Yu. MIRONOV

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

EDITORIAL COUNCIL:

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



ИЗДАТЕЛ'СТВО "МЕДИЦИНА"

СОДЕРЖАНИЕ

БИОХИМИЯ

Попова И.Г., Ситникова О.Г., Назаров С.Б., Садов Р.И., Панова И.А., Кузьменко Г.Н., Клычева М.М., Веселкова Ю.Н.
Оценка окислительного стресса и антиоксидантной активности у женщин с умеренной и тяжелой преэклампсией в III триместре беременности и их новорожденных 733

Оруджева И.Н., Азизова Г.И., Гафаров И.А., Оруджев А.Г.
Изучение корреляционных связей между некоторыми биохимическими показателями и параметрами лучевой диагностики при раке молочной железы 738

КОАГУЛОЛОГИЯ

Преснякова М.В., Галова Е.А., Соснина Л.Н., Поповичева А.Н., Любавина Н.А., Костина О.В., Куз Карякин Н.Н.
Нарушения системы гемостаза и выраженность воспалительной реакции у пациентов с новой коронавирусной пневмонией 744

ОБЩЕКЛИНИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Тимашева Г.В., Валеева Э.Т., Масыгутова Л.М., Каримова Л.К., Бакиров А.Б., Репина Э.Ф.
Ранние диагностические и прогностические критерии нарушения здоровья у работников химического комплекса 750

МИКРОБИОЛОГИЯ

Андрюков Б.Г., Ляпун И.Н.
Лабораторные стратегии диагностики COVID-19: современные техно 757

Кимирилова О. Г., Харченко Г. А.
Клиническая значимость методов лабораторной диагностики кок 767

Боронина Л.Г., Саматова Е.В., Кукушкина М.П., Блинова С.М., Панова С.А., Устюгова С.С.
Поиск оптимального алгоритма тестирования и характеристика карбапенемаз у нозокомиальных штаммов 771

ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

Пискунов Д. П., Данилова Л. А., Пушкин А. С., Рукавишников С. А.
Влияние экзогенных и эндо 778

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Терновой В.А., Лутковский Р.Ю., Пономарева Е.П., Гладышева А.В., Чуб Е.В., Тупота Н.Л., Смирнова А.М., Назаренко А.А., Локтев В.Б., Гаврилова Е.В., Агафонов А.П., Максюттов Р.А.
Обнаружение РНК SARS-CoV-2 в носоглоточных мазках больных COVID-19 и бессимптомных носителей методами цифровой ПЦР и ПЦР в реальном времени 785

Тороповский А.Н., Павлова О.Н., Викторов Д.А., Никитин А.Г., Масляков В.В.
Результаты испытания набора реагентов тест-KRAS-ткань in vitro для определения показаний к таргетной терапии у пациентов с диагнозом колоректальный рак 793

CONTENTS

BIOCHEMISTRY

Popova I.G., Sitnikova O.G., Nazarov S.B., Sadov R.I., Panova I.A., Kuzmenko G.N., Klycheva M.M., Veselkova YU.N. **Evaluation of oxidative stress and antioxidant activity in women with moderate and severe preeclampsia in the third tri and their newborns.** *Klinicheskay* 733

Orujova I.N., Azizova G.I., Gafarov I.A., Orujov A.H.
Study of correlation between biochemical indicators and radiological diagnostic parameters of breast cancer 738

COAGULOLOGY

Presnyakova M.V., Galova E.A., Sosnina L.N., Popovicheva A.N., Lybavina N.A., Kuznetsova V.L., Karyakin N.N.
Disturbances of the hemostasis system and expression of inflammatory reaction in patients with new coronavirus pneumonia 744

GENERAL CLINICAL METHODS

Timasheva G.V., Valeeva E.T., Masyagutova L.M., Karimova L.K., Bakirov A. B., Repina E.F.
Early diagnostic and prognostic criteria for health disorders in chemical workers 750

MICROBIOLOGY

Andryukov B. G., Lyapun I. N.
COVID-19 diagnostic laboratory strategies: modern technologies and develop 757

Kimirilova O. G., Kharchenko G. A.
Clinical significance of laboratory diagnostics of coxyellosis in children 767

Boronina L.G., Samatova E.V., Kukushkina M.P., Blinova S.M., Panova S.A., Ustyugova S.S.
Search for an optimal test algorithm and characteristic of carbapenemases in nosocomial strains 771

ORGANIZATION OF LABORATORY SERVICE

Piskunov D.P., Danilova L.A., Pushkin A. S., Rukavishnikova S. A.
Influence of exogenous and endogenous factors on the quality of the preanalytical stage of laboratory tests(review of literature) 778

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

Ternovoi V.A., Lutkovsky R.Yu., Ponomareva E.P., Gladysheva A.V., Chub E.V., Tupota N.L., Smirnova A.M., Nazarenko A.A., Loktev V.B., Gavrilova E.V., Agafonov A .P., Maksyutov R.A.
Detection of SARS-CoV-2 RNA in nasopha real-time and digital PCR 785

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

Toropovskiy A.N., Pavlova O.N., Viktorov D.A., Nikitin A.G. Maslyakov V.V.
Results of in vitro test-KRAS□tissue reagent kit test to determine indications for target therapy of patients diagnosed with colorectal cancer 793

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Попова И.Г., Ситникова О.Г., Назаров С.Б., Садов Р.И., Панова И.А., Кузьменко Г.Н., Клычева М.М., Веселкова Ю.Н.

ОЦЕНКА ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ У ЖЕНЩИН С УМЕРЕННОЙ И ТЯЖЕЛОЙ ПРЕЭКЛАМПСИЕЙ В III ТРИМЕСТРЕ БЕРЕМЕННОСТИ И ИХ НОВОРОЖДЕННЫХ

ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства им. В.Н. Городкова» Минздрава РФ, 153045, Иваново, Россия

Обследовали 66 женщин в сроке беременности 22-40 недель и родившихся у них новорожденных. Из них 15 женщин с умеренной преэклампсией (ПЭ) составили 1 группу, 22 женщины с тяжелой ПЭ – 2 группу и 55 женщин с неосложненным течением беременности без гипертензивных расстройств – контрольную группу. Забор крови у женщин проводился при поступлении в клинику, у новорожденных кровь забирали на 3-5 сутки жизни. Проводили оценку свободнорадикального окисления и антиоксидантной активности методом индуцированной хемилюминесценции. Выявлено, что у пациенток с тяжелой и умеренной преэклампсией развитие окислительного стресса сопровождается ослаблением антиоксидантной активности. У новорожденных, родившихся у матерей с преэклампсией, при окислительном стрессе отмечается компенсаторное повышение антиоксидантной активности.

Ключевые слова: беременность; новорожденные; преэклампсия; свободнорадикальное окисление; антиоксидантная активность; хемилюминесценция; окислительный стресс.

Для цитирования: Попова И.Г., Ситникова О.Г., Назаров С.Б., Садов Р.И., Панова И.А., Кузьменко Г.Н., Клычева М.М., Веселкова Ю.Н. Оценка окислительного стресса и антиоксидантной активности у женщин с умеренной и тяжелой преэклампсией в III триместре беременности и их новорожденных. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65(12): 733-737. DOI:<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-12-733-737>

Popova I.G., Sitnikova O.G., Nazarov S.B., Sadov R.I., Panova I.A., Kuzmenko G.N., Klycheva M.M., Veselkova Yu.N.

EVALUATION OF OXIDATIVE STRESS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY IN WOMEN WITH MODERATE AND SEVERE PREECLAMPSIA IN THE THIRD TRIMESTER OF PREGNANCY AND THEIR NEWBORNS

Ivanovo Research Institute of Maternity and Childhood named after V.N. Gorodkov, 153045, Ivanovo, Russia

We examined 66 women who were 22-40 weeks pregnant and their newborns. Of these, 15 women with moderate PE were in group 1, 22 women with severe PE were in group 2, and 55 women with uncomplicated pregnancy without hypertensive disorders were in the control group. Blood was taken from women when they were admitted to the clinic, and newborns' blood was taken for 3-5 days of life. Free radical oxidation and antioxidant activity were evaluated by induced chemiluminescence. It was found that in patients with severe and moderate preeclampsia, the development of oxidative stress is accompanied by a weakening of antioxidant activity. In newborns born to mothers with preeclampsia, oxidative stress is accompanied by a compensatory increase in antioxidant activity.

Key words: pregnancy; newborns; preeclampsia; free radical oxidation; antioxidant activity; chemiluminescence; oxidative stress.

For citation: Popova I.G., Sitnikova O.G., Nazarov S.B., Sadov R.I., Panova I.A., Kuzmenko G.N., Klycheva M.M., Veselkova YU.N. Evaluation of oxidative stress and antioxidant activity in women with moderate and severe preeclampsia in the third trimester of pregnancy and their newborns. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65(12) 733-737 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-733-737>

For correspondence: *Popova Irina Gennadievna*, candidate of medical sciences, researcher of laboratory of clinical biochemistry and genetics; e-mail: i_g_popova@mail.ru

Information about authors:

Popova I.G., <http://orcid.org/0000-0003-1836-3523>;
Sitnikova O.G., <http://orcid.org/0000-0003-2604-0724>;
Nazarov S.B., <http://orcid.org/0000-0003-1545-7655>;
Sadov R.I., <http://orcid.org/0000-0002-8776-7743>;
Panova I.A., <http://orcid.org/0000-0002-0828-6547>;
Kuzmenko G.N., <http://orcid.org/0000-0001-5772-9271>;
Klycheva M.M., <http://orcid.org/0000-0002-1725-8505>;
Veselkova Yu.N., <https://orcid.org/0000-0002-7485-1903>.

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

Acknowledgment. *The study is supported by RFBR grant № 18-415-370002.*

Received 18.06.2020
Accepted 10.07.2020

Введение. Преэклампсия (ПЭ) – одно из самых частых и грозных осложнений беременности и родов, которое занимает ведущее место в структуре материнской и перинатальной заболеваемости и смертности [1-4]. Согласно наиболее признанной гипотезе, причиной развития ПЭ является нарушение процессов формирования плаценты в самые ранние сроки гестации [5]. В результате аномальной плацентации и нарушения перфузии, в плаценте высвобождаются факторы, вызывающие распространенную эндотелиальную дисфункцию, синдром системного воспалительного ответа, приводящие к системному окислительному стрессу (ОС) [7] и развитию полиорганной недостаточности [6] при ПЭ.

У детей, родившихся от матерей с преэклампсией, также была выявлена эндотелиальная дисфункция, которая приводит к развитию патологии периода новорожденности, а в дальнейшем к риску развития сердечно-сосудистых заболеваний [8,9].

Известно, что плацентарная ишемия способна нарушать функцию митохондрий и выработку энергии трофобластами, что может привести к высвобождению активных форм кислорода (АФК) и развитию реакции свободнорадикального окисления липидов. При дисбалансе про- и антиоксидантной систем плаценты происходит выброс в кровотоки матери гидроперекисей липидов. Обладая высокой токсичностью и реактивностью, эти продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ) повреждают эндотелий сосудов, разрушая его мембраны, что приводит к нарушению нормального метаболизма на клеточном и органном уровнях [10-12].

В работе А.М. Минасян и соавт. [13] показано, что у женщин с преэклампсией разной степени тяжести и без ПЭ, беременность у которых протекала на фоне хронического пиелонефрита в стадии ремиссии, высокое содержание в крови вторичных продуктов ПОЛ сопровождалось разнонаправленным изменением активности антиоксидантной защиты. Отмечено, что у пациенток без ПЭ и при умеренной ПЭ повышение ПОЛ сопровождалось повышением антиоксидантной активности (АОА), а при тяжелой ПЭ снижением АОА.

Однако, в современной литературе процессы свободнорадикального окисления липидов, антиоксидантной защиты у беременных с преэклампсией разной степени тяжести и их новорожденных детей освещены недостаточно полно.

Цель работы - оценка окислительного стресса и антиоксидантной активности у беременных с преэклампсией разной степени тяжести в III триместре беременности и их новорожденных.

Материал и методы. Проводили клинико-лабораторное обследование 66 женщин в сроке беременности 22-40 нед и их новорожденных. Из них 15 женщин с умеренной ПЭ составили 1 группу, 22 женщины с тяжелой ПЭ – 2 группу и 55 женщин с неосложненным течением беременности без гипертензивных расстройств – контрольную группу. У 10 детей, родившихся от матерей с умеренной ПЭ, гестационный возраст составил 32-35 нед, у 5 новорожденных – 38-41 неделя. Гестационный возраст новорожденных, родившихся у матерей с тяжелой ПЭ, составил у 20 детей – 29-35 нед, а у 12 детей – 37-39 недель. Контрольную группу составили 55 детей, родившихся у женщин без гипертензивных расстройств: из них 30 детей родились в сроке гестации от 32 до 35 нед и 25 новорожденных имели гестационный возраст от 37 до 39 недель. У новорожденных взятие крови про-

водили на 3-5 сут жизни. Пациентки, поступившие в акушерскую клинику ФГБУ «Ивановского НИИ материнства и детства им. В.Н. Городкова» Минздрава РФ, подписывали информированное согласие на обследование, включающее взятие крови у них и их новорожденных, на что имелось одобрение этического комитета.

Для оценки ОС и антиоксидантной активности был выбран метод индуцированной хемилюминесценции (ХЛ). ХЛ сопровождается свободнорадикальными реакциями ПОЛ и образование свободных радикалов, при рекомбинации которых выделяются кванты света, регистрирующиеся прибором. ХЛ сыворотки крови является высокочувствительным прямым методом, характеризующимся безопасностью, высокой скоростью и простотой выполнения. Данный метод позволяет одновременно дать оценку уровня свободных радикалов, АФК и состояния антиоксидантной системы. Исследование ХЛ проводили на биохемилуминометре «БХЛ-07» (Россия). В качестве индукторов ХЛ использовали фармакопейный препарат «Гидроперит», содержащий 34% пероксид сульфата железа II (FeSO_4) – «Sigma-Aldrich» (США). Для регистрации ХЛ в измерительную кювету биохемилуминометра вносили 0,1 мл сыворотки крови, 0,4 мл фосфатного буфера (рН 7,5), 0,4 мл раствора сульфата железа (0,05 мМ). Кювету помещали в измерительную камеру прибора. Далее вводили 0,2 мл 2% раствора пероксида водорода и регистрировали ХЛ в течение 30 секунд. Количественную оценку определения интенсивности процесса свободнорадикального окисления липидов проводили по параметрам ХЛ: I_{max} – максимальная интенсивность свечения (мВ); S – величина светосуммы (мВхсек), отражающие потенциальную способность биологического объекта к свободнорадикальному окислению. Об антиоксидантном потенциале судили по показателям ХЛ: Z – нормированная светосумма (сек); a – относительная светосумма; $\text{tg } \alpha$ – тангенс угла максимального наклона кривой ХЛ к оси времени (мВ/сек). Все параметры хемилюминесценции рассчитывались прибором автоматически.

Математическую обработку полученных данных проводили с помощью программы Statistica 10.0 («Stat-Soft»). Данные представлены в виде медианы (Me) и квартилей Q1 и Q3 в формате Me (Q1;Q3). Использовали критерии Манна-Уитни и Колмогорова-Смирнова для определения статистической значимости в случае независимых выборок и критерий Вилкоксона при парных сравнениях. Все результаты статистической обработки считали статистически значимыми при $p < 0,05$ (95% уровень статистической значимости) [14].

Результаты и обсуждение. Окислительный стресс можно определить как дисбаланс между продукцией повреждающих активных форм кислорода, свободных радикалов, других окисляющих молекул и возможностями антиоксидантной системы организма.

Показатели индуцированной хемилюминесценции беременных с тяжелой и умеренной преэклампсией представлены в табл. 1.

По данным хемилюминесцентного анализа, показатели относительной величины медианы быстрой вспышки I_{max} (мВ) у пациенток обеих групп достоверно не различались. У беременных с тяжелой и умеренной ПЭ было выявлено достоверное увеличение относительных величин медиан светосуммы свечения – S (мВхсек) по сравнению с пациентками контрольной группы (соответственно $p=0,012$; $p=0,042$). Показатель S отражает

Таблица 1

Показатели индуцированной хемилюминесценции в крови беременных женщин с преэклампсией разной степени тяжести

Признак	Контрольная группа (n=55)	1 группа умеренная ПЭ (n=15)	2 группа тяжелая ПЭ (n=22)
I max (мВ)	140 [129; 158]	150 [134,5; 172,5]	149 [138; 169]
S (мВхсек)	1786 [1532; 1890]	1939,5 [1718; 2116]	1906 [1318; 2111]
p_I		0,042	0,012
a	0,412 [0,384; 0,420]	0,428 [0,409; 0,438]	0,427 [0,408; 0,432]
p_I		0,023	0,011
Z (сек)	12,331 [11,504; 12,579]	12,820 [12,246; 13,111]	12,761 [12,188; 12,940]
p_I		0,021	0,012
tgα (мВ/сек)	23,5 [22,5; 25,5]	24 [22,875; 28,125]	23,25 [21,75; 28,5]

Примечание. n – число обследованных; p_I - достоверные отличия в сравнении с контрольной группой; данные представлены в виде медианы (Me) и квартилей Q1 и Q3 в формате Me (Q1;Q3).

Таблица 2

Показатели индуцированной хемилюминесценции в крови новорожденных, родившихся у матерей с преэклампсией разной степени тяжести

Признак	Новорожденные у матерей контрольной группы	Новорожденные от матерей с умеренной ПЭ	Новорожденные от матерей с тяжелой ПЭ
I max (мВ)	110 [98; 114]	179 [174; 195]	192 [178; 216]
p_I		0,014	0,021
S (мВхсек)	1538 [1352; 1600]	2563 [2456; 2924]	2937 [2563; 3690]
p_I		0,023	0,017
a	0,473 [0,439; 0,523]	0,469 [0,423; 0,519]	0,477 [0,423; 0,551]
Z (сек)	14,547 [14,035; 16,152]	13,982 [13,540; 14,625]	14,744 [13,851; 16,474]
tgα (мВ/сек)	15 [15; 19,5]	20,3 [19,3; 24]	20,3 [19,3; 30]
p_I		0,032	0,026

Примечание. p_I – достоверные отличия в сравнении с новорожденными от матерей без преэклампсии; данные представлены в виде медианы (Me) и квартилей Q1 и Q3 в формате Me (Q1;Q3).

содержание перекисных радикалов, соответствующих обрыву цепи свободнорадикального окисления (СРО) и позволяет дать оценку системы перекисное окисление липидов – антиоксиданты. Антиоксиданты подавляют активность свободных радикалов за счет разрыва цепей молекул в реакциях СРО и разрушения молекул перекисей [15]. У пациенток 1-й и 2-й групп отмечено достоверное повышение относительной величины показателя a (соответственно $p=0,010$ и $p=0,023$) и показателя Z (соответственно $p=0,012$ и $p=0,020$) по сравнению с женщинами контрольной группы. Повышение параметров a и Z позволяет судить о снижении АОА, что, по нашему мнению, связано с расходом эндогенных антиоксидантов, направленных на поддержание прооксидантного – антиоксидантного баланса. На основании анализа с использованием критерия Спирмена в крови женщин с тяжелой ПЭ установлены взаимосвязи между показателями ХЛ: величиной светосуммы свечения S и величинами a и Z ($r=0,99$; $p=0,001$). При умеренной ПЭ

установлена взаимосвязь между показателями ХЛ: величиной светосуммы свечения S и тангенсом угла tgα ($r=0,75$; $p=0,004$). Выявленные корреляционные зависимости между параметрами ХЛ свидетельствуют о том, что у пациенток с тяжелой и умеренной ПЭ развитие окислительного стресса сопровождается снижением антиоксидантной активности.

Показатели индуцированной хемилюминесценции у новорожденных, родившихся от матерей с тяжелой и умеренной преэклампсией, представлены в табл. 2.

У детей, рожденных у матерей с умеренной и тяжелой преэклампсией, были отмечены однонаправленные изменения параметров кинетической кривой хемилюминесценции. У детей от матерей с умеренной и тяжелой ПЭ было выявлено увеличение относительной величины медианы быстрой вспышки I max на 62 и 74% соответственно, что свидетельствует о высокой концентрации активных форм кислорода и свободных радикалов. Отмечено, что изменения относительных величин меди-

ан светосуммы свечения S в группах детей от матерей с умеренной ПЭ на 67% и тяжелой ПЭ на 91% характеризовали развитие окислительного стресса в организме ребенка.

При исследовании параметров АОА выявлено увеличение тангенса угла ($\text{tg}\alpha$) наклона кинетической кривой ХЛ на 35%, свидетельствующее о повышении АОА в обеих исследуемых группах, что подтверждается установленной у новорожденных от матерей с тяжелой и умеренной ПЭ прямой положительной корреляционной зависимостью между показателями быстрой вспышки I_{max} , величины светосуммы S и углом спада кинетической кривой $\text{tg}\alpha$ ($r=0,61$; $p=0,009$). Обнаруженные связи свидетельствуют о включении организмом защитной реакции при окислительном стрессе, направленной на активацию антиоксидантной системы клеток.

Проведенные ранее исследования выявили развитие окислительного стресса и антиоксидантной активности в пуповинной крови у недоношенных новорожденных [16]. По мнению S. Regon и соавт. [17] организм новорожденного, особенно недоношенного, склонен к развитию ОС и токсичному воздействию свободных радикалов, так как при рождении ребенок подвергается действию относительно гипероксической окружающей среды, при этом сопутствующие факторы, такие как воспаление, гипоксия, ишемия способствуют усилению ОС.

Заключение. Таким образом, на основании повышения величин параметров хемилюминесценции S, а и Z у пациенток с преэклампсией разной степени тяжести установлено, что развитие окислительного стресса сопровождается ослаблением антиоксидантной активности. У новорожденных детей от матерей с преэклампсией увеличение показателей хемилюминесценции I_{max} , S и $\text{tg}\alpha$ свидетельствуют об окислительном стрессе и компенсаторном повышении антиоксидантной активности.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование поддержано грантом РФФИ № 18-415-370002.

ЛИТЕРАТУРА (пп.4, 5, 7, 8, 11, 13, 17 см. REFERENCES)

1. Сухих Г.Т., Мурашко Л.Е. Преэклампсия. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2010.
2. Иванова О.Ю., Пономарева Н.А., Алексашина К.А., Кулакова М.В. Особенности кровотока в венозном протоке плода при беременности, осложненной преэклампсией. *Российский вестник акушера-гинеколога*. 2019; 4(19): 54-7.
3. Садекова А.А., Хачатрян З.В., Красный А.М., Кан Н.Е., Хачатурян А.А., Тютюнник В.А. Диагностическая значимость определения уровня внеклеточной фетальной ДНК у беременных с преэклампсией и задержкой роста плода. *Акушерство и гинекология*. 2019; 8: 144-9.
4. Панова И.А., Рокотянская Е.А., Кузьменко Г.Н., Кудряшова А.В., Попова И.Г., Сытова Л.А., Назаров С.Б., Хлипунова Д.А. Маркеры воспалительной реакции и дисфункции эндотелия у беременных с гипертензивными расстройствами различного генеза. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 10(61): 692-6.
5. Попова И.Г., Чаша Т.В., Кузьменко Г.Н., Ситникова О.Г., Назаров С.Б. Клинико-лабораторная оценка функции эндотелия при развитии перинатальных поражений ЦНС у новорожденных от матерей с гестозом. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2010; 4(55): 18-22.
6. Ахтамьянов Р.Р., Леваков С. А., Габитова Н. А. Изменение по-

- казателей перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты у беременных с преэклампсией (обзор литературы). *Акушерство и гинекология*. 2014; 2: 97-101.
7. Иванова А.С., Попова И.Г., Назаров С.Б. Состояние независимых механизмов в плаценте и у плодов белых крыс при нормальной беременности и на фоне нарушения маточно-плацентарного кровообращения. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2011; 2: 32-5.
8. Минасян А.М., Хрипунова Г.И., Шляхова И.Ю. Активность перекисного окисления липидов и системы антиоксидантной защиты у беременных с хроническим пиелонефритом в фазе ремиссии, осложненным преэклампсией. *Международный журнал экспериментального образования*. 2015; 2: 40-1.
9. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA М.: Медиа Сфера; 2002.
10. Кокоева Ф.Б., Торчинов А.М., Пахилова С.Г., Балиос Л.В., Кузнецов В.П., Сарахова Д.Х. Роль окислительного стресса в патогенезе преэклампсии (обзор литературы). *Проблемы репродукции*. 2014; 4: 7-10.
11. Попова И. Г., Ситникова О. Г., Назаров С.Б., Кузьменко Г. Н., Абрамова И. И., Чаша Т. В., Парейшвили В. В. Оценка окислительного стресса в пуповинной крови и лизате эндотелиальных клеток сосудов пупочного канатика новорожденных. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 5(62): 274-7. DOI: 10.18821/0869-2084-2017-5-274-277.

REFERENCES

1. Sukhikh G. T., Murashko L. E. Preeclampsia. Moscow: GEOTAR-Media; 2010. (in Russian)
2. Ivanova O.YU., Ponomareva N.A., Aleksashina K.A., Kulakova M.V. Features of blood flow in the fetal venous duct during pregnancy complicated by preeclampsia. *Rossiyskiy vestnik akushera-ginekologa*. 2019; 4 (19): 54-7. (in Russian)
3. Sadekova A.A., Hachatryan Z.V., Krasnyj A.M., Kan N.E., Hachatryan A.A., Tyutyunnik V.A. Diagnostics significance of determining the level of extracellular fetal DNA in pregnant women with preeclampsia and fetal growth retardation. *Akusherstvo i ginekologiya*. 2019; 8: 144-9. (in Russian)
4. Steegers E. A. P, von Dadelszen P., Duvekot J. J., Pijnenborg R. Preeclampsia. *Lancet*. 2010; 376: 631-44.
5. Pijnenborg R., Vercruyse L., Hanssens M., Brosens I. Endovascular trophoblast and preeclampsia: A reassessment. *Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health*. 2011; 1(1): 66-71.
6. Panova I.A., Rokotyanskaya E.A., Kuz'menko G.N., Kudryashova A.V., Popova I.G., Sytova L.A., Nazarov S.B., Hlipunova D.A. Markers of inflammatory response and endothelial dysfunction in pregnant women with hypertensive disorders of various origins. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 61(10): 692-6. (in Russian)
7. Mannaerts D., Faes E., Gielis J., Van Craenenbroeck E., Cos P., Spaanderman M. et al. Oxidative stress and endothelial function in normal pregnancy versus pre-eclampsia, a combined longitudinal and case control study. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2018; 18(1): 60-2. doi: 10.1186/s12884-018-1685-5.
8. Gumina D.L., Black C.P., Balasubramaniam V., Winn V.D., Baker C.D. Umbilical Cord Blood Circulating Progenitor Cells and Endothelial Colony-Forming Cells Are Decreased in Preeclampsia. *Reprod Sci*. 2017; 24(7): 1088-96. doi: 10.1177/1933719116678692.
9. Popova I.G., Chasha T.V., Kuz'menko G.N., Sitnikova O.G., Nazarov S.B. Clinical and laboratory evaluation of endothelial function in the development of perinatal CNS lesions in newborns from mothers with gestosis. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii*. 2010; 4(55): 18-22. (in Russian)
10. Akhtam'yanov R.R., Levakov S. A., Gabitova N. A. Changes in lipid peroxidation and antioxidant protection in pregnant women with preeclampsia (literature review). *Akusherstvo i ginekologiya*. 2014; 2: 97-101. (in Russian)
11. Covarrubias A.E., Lecarpentier E., Lo A., Salahuddin S., Grey K.J., Karumanchi S.A., Zsengeller Z.K. AP39, a Modulator of Mitochon-

- drial Bioenergetics, Reduces Antiangiogenic Response and Oxidative Stress in Hypoxia – Exposed Trophoblasts: Relevance for Preeclampsia Pathogenesis. *Am. J. Pathol.* 2019; 189(1): 104-14. doi: 10.1016/j.ajpath.2018.09.007.
12. Ivanova A.S., Popova I.G., Nazarov S.B. The state of no-dependent mechanisms in the placenta and fetuses of white rats during normal pregnancy and against the background of violations of uteroplacental blood circulation. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoj i farmatsevticheskoy khimii.* 2011; 2: 32-5. (in Russian)
 13. Minasyan A.M., Khripunova G.I., Shlyahova I.Yu. Activity of lipid peroxidation and anti-oxidant protection system in pregnant women with chronic pyelonephritis in the remission phase, complicated by preeclampsia. *Mezhdunarodnyi zhurnal eksperimental'nogo obrazovaniya.* 2015; 2: 40-1. (in Russian)
 14. Rebrova O.Yu. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. Moscow: Media-Sfera; 2002. (in Russian)
 15. Kokoeva F.B., Torchinov A.M., Tsakhilova S.G., Balios L.V., Kuznetsov V.P., Sarakhova D.H. The role of oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia (literature review). *Problemy reproduktivnoy meditsiny.* 2014; 4: 7-10. (in Russian)
 16. Popova I. G., Sitnikova O. G., Nazarov S.B., Kuz'menko G. N., Abramova I. I., Chasha T. V., Pareyshvili V. V. Evaluation of oxidative stress in umbilical cord blood and endothelial cell lysate of the umbilical cord vessels of newborns. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2017; 5(62): 274-7. DOI: 10.18821/0869-2084-2017-5-274-277. (in Russian)
 17. Perrone S., Negro S., Tataranno M.L., Buonocore G. Oxidative stress and antioxidant strategies in newborns. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* 2010; 23(3): 63-5. doi: 10.3109/14767058.2010.509940.

Поступила 18.06.20

Принята к печати 10.07.20

Оруджева И.Н., Азизова Г.И., Гафаров И.А., Оруджев А.Г.

ИЗУЧЕНИЕ КОРРЕЛЯЦИОННЫХ СВЯЗЕЙ МЕЖДУ НЕКОТОРЫМИ БИОХИМИЧЕСКИМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ И ПАРАМЕТРАМИ ЛУЧЕВОЙ ДИАГНОСТИКИ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Азербайджанский медицинский университет, AZ 1022, Баку, Азербайджан

Целью нашего исследования явилось изучение корреляционных связей между некоторыми биохимическими показателями и параметрами лучевого исследования для ранней диагностики рака молочной железы. Были исследованы 76 пациенток, проходивших обследование по поводу рака молочной железы. У 48 из них был диагностирован рак молочной железы, у 28 - доброкачественные новообразования молочной железы. Возраст пациенток колебался от 18 до 79 лет. Контрольную группу составили 16 практически здоровых женщин. У всех обследуемых в сыворотке крови определяли уровень онкомаркеров (СЕА, СА 15-3), лактоферрина, некоторых про- и противовоспалительных цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10 и ФНО α) методом иммуноферментного анализа. Также всем пациенткам было проведено ультразвуковое исследование в сочетании с доплерографией и рентгеновской маммографией. При ультразвуковом обследовании оценивались размеры, контуры, эхогенность, эхоструктура, наличие и характер васкуляризации новообразований молочной железы, а также состояние регионарных лимфатических узлов. Во время маммографии определялись контуры, размеры выявленной опухоли, принималось во внимание наличие микрокальцинатов. Результаты исследования показали, что между некоторыми биохимическими показателями и параметрами лучевой диагностики выявляется статистически положительная корреляция.

Ключевые слова: рак молочной железы; онкомаркеры; цитокины; лактоферрин; ультразвуковое исследование; маммография.

Для цитирования: Оруджева И.Н., Азизова Г.И., Гафаров И.А., Оруджев А.Г. Изучение корреляционных связей между некоторыми биохимическими показателями и параметрами лучевой диагностики при раке молочной железы. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65(12): 738-743. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-12-738-743>

Orujova I.N., Azizova G.I., Gafarov I.A., Orujov A.H.

STUDY OF CORRELATION BETWEEN BIOCHEMICAL INDICATORS AND RADIOLOGICAL DIAGNOSTIC PARAMETERS OF BREAST CANCER

Department of Biochemistry and Department of Physical and Mathematical Science of Azerbaijan Medical University, Baku

The aim of this work was to study the correlation between some biochemical parameters and parameters of radiological diagnostics for early diagnosis of breast cancer. 76 patients with breast cancer were examined. In 48 of them was diagnosed breast cancer, in 28 of them was diagnosed benign breast neoplasms. The age of patients ranged from 18 to 79 years. The control group consisted of 16 healthy women. Oncological markers (CEA, CA 15-3), some pro-inflammatory and inflammatory cytokines (IL-2, IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α) and lactoferrin were determined in serum by using enzyme-linked immunosorbent assay method. All patients underwent ultrasound with a combination of Doppler and X-ray mammography. Ultrasound examination assessed the estimation of tumor size, contours, echogenicity, echostructure, the presence and nature of vascularization of breast tumors, and also assessed the location of regional lymph nodes. During mammography, the contours and sizes of the detected tumor were determined, and the presence of microcalcifications was also taken into account. The results of the study showed that a statistically positive correlation between some biochemical parameters and parameters of radiological diagnostics was established.

Key words: breast cancer; oncomarkers; cytokines; lactoferrin; ultrasound; mammography.

For citation: Orujova I.N., Azizova G.I., Gafarov I.A., Orujov A.H. Study of correlation between biochemical indicators and radiological diagnostic parameters of breast cancer. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65 (12): 738-743 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-12-738-743>

For correspondence: *Orujova Ilaha Nadir*; researcher of Department of Biochemistry; e-mail: orucovailaha@rambler.ru

Information about authors:

Orujova I.N., <http://orcid.org/0000-0002-8953-1670>;

Azizova G.I., <http://orcid.org/0000-0003-4847-4064>;

Gafarov I.A., <http://orcid.org/0000-0002-7725-2842>;

Orujov A.H., <http://orcid.org/0000-0002-1826-3816>.

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 30.04.2020
Accepted 24.09.2020

Введение. Рак молочной железы (РМЖ) – одна из основных причин смертности среди женщин в странах Западной Европы. Известно достаточно много факторов, которые ассоциируются с риском развития РМЖ: генетические и семейные, гормональные (ранняя менархе, поздняя менопауза, поздняя первая беременность), диета, доброкачественные болезни молочной железы (в основном, ассоциированы с атипичной гиперплазией).

В борьбе против РМЖ основной задачей является раннее выявление заболевания в целях улучшения результатов лечения и выживаемости. Одним из основных показателей, определяющих прогноз онкологического заболевания, является степень распространенности опухолевого процесса на момент обнаружения. В связи с этим вопросы эффективного выявления РМЖ актуальны, прежде всего, на доклинической стадии. Профилактика рака, прежде всего скрининг, подразумевает проведение обследований или тестов до появления симптомов, по поводу которых больные сами обратились за медицинской помощью. Отметим, что вопросы диагностической тактики при РМЖ постоянно пересматриваются и совершенствуются в связи с развитием науки и техники, появлением новых методик и технологий ультразвуковой, лучевой визуализации и лабораторных методик [1, 3].

Целью данного исследования явилось изучение корреляционных связей между некоторыми биохимическими показателями и параметрами лучевого исследования для ранней диагностики РМЖ.

Материал и методы. В настоящей работе представлены результаты исследования 76 пациенток, проходивших обследование по поводу РМЖ в онкологической клинике Азербайджанского медицинского университета за период с 2014 по 2017 год. Возраст пациенток колебался от 18 до 79 лет. Контрольную группу составили 16 практически здоровых женщин. У всех женщин в сыворотке крови определяли уровень онкомаркеров (СЕА, СА 15-3), лактоферрина, некоторых про- и противовоспалительных цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10 и ФНО- α). Также, всем пациентам было проведено ультразвуковое исследование (УЗИ) в сочетании с доплерографией и рентгеновской маммографией.

Лучевое обследование молочных желез проводилось в онкологической клинике Азербайджанского медицинского университета, а биохимические, иммуноферментные анализы были проведены в учебно-клинической биохимической лаборатории Азербайджанского медицинского университета.

Метод определения онкомаркеров (СА 15-3, СЕА), цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10 и TNF- α) и лактоферрина основан на «сендвич» варианте твердофазного иммуноферментного анализа с применением моно- и поликлональных антител к соответствующим параметрам. Для определения онкомаркеров использовали набор реагентов «Human» (Германия), для определения цитокинов и лактоферрина соответственно набор реагентов «Вектор-Бест» (Российская Федерация) и «Cloud-Clou» (Китай). Измерения проводились с помощью иммуноферментного анализатора STAT Fax 303 Plus (США).

УЗИ проводили на аппарате Mindray D70 (Китай), а маммография при помощи аппарата Siemens Mammomat Inspiration (Германия). При УЗИ оценивались переднезадние (AP) и поперечные (R) размеры и их соотношение, контуры, экзогенность, экоструктура, наличие и характер васкуляризации выявленного объемного ново-

образования. Принималось во внимание состояние регионарных подмышечных, надключичных, подключичных, парастернальных лимфатических узлов. Во время маммографии определяли контуры, размеры выявленной опухоли, также принимались во внимание наличие микрокальцинатов.

Корреляционные связи были определены с помощью критерия ρ -Спирмена. Статистическая значимость коэффициента корреляции определена 2-сторонним критерием. Вычисления проведены в статистическом пакете SPSS-20.

Результаты и обсуждение. В настоящее время известен ряд опухолевых маркеров при РМЖ. Среди них наиболее широко используют СА 15-3 и СЕА.

Углеводный антиген СА 15-3 – это специфический белок, онкомаркер рака молочной железы. Антиген производится в незначительном количестве в здоровом организме клетками протоков молочной железы. Если в железе возникают онкологические процессы, то происходит аномально высокая продукция СА 15-3 [4].

По результатам нашего исследования, между онкомаркером СА 15-3 и контурами ($\rho=0,599$, $p<0,001$), экзогенностью ($\rho=0,427$, $p<0,001$), размерами ($\rho=0,218$, $p=0,059$), соотношениями AP и R опухоли ($\rho=0,488$, $p<0,001$), состоянием лимфатических узлов ($\rho=0,502$, $p<0,001$) при УЗИ, кровообращением новообразования при доплерографии ($\rho=0,698$, $p<0,001$) выявляется статистически значимая положительная корреляция. Похожая корреляция наблюдалась между СА 15-3 и контурами опухоли ($\rho=0,575$, $p<0,001$), наличием микрокальцинатов ($\rho=0,431$, $p<0,001$) при маммографии.

Диагностическая ценность СА 15-3 возрастает в комбинации с определением онкомаркера СЕА. Высокий уровень этих маркеров связан со стадией РМЖ, размером опухоли и вовлечением в опухолевый процесс регионарных лимфатических узлов. СЕА – гликопротеин, относящийся к группе онкофетальных белков; во внутриутробном периоде вырабатывается клетками пищеварительного тракта (печени, кишечника, поджелудочной железы), а после рождения его синтез резко подавляется и уровни в сыворотке у здоровых людей минимальны. Его экспрессия наблюдается в клетках различных тканей в норме и при злокачественных процессах, поэтому повышение уровня может быть обусловлено как злокачественным ростом опухоли, так и различными воспалительными и доброкачественными процессами. У части пациентов с подтвержденным диагнозом карциномы могут отмечаться нормальные уровни СЕА, с другой стороны, повышенный уровень выявляется у курильщиков, пациентов с доброкачественными опухолями и воспалительными процессами. Поэтому однозначно интерпретировать результаты СЕА как наличие или отсутствие карциномы нельзя. Наиболее адекватным является использование СЕА на этапе контроля эффективности лечения [4].

У больных, входящих в группу исследования, нами установлена статистически значимая положительная корреляция между онкомаркером СЕА и контурами ($\rho=0,581$, $p<0,001$), экзогенностью ($\rho=0,505$, $p<0,001$), соотношениями AP и R новообразования ($\rho=0,453$, $p<0,001$), состоянием лимфатических узлов ($\rho=0,493$, $p<0,001$) при УЗИ, кровообращением опухоли ($\rho=0,607$, $p<0,001$) при доплерографии. Также определялась статистически положительная корреляция между онкомаркером СЕА и контурами опухоли ($\rho=0,588$, $p<0,001$), на-

личи́ем микрокальцинов при маммографии ($p=0,238$, $p=0,038$).

В ходе исследования также были изучены корреляционные отношения между некоторыми цитокинами и параметрами лучевой диагностики. При этом выявлена статистически достоверная положительная корреляция между ИЛ-2 и кровообращением опухоли при доплерографии ($p=0,296$, $p=0,009$).

ИЛ-2 является цитокином, который способствует дифференцировке и выживанию регуляторных Т-клеток, тем самым обеспечивая их значимость в контроле иммунного ответа и их эффективное участие в патогенезе ряда патологических состояний, таких как рак и метаболические, инфекционные, аутоиммунные и воспалительные заболевания [2, 5].

Установлена статистически положительная корреляция между ИЛ-6 и контурами опухоли ($p=0,420$, $p<0,001$), экзогенностью ($p=0,357$, $p=0,002$), соотношениями АР и R ($p=0,292$, $p=0,011$), состоянием лимфатических узлов ($p=0,424$, $p<0,001$) при УЗИ, кровообращением опухоли при доплерографии ($p=0,487$, $p<0,001$). Такая корреляция наблюдалась также между ИЛ-6 и контурами опухоли ($p=0,432$, $p<0,001$), наличием микрокальцинов ($p=0,228$, $p=0,047$) при маммографии.

ИЛ-6 – гликопротеид, являющийся мультифункциональным цитокином, координирующим иммунный и острофазовый воспалительный ответы, а также онкогенез и гемопоэз. Очевидно, опухолевые клетки могут продуцировать цитокины в качестве аутокринных ростовых факторов. Так, ИЛ-6 может продуцироваться злокачественными клетками опухолей, при этом его высокий уровень может препятствовать эффективной иммунотерапии. По данным литературы, активация выработки ИЛ-6 приводит к запуску транскрипционных механизмов, которые ускоряют пролиферацию и рост злокачественных клеток [5, 22, 23].

В наших исследованиях выявлена статистически значимая положительная корреляция между ИЛ-8 и контурами ($p=0,415$, $p<0,001$), экзогенностью ($p=0,351$, $p=0,002$), соотношениями АР и R опухоли ($p=0,232$, $p=0,044$), состоянием лимфатических узлов ($p=0,296$, $p=0,009$) при УЗИ, а также характером кровообращения новообразования при доплерографии ($p=0,545$, $p<0,001$). Идентичная корреляция также наблюдалась между ИЛ-8 и контурами опухоли ($p=0,427$, $p<0,001$), наличием микрокальцинов ($p=0,248$, $p=0,031$) при маммографии.

Проведен ряд клинических исследований для выявления роли ИЛ-8 в прогрессировании рака молочной железы. Установлено, что неопластические ткани молочной железы имеют высокие уровни концентрации ИЛ-8 по сравнению с нормальной тканью. Экспрессия ИЛ-8 у пациентов с раком молочной железы связана с метастазированием рака молочной железы, прогрессирующим заболеванием и плохой выживаемостью [17, 26]. Секретция ИЛ-8 стимулирует экспрессию молекулы адгезии, включая фибронектин, в клетках молочной железы человека [8, 12]. Таким образом, высокий уровень ИЛ-8 связан с метастатической инвазивностью и ранним рецидивом заболевания. По-видимому, он обладает значительным потенциалом в качестве прогностического и / или прогностического биомаркера рака. Другие исследования подтвердили предыдущие исследования и показали, что имеется связь уровня ИЛ-8 со стадией заболевания [16, 25].

Нами выявлена статистически достоверная положительная корреляция между ИЛ-10 и контурами опухоли ($p=0,401$, $p<0,001$), соотношениями АР и R ($p=0,300$, $p=0,009$), состоянием лимфатических узлов ($p=0,262$, $p=0,022$) при УЗИ, а также характером кровообращения опухоли при доплерографии ($p=0,431$, $p<0,001$). Аналогичная корреляция наблюдалась между этим цитокином и контурами опухоли ($p=0,375$, $p<0,001$) при маммографии.

ИЛ-10 – плейотропный противовоспалительный цитокин, который вызывает иммуносупрессию и помогает избежать иммунологический надзор над опухолью. Как и некоторые другие цитокины, ИЛ-10 также может оказывать двойное пролиферативное и ингибирующее действие на клетки опухоли молочной железы, что указывает на сложную роль ИЛ-10 в инициации и прогрессировании рака молочной железы [6, 7, 10].

По данным литературы, ФНО- α может оказывать противоопухолевое и противовоспалительное действие. Многие клетки повышают свою протеолитическую активность в ответ на секрецию воспалительных цитокинов, и, в частности, ФНО- α . Установлено, что этот цитокин может стимулировать выживание и пролиферацию, миграцию и инвазию раковых клеток, а также способствовать ангиогенезу [13, 18, 20, 24]. Достоверная положительная корреляция наблюдалась между ФНО α и контурами ($p=0,317$, $p<0,005$), экзогенностью опухоли ($p=0,319$, $p<0,005$), состоянием лимфатических узлов ($p=0,285$, $p=0,013$) при УЗИ, характером кровообращения новообразования ($p=0,363$, $p<0,001$) при доплерографии. Идентичная корреляция также наблюдалась между ФНО- α и контурами опухоли при маммографии ($p=0,308$, $p=0,007$).

В ходе наших исследований наблюдалась статистически достоверная положительная корреляция между лактоферрином и контурами ($p=0,482$, $p<0,001$) (рис. 1), экзогенностью ($p=0,324$, $p=0,004$), соотношениями АР и R опухоли ($p=0,339$, $p=0,003$), состоянием лимфатических узлов ($p=0,546$, $p<0,001$) при УЗИ, характером кровообращения новообразования при доплерографии ($p=0,525$, $p<0,001$), а также контурами опухоли при маммографии ($p=0,488$, $p<0,001$) (рис. 2).

Лактоферрин – полифункциональный белок из семейства трансферринов. Он является одним из компонентов иммунной системы организма, принимает участие в системе неспецифического гуморального иммунитета, регулирует функции иммунокомпетентных клеток и является белком острой фазы воспаления [22, 23]. Лактоферрина привлекает внимание онкологов, ведущих поиск неспецифических и специфических опухолеассоциированных маркеров. Аргументами в пользу пригодности лактоферрина как неспецифического маркера злокачественного процесса являются исследования, показавшие повышение экспрессии лактоферрина в злокачественных клетках в отличие от нормальных. J. Farley и соавт. [9,14] определили связь лактоферрина с развитием рака молочной железы, опухолей лимфоидной системы, и считают этот белок раково-специфическим маркером эндоцервикальных аденокарцином.

Следует также отметить, что между ФНО- α , ИЛ-2 и размерами опухоли при УЗИ наблюдалась отрицательная статистически недостоверная корреляция. Не выявлено корреляции между СЕА, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ФНО- α , лактоферрином и размерами опухоли при УЗИ и маммографии. Идентичные корреляционные отношения наблюдались между СА 15-3 и размерами опухоли

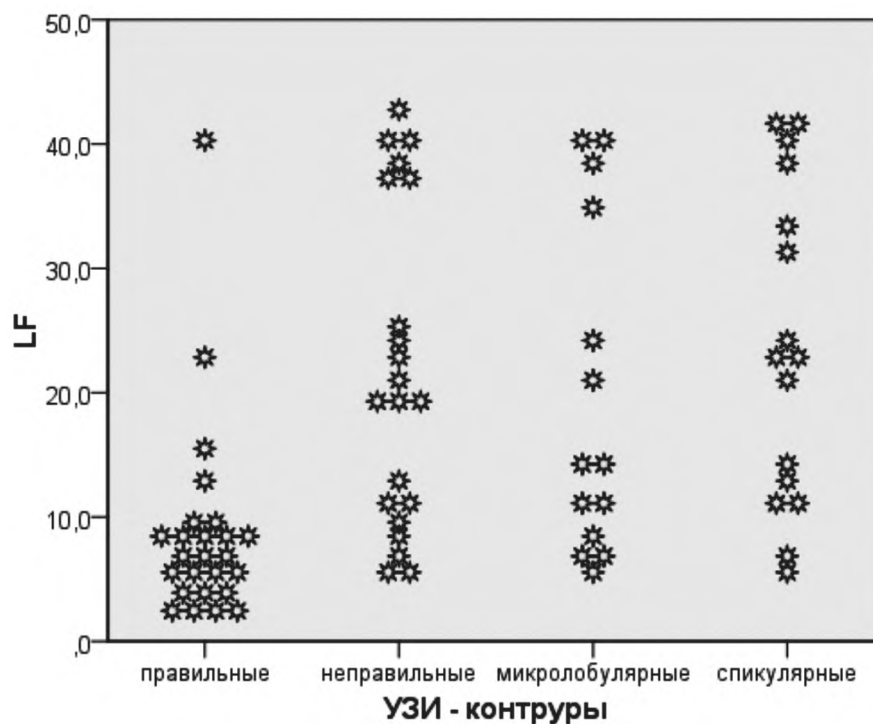


Рис. 1. Корреляционные связи между лактоферрином и контурами новообразования при УЗИ.

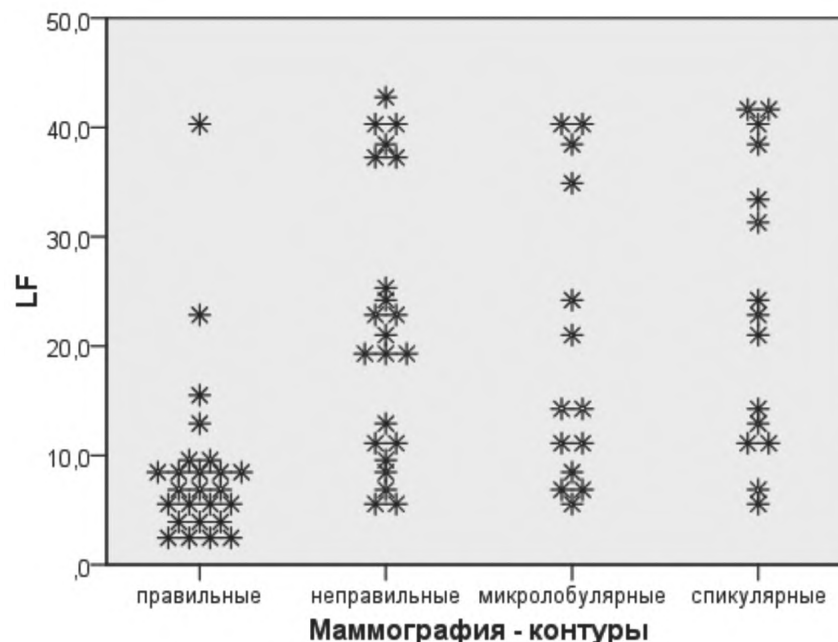


Рис. 2. Корреляционные связи между лактоферрином и контурами новообразования при маммографии.

во время маммографического скрининга, между ИЛ-10 и экзогенностью опухоли при УЗИ, наличием микрокальцинатов, между ФНО- α и соотношениями AP и R новообразования, наличием микрокальцинатов при маммографии (см. таблицу).

Таким образом, при изучении корреляции между биохимическими показателями и параметрами лучевой диагностики наблюдались статистически достоверные положительные корреляции, за исключением одного из параметров – размера новообразований. При исследовании

ИЛ-2 из всех вышеперечисленных параметров лучевой диагностики идентичная корреляция наблюдалась только с характером кровообращения опухоли при доплерографии. Принимая во внимание вышеизложенное можно прийти к выводу что, совместное изучение параметров маммографии, УЗИ и биохимических показателей может играть важную роль не только при обнаружении доклинических проявлений РМЖ, а также при определении тяжести заболевания и при применении новых терапевтических методов.

Корреляционные связи между некоторыми биохимическими показателями и параметрами лучевой диагностики при раке молочной железы

Показатель		CEA	CA-15/3	ИЛ-2	ИЛ-6	ИЛ-8	ИЛ-10	ФНО-α	Лакто-феррин
УЗИ контуры	ρ	0,581**	0,599**	0,184	0,420**	0,415**	0,401**	0,317**	0,482**
	p	0,000	0,000	0,112	0,000	0,000	0,000	0,005	0,000
УЗИ размеры	ρ	0,192	0,218	-0,027	0,072	,049	0,036	-0,052	0,089
	p	0,096	0,059	0,818	0,538	,672	0,757	0,656	0,447
УЗИ Лимфоузлы	ρ	0,493**	0,502**	0,166	0,424**	0,296**	0,262*	0,285*	0,546**
	p	0,000	0,000	0,151	0,000	0,009	0,022	0,013	0,000
УЗИ Эхогенность	ρ	0,505**	0,427**	0,066	0,357**	0,351**	0,138	0,319**	0,324**
	p	0,000	0,000	0,570	0,002	0,002	0,235	0,005	0,004
УЗИ Соотношения AP и R	ρ	0,453**	0,488**	0,095	0,292*	0,232*	0,300**	0,013	0,339**
	p	0,000	0,000	0,415	0,011	0,044	0,009	0,910	0,003
Допплерография Характер кровотока	ρ	0,607**	0,698**	0,296**	0,487**	0,545**	0,431**	0,363**	0,525**
	p	0,000	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000
Маммография Контур	ρ	0,588**	0,575**	0,168	0,432**	0,427**	0,375**	0,308**	0,476**
	p	0,000	0,000	0,148	0,000	0,000	0,001	0,007	0,000
Маммография Размеры	ρ	0,212	0,146	-0,096	0,016	-0,034	-0,064	-0,102	0,017
	p	0,065	0,208	0,410	0,894	0,768	0,582	0,379	0,886
Маммография Микрокальцинаты	ρ	0,238*	,431**	0,161	0,228*	0,248*	0,191	0,087	0,220
	p	0,038	0,000	0,166	0,047	0,031	0,098	0,457	0,056

Примечание. ρ - коэффициент корреляции по Спирмену; p - статистическая достоверность разницы с показателями контрольной группы; статистически значимые корреляции: * - p < 0,05; ** - p < 0,01.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 6 – 26 см. REFERENCES)

- Алиходжаева Л.Т. Диагностическое значение изучения уровней про- и противовоспалительных цитокинов иммунной системы у больных раком молочной железы. *Онкология женской репродуктивной системы*. 2009; (3-4): 49-52.
- Кадагидзе З.Г. Новые подходы к регуляции противоопухолевого иммунитета. *Маммология*. 2007; (1): 10-3.
- Сенча А.Н. Ультразвуковое исследование молочных желез. Шаг за шагом. От простого к сложному. 2-е изд. М.: МЕДпресс-информ; 2019.
- Ткачук В.А. Клиническая биохимия. 2-е изд. испр. и доп. М.: ГЭОТАР-МЕД; 2004.
- Фрейдлин И.С., Кузнецова С.А. Иммунные комплексы и цитокины. *Медицинская иммунология*. 1999; 1(1-2): 27-36.

REFERENCES

- Alimkhodzhaeva L.T. The diagnostic value of studying the levels of pro- and anti-inflammatory cytokines of the immune system in patients with breast cancer. *Opukhli zhenskoy reproductivnoy sistemy*. 2009; (3-4): 49-52. (in Russian)
- Kadagidze Z.G. New approaches to the regulation of antitumor immunity. *Mammologiya*. 2007;(1):10-3. (in Russian)
- Sencha A.N. Ultrasound examination of the mammary glands. Step by step. From simple to complex. [Ultrazvukovoe issledovanie molochnykh zhelez. Shaq za shaqom. Ot prostoqo k slozhnomu]. 2nd ed. Moscow: MEDpress-inform; 2019. (in Russian)
- Tkachuk V.A. Clinical biochemistry [Klinicheskaya biokhimiya]. 2nd ed. Moscow: Geotar-med; 2004. (in Russian)
- Freidlin I.S., Kuznetsova S.A. Immune complexes and cytokines. *Meditsinskaya Immunologiya*. 1999; 1 (1-2): 27-36. (in Russian)
- Andres P.J., Illera J.C., Caceres S., Diez L., Perez-Alenza M.D., Pena L. Increased levels of interleukins 8 and 10 as findings of

- canine inflammatory mammary cancer. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2013; 152 (3-4): 245-51. doi: 10.1016/j.vetimm.2012.12.010. [PubMed: 23351639].
- Cacev T., Radosevic S., Krizanac S., Kapitanovic S. Influence of interleukin-8 and interleukin-10 on sporadic colon cancer development and progression. *Carcinogenesis*. 2008;29(8):1572-80. doi: 10.1093/carcin/bgn164. [PubMed: 18628251].
- Chen Y., Chen L., Li J.Y., Mukaida N., Wang Q., Yang C. ERbeta and PEA3 co-activate IL-8 expression and promote the invasion of breast cancer cells. *Cancer Biol. Ther.* 2011; 11(5): 497-511.
- Farley J., Loup D., Nelson M., Mitchell A., Esplund G., Macri C., et al. Neoplastic transformation of the endocervix associated with downregulation of lactoferrin expression. *Mol. Carcinog.* 1997; 20 (2): 240-50.
- Hamidullah , Changkija B., Konwar R. Role of interleukin-10 in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 2012 May;133(1):11-21. doi: 10.1007/s10549-011-1855-x. Epub 2011 Nov 5. Review. PMID:22057973.
- Ishihara K., Hirano T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002;13: 357—68.
- Kassim S.K., El-Salahy E.M., Fayed S.T., Helal S.A., Helal T., Azzam E. D. Vascular endothelial growth factor and interleukin-8 are associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients. *Clin Biochem.* 2004; 37(5):363-9. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2004.01.014. [PubMed: 15087251].
- Katerinaki E., Evans G.S, Lorigan P.C, MacNeil S. TNF-alpha increases human melanoma cell invasion and migration in vitro: the role of proteolytic enzymes. *Br. J. Cancer.* 2003; 89: 1123–9. doi: 10.1038/sj.bjc.6601257. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar].
- Kelver M.E., Kaul A., Nowicki B., Findley W.E., Hutchens T.W., Nagamani M. Estrogen regulation of lactoferrin expression in human endometrium. *Am. J. Reprod. Immunol.* 1996; 36 (5):243-7.
- Lin Y., Huang R., Chen L., Li S., Shi Q., Jordan C. Identification of interleukin-8 as estrogen receptor-regulated factor involved in breast cancer invasion and angiogenesis by protein arrays. *Int. J. Cancer.* 2004;109(4):507-15. doi: 10.1002/ijc.11724. [PubMed: 14991571].

16. Mayerhofer K., Bodner K., Bodner-Adler B., Schindl M., Kaider A., Hefler L. Interleukin-8 serum level shift in patients with ovarian carcinoma undergoing paclitaxel-containing chemotherapy. *Cancer*. 2001;91(2):388-93.
17. Milovanovic J., Todorovic-Rakovic N., Abu Rabi Z. The prognostic role of interleukin-8 (IL-8) and matrix metalloproteinases -2 and -9 in lymph node-negative untreated breast cancer patients. *J. Balkan Union Oncol.* 2013;18(4): 866-73.
18. Miles D.W., Happerfield L.C., Naylor M.S., Bobrow L.G., Rubens R.D., Balkwill F.R. Expression of tumour necrosis factor (TNF- α) and its receptors in benign and malignant breast tissue. *Int. J. Cancer*. 1994;56:777-82. doi: 10.1002/ijc.2910560603. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar].
19. Panagakos F.S, Kumar S. Modulation of proteases and their inhibitors in immortal human osteoblast-like cells by tumor necrosis factor-alpha in vitro. *Inflammation*. 1994;18:243-65. doi: 10.1007/BF01534267. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar].
20. Sparmann A, Bar-Sagi D. Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell*. 2004;6(5): 447-58. doi: 10.1016/j.ccr.2004.09.028. [PubMed: 15542429].
21. Todorovic-Rakovic N, Milovanovic J. Interleukin-8 in breast cancer progression. *J Interferon Cytokine Res*. 2013;33(10): 563-70. doi: 10.1089/jir.2013.0023. [PubMed: 23697558].
22. Tuccari G. Rossiello R., Barresi G. Iron binding proteins in gallbladder carcinomas. An immunocytochemical investigation. *Histol. Histo-pathol*. 1997; 12 (3): 671-6.
23. Yossie Asato de Camargo, Longatto F.A., Alves V.A., Bisi H., Kanamura C.T., Alves Abelin N.M. Lactoferrin in thyroid lesions: immunoreactivity in fine needle aspiration biopsy samples. *R. Acta Cytol*. 1996; 40 (3): 408-13.
24. Waters J.P., Pober J.S., Bradley J.R. Tumour necrosis factor and cancer. *J. Pathol*. 2013;230: 241-8. doi: 10.1002/path.4188. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar].
25. Zarogoulidis P., Katsikogianni F., Tsiouda T., Sakkas A., Katsikogiannis N., Zarogoulidis K. Interleukin-8 and interleukin-17 for cancer. *Cancer Invest*. 2014;32(5):197-205. doi: 10.3109/07357907.2014.898156. [PubMed: 24669909].
26. Zuccari D.A., Leonel C., Castro R., Gelaleti G.B., Jardim B.V., Moschetta M.G. An immunohistochemical study of interleukin-8 (IL-8) in breast cancer. *Acta Histochem*. 2012;114(6):571-6. doi: [PubMed: 22244449].

Поступила 30.04.20

Принята к печати 24.09.20

КОАГУЛОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Преснякова М.В., Галова Е.А., Соснина Л.Н., Поповичева А.Н., Любавина Н.А., Костина О.В., Кузнецова В.Л., Карякин Н.Н.

НАРУШЕНИЯ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА И ВЫРАЖЕННОСТЬ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ У ПАЦИЕНТОВ С НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ

ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава РФ, 603950, Нижний Новгород, Россия

Нарушения системы гемостаза и воспаление играют ключевую роль в патогенезе новой коронавирусной пневмонии (НКП), обуславливая ее течение и исход. Изучали в динамике состояние системы гемостаза и выраженность острофазного ответа у пациентов с новой коронавирусной пневмонией. У 22 пациентов с НКП определены АЧТВ, протромбиновое время (ПВ), фибриноген (Фг), Д-димеры (Д-д), антитромбин III (АТ III), С-реактивный белок (СРБ), количество тромбоцитов, у 49 больных изучены вязко-эластические свойства кровяного сгустка методом тромбоэластографии (ТЭГ) с коагином. Возраст пациентов варьировал от 40 до 77 лет. Тяжесть заболевания у больных в 100% случаев по данным КТ соответствовала КТ2-КТ3. У 16 больных была диагностирована острая дыхательная недостаточность. Контрольную группу составили 25 практически здоровых людей. При госпитализации для пациентов с НКП было характерно: повышение концентрации Д-д, СРБ, Фг, удлинение АЧТВ и ПВ, не отличающееся от диапазона нормы активность АТIII и содержание тромбоцитов. Через 10 сут после госпитализации и на фоне проводимой терапии у пациентов с НКП отмечалась положительная динамика в гемостазиологическом профиле и выраженности воспалительной реакции. Показатели тромбоэластографии у пациентов с НКП не отличались от контрольных значений как при госпитализации, так и на 10-е сутки.

Таким образом, у пациентов с новой коронавирусной пневмонией регистрируется повышенная протромботическая активность и выраженный воспалительный ответ. На фоне лечения отмечается положительная динамика как в коагуляционном статусе, так и воспалительной реакции. Для определения диагностических возможностей тромбоэластографии у пациентов НКП необходимы дополнительные исследования.

Ключевые слова: COVID-19; система гемостаза; воспаление; пневмония; ТЭГ.

Для цитирования: Преснякова М.В., Галова Е.А., Соснина Л.Н., Поповичева А.Н., Любавина Н.А., Костина О.В., Кузнецова В.Л., Карякин Н.Н. Нарушения системы гемостаза и выраженность воспалительной реакции у пациентов с новой коронавирусной пневмонией. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65 (12): 744-749.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-12-744-749>

Presnyakova M.V., Galova E.A., Sosnina L.N., Popovicheva A.N., Lybavina N.A., Kuznetsova V.L., Karyakin N.N.

DISTURBANCES OF THE HEMOSTASIS SYSTEM AND EXPRESSION OF INFLAMMATORY REACTION IN PATIENTS WITH NEW CORONAVIRAL PNEUMONIA

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Privolzhsky Research Medical University» of the Ministry of Health of the Russian Federation

Disorders of the hemostatic system and inflammation play a key role in the pathogenesis of new coronavirus pneumonia (NCP), determining its course and outcome. To study the dynamics of the state of the hemostasis system and the severity of the acute phase response in patients with new coronavirus pneumonia. We determined APTT, prothrombin time (PT), fibrinogen (F), D-dimers (D-d), antitrombin III (AT III), C-reactive protein (CRP), platelet count in 22 patients. In 49 patients, the viscoelastic properties of a blood clot were studied by thromboelastography (TEG) with koalin. The age of the patients ranged from 40 to 77 years. According to CT, the severity of 100% cases corresponded to CT2-CT3. Acute respiratory failure (ARF) was diagnosed in 16 patients. A control group included 25 apparently healthy subjects. During hospitalization, patients with NCP were characterized by: an increase in the concentration of D-d, CRP, Fg, lengthening of APTT and PT, ATIII activity and platelet count not differing from the normal range. 10 days after hospitalization and against the background of ongoing therapy, patients with NCP showed positive dynamics in the hemostasiological profile and the severity of the inflammatory response. Thromboelastography indices in patients with LCP did not differ from control values both at hospitalization and on day 10. Thus, in patients with novel coronavirus pneumonia, an increased prothrombotic activity and a pronounced inflammatory response are recorded. Against the background of treatment, there is a positive dynamics in both the coagulation status and the inflammatory response. Additional studies are needed to determine the diagnostic capabilities of thromboelastography in patients with NCP.

Key words: COVID-19; hemostatic system; inflammation; pneumonia; TEG.

For correspondence: Presnyakova M.V., Cand. Sci. Biol., Senior Researcher, Laboratory Research Department, University Hospital Department; e-mail: Presnyakova@list.ru

For citation: Presnyakova M.V., Galova E.A., Sosnina L.N., Popovicheva A.N., Lybavina N.A., Kuznetsova V.L., Karyakin N.N. Disturbances of the hemostasis system and expression of inflammatory reaction in patients with new coronaviral pneumonia. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65(12): 744-749 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-12-744-749>

Information about authors:

Presnyakova M.V., <http://orcid.org/0000-0002-5845-588X>;
Galova E.A., <http://orcid.org/0000-0002-9574-2933>;
Sosnina L.N., <http://orcid.org/0000-0002-4683-4647>;
Popovicheva A.N., <http://orcid.org/0000-0002-3717-2186>;
Lybavina N.A., <http://orcid.org/0000-0002-8914-8268>;
Kostina O.V., <http://orcid.org/0000-0001-7529-2544>;
Kuznetsova V.L., <http://orcid.org/0000-0002-4146-689X>;
Karyakin N.N., <http://orcid.org/0000-0001-8958-6199>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 17.09.2020
Accepted 06.10.2020

Введение. COVID-19 – острая респираторная инфекция, вызываемая коронавирусом SARS-CoV-2 (2019-nCoV), которая может протекать как в легкой/бессимптомной, так и в тяжелой форме, сопровождающейся специфическими осложнениями, вирусной пневмонией, острым респираторным дистресс-синдром, дыхательной недостаточностью с риском смерти [1 – 4].

Патогенетическими звеньями тяжелого течения новой коронавирусной инфекции являются гипериммунная реакция в ответ на вирусную инвазию, эндотелиальная дисфункция и гиперкоагуляционный синдром, которые приводят к тяжелым нарушениям гомеостаза, распространенному микрососудистому тромбозу, дыхательной недостаточности и тяжелой полиорганной дисфункции [5].

Цель исследования: изучить в динамике состояние системы гемостаза и выраженность острофазного ответа у пациентов с новой коронавирусной пневмонией.

Материал и методы. Лабораторные исследования были проведены у 49 пациентов с клиническими проявлениями вирусной инфекции и с двусторонней полисегментарной пневмонией (новой коронавирусной пневмонией – НКП), из которых мужчин было 24% (12), женщин – 76% (37), возраст пациентов варьировал от 40 до 77 лет. Диагноз пневмонии был выставлен на основании клинической картины и данных компьютерной томографии (КТ). Тяжесть заболевания у больных в 100% случаев по данным КТ соответствовала КТ2-КТ3. Исследование проведено в соответствии с Хельсинской декларацией (2013) и одобрено Этическим комитетом Приволжского исследовательского медицинского университета. От каждого пациента получено информированное согласие.

Показатели системы гемостаза (активированное парциальное частичное), тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое время (ПВ), концентрация фибриногена (Фг), Д-димера (Д-д), активность антитромбина III (АТIII) были определены на анализаторе гемоконтроля ACL ELITE Pro (Instrumentation Laboratory Company, USA) с использованием стандартных наборов, концентрация С-реактивного белка (СРБ) – на биохимическом анализаторе Indiko (Thermo Fisher Scientific, USA) с использованием оригинальной реагентки, количество тромбоцитов – на автоматическом гематологическом анализаторе «Pentra-60» (Франция). Состояние вязко-эластических свойств кровяного сгустка было изучено согласно стандартной методике на тромбоэластографе ТЭГ 5000 («Haemoscope Corporation», США) [6].

Измерение тромбоэластографических параметров выполнялось на цитратных образцах крови с добавлением активатора коалина (режим ТЭГ – citrated kaolin). Были получены все показатели кинетики свертывания, выдаваемые этой программой, статистическому анализу подверглись показатели ТЭГ: R, K, α , MA, G. Лабораторные исследования проводились при госпитализации (группа 1) и через 10 сут с момента госпитализации (группа 2).

Контрольную группу составили 25 добровольцев, не имеющих очагов воспаления любой локализации и этиологии, сахарного диабета, артериальной и/или венозной недостаточности.

Для проверки статистических гипотез использовали: U-критерий Манна-Уитни, критерий Вилкоксона, коэффициент корреляции Спирмена. Критическая величина уровня значимости принята равной 0,05. Количественные данные представлены в виде: медианы и первого; третьего квартиля Me (Q1; Q3). Частоты наблюдения приведены в процентах, в скобках указаны абсолютные значения. Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы Statistica6.0 (StatSoft, Inc.).

Результаты. Анализ проведенных исследований показал, что при госпитализации пациенты с новой коронавирусной пневмонией (НКП) имели изменения системы гемостаза протромботической направленности и выраженную воспалительную реакцию. У 64% (14/22) пациентов отмечалось значительное повышение уровня Д-д (см.таблицу), которое коррелировало с коморбидностью и возрастом пациентов ($r=0,58$, $p=0,005$; $r=0,61$, $p=0,002$) соответственно. Значения хронометрических показателей АЧТВ и ПВ были удлинены по сравнению с контрольной группой. Однако, лишь 13,5% (3/22) пациентов имели удлинение значений данных тестов более чем на 2 с по сравнению с максимумом в контроле (35 с для АЧТВ и 12,1 с для ПВ). Все эти больные имели тяжелые сопутствующие заболевания.

Антикоагулянтный потенциал у данного контингента больных был повышен, о чем свидетельствовала активность основного физиологического антикоагулянта АТIII.

У 86% (19/22) пациентов с НКП отмечалась выраженная острофазная реакция, которая характеризовалась повышением концентрации СРБ и Фг, имеющих между собой высокую степень сопряженности ($r=0,76$; $p=0,0005$).

Количество тромбоцитов у пострадавших хотя и отличалось от контрольной группы, однако находилось в диапазоне физиологической нормы.

Лабораторные показатели пациентов с пневмонией, ассоциированной с COVID-19 в динамике (Ме (Q1;Q3))

Показатель	Контрольная группа	Группа 1	Группа 2
Д-димер, нг/мл	100 [100;200]	819 [472;1769]*	344 [217;753]*. **
АЧТВ, с	28,3 [27,4;30,3]	30,2 [27,5;33,6]	33,9 [30,1;37,6]*. **
ПВ, с	11,6 [11,4;12,0]	12,9 [12,5;13,5]*	12,4 [12,0;12,9]*
Антитромбин III, %	91,7 [81,4;106]	109 [96,1;125]*	91,1 [85,0;103] **
СРБ, мг/л	6,00 [6,00;6,00]	34,5 [16,0;108]*	12,0 [3,00;17,0] **
Фибриноген, г/л	2,81[2,56;3,10]	5,36 [4,34;7,00]*	4,53 [3,75;5,59]*. **
Тромбоциты, $\times 10^9$	281 [255;310]	227 [172;316]*	319 [183;410] **
R, мин	7,6 [7,2;8,2]	8,1 [6,0;8,8]	8,3[6,2;9,6]
K, мин	1,9 [1,7;2,2]	1,8 [1,3;2,3]	1,8 [1,4;2,5]
α , град	63,9 [61,4;66,5]	64,6 [60,2;71,9]	64,9 [57,6;69,6]
МА, мм	67,6 [65,5;69,4]	67,9 [60,9;72,4]	68,4 [64,0;71,3]
G, дина/с	10,4 [9,5;11,3]	10,6 [7,8;13,1]	10,8 [8,9;12,4]

Примечание. n-число наблюдений, *- различия статистически значимы по анализируемым параметрам между контрольной группой и группами 1 и 2; ** - различия статистически значимы по анализируемым параметрам между группами 1 и 2.

Через 10 суток после госпитализации и на фоне проводимой терапии у пациентов с НКП отмечалась положительная динамика в гемостазиологическом профиле и выраженности воспалительной реакции. Уровень Д-д уменьшился в 2,5 раза по сравнению с 1-ми сутками. Если при госпитализации частота встречаемости показателя, превышающего целевое значение 500 нг/мл в 3-6 раз, составила 32% (8/22), то к 10-м сут она снизилась до 9% (2/22), ($p=0,026$).

На 10 сутки регистрировалось удлинение АЧТВ, что является следствием проводимой антикоагулянтной терапии. На данный срок наблюдения значения ПВ и активности АТIII практически не отличались от таковых в контрольной группе. Интенсивность воспалительного ответа также снижалась к 10 сут и характеризовалась уменьшением концентраций Фг и СРБ по сравнению с 1-ми сутками. Содержание СРБ снизилось почти в 3 раза, а частота встречаемости значений СРБ свыше 45 мг/л (так называемый «бактериальный порог») в этот период уменьшилась в 4 раза по сравнению с первыми сутками и составила 9% (2/22) против 36% (8/22) соответственно ($p=0,026$). Количество пациентов со значениями СРБ в пределах нормы к 10 суткам возросло в 2,6 раза. Аналогичная картина отмечалась и по Фг. При госпитализации было выявлено 86% (19/22) пациентов с гиперфибриногенемией, к 10 суткам их количество снизилось до 54% (12/22) ($p=0,037$). Следует отметить, что гипофибриногенемии (менее 1,5 г/л) не было выявлено ни на одном из сроков наблюдения.

Медиана количества тромбоцитов на 10-е сут не отличалась от таковой в контрольной группе, но превышала ее значение при госпитализации. Следует отметить, что частота встречаемости тромбоцитопении (менее $150 \times 10^9/л$) в оба срока наблюдения была минимальной и составляла 4,5% (1/22) на 1-е сут и 9% (2/22) на 10 сут; тромбоцитоз (более $400 \times 10^9/л$) регистрировали на 10 сут в 2 раза чаще, чем при госпитализации.

Состояние вязкоэластических свойств крови, определяемое методом тромбоэластографии с коагиновым активатором, у пациентов с НКП как при госпитализации, так и к 10 суткам не отличалось от такового в контрольной группе. Проведение корреляционного анализа выявило ассоциативные связи между показателями ТЭГ

(K, α , МА, G) и количеством тромбоцитов ($r=0,53 - 0,63$; $p=0,02-0,007$), а также между МА и Фг ($r=0,49$; $p=0,03$).

Обсуждение. При развитии осложнений COVID-19 гиперкоагуляция является одним из основных патологических состояний, способствующих развитию неблагоприятного исхода. Очевидно, что это нарушение гемостатического статуса отличается от того, которое наблюдается при других видах инфекции, сепсисе или ОРДС. Современные отчеты указывают на клинические проявления как широко распространенного микрососудистого, так и тромбоза крупных сосудов. Накопленные данные подтверждают мнение о том, что гиперкоагуляция SARS-CoV-2 включает уникальный механизм тромбовоспаления, запускаемого вирусной инфекцией, возникающей в легочной сосудистой системе. Кроме того, идентификация биомаркеров тромбоза и тяжелых заболеваний может направлять клиницистов на ранние интервенционные стратегии, а ресурсы здравоохранения – на группу пациентов с высоким риском развития неблагоприятного исхода [7,8].

Одним из современных доступных диагностических маркеров при ассоциированных с COVID-19 нарушениях гемостаза является Д-димер. На сегодняшний день увеличение уровня Д-д рассматривается как одна из наиболее распространенных лабораторных находок, отмеченных у пациентов с COVID-19, которые нуждаются в госпитализации. Трех-четырёх кратное повышение уровня Д-д по сравнению со значениями физиологической нормы является одним из предикторов летального исхода [1]. S. Cui и соавт. [9], изучая частоту развития тромбоэмболических осложнений у пациентов с НКП, показали возможность использования Д-д в качестве прогностического маркера. В частности, для прогнозирования венозной тромбоэмболии пороговое значение Д-д 1,5 мкг/мл обладало чувствительностью 85%, специфичностью – 88,5%, отрицательным прогностическим значением – 94,7%. По мнению авторов, повышение Д-д является одним из наиболее распространенных лабораторных результатов, отмеченных у пациентов с COVID-19, требующих госпитализации.

Повышение содержания Д-д свидетельствует о гиперкоагуляции у пациентов с COVID-19, что может быть объяснено следующими причинами. Во-первых,

вирусные инфекции обычно сопровождаются агрессивной провоспалительной реакцией и недостаточной эффективностью противовоспалительного ответа. Это может вызвать дисфункцию эндотелиальных клеток и избыточную генерацию тромбина [10]. Во-вторых, гипоксия, обнаруженная при COVID-19, может стимулировать тромбоз не только за счет увеличения вязкости крови, но и за счет сигнального пути, зависящего от фактора транскрипции, вызванного гипоксией [11,12]. В-третьих, такие опасные для жизни пациентов осложнения COVID-19 как сепсис и диссеминированное внутрисосудистое свертывание способствуют развитию коагулопатии [13,14]. В-четвертых, особенно тяжелые пациенты с COVID-19 имеют такие факторы риска гиперкоагуляции или тромбоза как пожилой возраст, длительный постельный режим и инвазивное лечение [15].

Гиперкоагуляционное состояние при НКП также обусловлено и повышенной концентрацией фибриногена – предшественника основного субстрата тромбообразования фибрина. Фибриноген относится к белкам острой фазы воспаления, и его изначально повышенный уровень предопределяется основным заболеванием воспалительной природы, при котором потребление фибриногена при формировании микротромбов компенсируется усилением биосинтеза этого белка под действием продуктов его распада, а с другой стороны нарушением его катаболизма в легких [16,17]. Гиперфибриногенемия в сочетании с тромбинемией и угнетением фибринолиза может быть одной из причин прогрессирования микротромбообразования [18].

Проведенные нами исследования показали, что пациенты с НКП имеют не только повышенную прокоагулянтную активность, но и выраженную воспалительную реакцию. Коагуляция и воспаление – это два филогенетически взаимосвязанных процесса. Различные компоненты системы гемостаза, включая тромбоциты, факторы свертывания крови и тромбин являются хемотаксичными для иммунных клеток, а также сами активируются иммунной системой [19,20].

Высокий уровень тромбинемии во время иммунного ответа на инфекцию приводит к гиперпроизводству провоспалительных цитокинов [21]. Хотя основная функция тромбина заключается в том, чтобы стимулировать образование сгустков путем активации тромбоцитов и превращения фибриногена в фибрин, тромбин также оказывает множественные клеточные эффекты и может дополнительно усиливать воспаление через рецепторы, активируемые протеиназой (PAR), главным образом PAR-1. PAR-1 является основным рецептором тромбина и опосредует тромбин-индуцированную агрегацию тромбоцитов, а также взаимодействие между коагуляцией, воспалительными и фиброзными реакциями, которые являются важными аспектами патофизиологии фибропролиферативных заболеваний легких, в том числе и COVID-19 [22].

SARS-CoV-2-индуцированное воспаление вызывает активацию эндотелия за счет связывания коронавируса SARS-CoV-2 с ангиотензин-превращающим ферментом 2 (ACE2), рецептором, экспрессируемым эндотелиальными клетками, а также некоторыми другими клетками. Как активация, так и повреждение эндотелия могут стимулировать тельца Вейбеля-Палада к высвобождению фактора фон Виллебранда (VWF) [23], который наряду с фактором активации тромбоцитов, АДФ, тромбоксаном A₂, простаглицлином, оксидом азота относится к группе

ранних тромборегуляторов, так как влияет на процесс тромбообразования еще до образования тромбина [24]. В дополнение к индуцированной вирусом активации эндотелия, процедуры, которым подвергаются критически больные пациенты, такие как интубация трахеи, искусственная вентиляция легких и катетеризация центральных вен, могут вызывать дальнейшее повреждение эндотелия и повышенный риск коагулопатий [25]. SARS-CoV-2 индукция путей воспаления и коагуляции запускает активацию тромбоцитов. Активные тромбоциты, в свою очередь, связывают нейтрофилы, вызывая лейкоцитарные комплексы тромбоцитов и потенциально способствуя образованию NET [26].

Одним из маркеров субклинического системного воспаления, изменение которого ассоциируется с эндотелиальной дисфункцией и микрососудистыми осложнениями является С-реактивный белок. СРБ представляет собой белок плазмы, продуцируемый печенью и индуцируемый различными медиаторами воспаления, такими как IL-6. Несмотря на не специфичность, этот реагент острой фазы используется клинически в качестве биомаркера при различных воспалительных состояниях. Повышение уровня СРБ связано с увеличением тяжести заболевания [27].

СРБ способен активировать комплемент по «классическому» пути, связываясь с C1q -субъединицей C1-фракции, привлекать в очаг воспаления моноциты, стимулировать транзитоз клетками эндотелия, повышать адгезию и агрегацию тромбоцитов, синтез и экспрессию тканевого фактора эндотелиальными клетками и миоцитами, снижать активность ингибитора пути тканевого фактора, усиливать апоптоз эндотелиоцитов, а также стимулировать образование эндотелиальных микровезикул, составляющих в сосудистом русле пул биоактивных эффекторов, вовлеченных в тромбоз, воспаление, сосудистый тонус и ангиогенез крови [28].

Исследования, посвященные изучению содержания СРБ у пациентов с COVID-19, свидетельствуют о том, что СРБ является информативным показателем, отражающим наличие, тяжесть и исход инфекции COVID-19 [29-31].

По мнению С. Тап и соавт. [32], СРБ является хорошим дополнением к компьютерной томографии при оценке степени поражения легких. По сравнению со скоростью оседания эритроцитов (СОЭ) СРБ является более чувствительным биомаркером при оценке развития заболевания.

Количество тромбоцитов имеет значение для оценки состояния тяжести пациента и является независимым фактором риска смерти от COVID-19 [33]. Как тромбоцитоз, так и тромбоцитопения регистрируются при COVID-19. В настоящее время рассматриваются следующие механизмы развития тромбоцитопении в результате воздействия SARS-CoV-2. Возможно непосредственное инфицирование клеток-предшественников гемопоэза и ингибирование их роста. CD 13 и CD66a экспрессируются на клетках CD34 + костного мозга человека. SARS-CoV-2 может вызывать торможение роста путем связывания с CD13 или CD66a гемопоэтических клеток и стромальных клеток костного мозга, что приводит к аномальному кроветворению и иммунодефициту [34]. Также иммуноопосредованное повреждение гемопоэтических стволовых клеток приводит к дальнейшему развитию тромбоцитопении. Помимо этого, повышенная функциональная активность тромбоцитов,

коагулопатия, характеризующаяся повышением Д-д и Фг, могут способствовать при иммунопатологическом повреждении легких потреблению тромбоцитов и мегакариоцитов [35].

Негативное влияние на состояние пациентов при COVID-19 оказывает и тромбоцитоз. В ретроспективном анализе 30 пациентов, госпитализированных с COVID-19, R.Qi и соавт. [36] показали, что пациенты со значительно более высоким количеством тромбоцитов во время лечения имели более длительную среднюю продолжительность госпитализации. Аналогичным образом, в другом исследовании было показано, что умершие пациенты с COVID-19 имели более высокий средний уровень тромбоцитов при поступлении, чем выжившие [37]. Предполагается, что повышенное количество тромбоцитов может быть индикатором «цитокинового шторма». Различные цитокины, такие как ИЛ-3, ИЛ-6, ИЛ-9, ИЛ-11 могут стимулировать выработку мегакариоцитов, а ИЛ-6 может напрямую стимулировать тромбопоэз [38]. При повреждении эндотелия происходит высвобождение vWF, который взаимодействуя с мегакариоцитами посредством передачи сигналов GPIb-vWF, увеличивает продукцию тромбоцитов [39] и усиливает мегакариоцитоз в легких [40].

Отсутствие изменений вязко-эластических свойств крови по данным тромбоэластографии с коагином свидетельствует об актуальности вопроса диагностической значимости и информативности данного вида исследования у пациентов с COVID-19.

Анализ данных литературы свидетельствует, что гиперкоагуляция у тяжелых пациентов с COVID-19, находясь в ОРИТ, была обусловлена выраженной гиперфибриногенемией (более 7,0 г/л) и подъемом концентрации Д-д свыше 5,0 мг/л и подтверждена данными как тромбоэластографии, так и тромбоэластометрии [41,42]. Одной из возможных причин разногласий данных исследований с результатами, полученными нами, является то, что мы изучали вязко-эластические свойства крови у пациентов с менее выраженной гиперкоагуляцией и тяжесть состояния пациентов не требовала нахождения в ОРИТ. Кроме того, необходимо учитывать, что метод тромбоэластографии имеет ряд ограничений. К ним относятся невозможность оценки вклада в состояние гемостаза сосудистой стенки и влияние гематокрита на вязко-эластические свойства крови. Прямые эффекты анемии, а не нарушение тромбина и антитромбина, могут объяснить результаты увеличения MA и -angles после гемодилюции. Низкий уровень гематокрита ухудшает кровотечение *in vivo*, но улучшает переменные TEG *in vitro*, поэтому результаты TEG следует интерпретировать с учетом тяжести анемии и гемодилюции [43-46].

Заключение. Таким образом, у пациентов с НКП регистрируется повышенный уровень Д-димера, С-реактивного белка и фибриногена, свидетельствующих о повышенной протромботической активности и выраженной воспалительной ответе. На фоне лечения отмечается снижение содержания Д-д, СРБ и Фг, что отражает положительную динамику в коагуляционном статусе и выраженности воспалительной реакции. Изменений вязко-эластических свойств крови по данным тромбоэластографии с коагином у пациентов с НКИ выявлено не было.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-3, 5-16, 19-23, 25-45
см. REFERENCES)

4. Бицадзе В.О., Хизроева Д.Х., Макацария А.Д., Слуханчук Е.В., Третьякова М.В., Риццо Д. и др. COVID-19, септический шок и синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови. Часть 1. *Вестник РАМН*. 2020;75(2):118–28. doi: 10.15690/vramn1335.
17. Преснякова М.В., Сидоркина А.Н., Сидоркин В.Г. Нарушения системы гемостаза в острый период ожоговой болезни. *Тромбоз, гемостаз и реология*. 2005; 3: 44.
18. Чурляев Ю.А., Лычев В.Г., Епифанцева Н.Н. и др. Диагностика и лечение ДВС-синдрома у больных с тяжелой черепно-мозговой травмой. *Анестезиология и реаниматология*. 1995; 4: 29-32.
24. Зубаиров Д. М., Зубаирова Л. Д. Микровезикулы в крови. Функции и их роль в тромбообразовании: монография. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2009.

REFERENCES

1. Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020 Feb 15;395(10223):497-506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
2. Guan W.J., Ni Z.Y., Hu Y., Liang W.H., Ou C.Q., He J.X. et al. China Medical Treatment Expert Group for Covid-19. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. N. Engl. J. Med.* 2020; 382:1708-1720 doi: 10.1056/NEJMoa2002032.
3. Heymann D.L., Shindo N. COVID-19: what is next for public health? *Lancet*. 2020; 395 (10224): 542-5. <https://doi.org/10.1016/S0140-6736>.
4. Bitsadze V.O., Khizroeva D.Kh., Makacariya A.D., Slukhanchuk E.V., Tret'yakova M.V., Ricco D. et al. COVID-19, septic shock and disseminated intravascular coagulation syndrome. Part 1. *Vestnik RAMN*. 2020;75(2):118–28. doi: 10.15690/vramn1335. (in Russian)
5. Klypa T.V., Bychinin M.V., Mandel I.A., Andreichenko S.A., Minets A.I., Kolyshkina N.A. et al. Clinical Characteristics of Patients Admitted to an ICU with COVID-19. Predictors of the Severe Disease. *Journal of Clinical Practice*. 2020;11(2):XX–XX. doi: 10.17816/clinpract34182.
6. Walsh M., Moore E.E., Moore H., Thomas S., Lune S.V., Zimmer D. et al. Use of viscoelastography in malignancy-associated coagulopathy and thrombosis: a review. *Semin. Thromb. Hemost.* 2019; 45(04):354–72. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1688497>.
7. Abou-Ismaïl M.Y., Diamond A., Kapoor S., Arafah Y., Nayak L. The hypercoagulable state in COVID-19: Incidence, pathophysiology, and management. *Thromb. Res.* 2020;194:101-115. doi: 10.1016/j.thromres.2020.06.029.
8. McGonagle D., O'Donnell J.S., Sharif K., Emery P., Bridgewood C. Immune mechanisms of pulmonary intravascular coagulopathy in COVID-19 pneumonia. *Lancet Rheumatol.* 2020 Jul;2(7):e437-e445. doi: 10.1016/S2665-9913(20)30121-1.
9. Cui S., Chen S., Li X., Liu S., Wang F. Prevalence of venous thromboembolism in patients with severe novel coronavirus pneumonia. *J. Thromb. Haemost.* 2020 Jun;18(6):1421-1424. doi: 10.1111/jth.14830.
10. Levi M., van der Poll T. Coagulation and sepsis. *Thromb. Res.* 2017;149:38-44. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2016.11.007>.
11. Gupta N., Zhao Y.Y., Evans C.E. The stimulation of thrombosis by hypoxia. *Thromb. Res.* 2019; 181:77-83. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2019.07.013>.
12. Tang N., Bai H., Chen X., Gong J., Li D., Sun Z. Anticoagulant treatment is associated with decreased mortality in severe coronavirus disease 2019 patients with coagulopathy. *J. Thromb. Haemost.* 2020; 18:1094-9. <https://doi.org/10.1111/jth.14817>.
13. Tang N., Li D., Wang X., Sun Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J. Thromb. Haemost.* 2020; 18:844-847. <https://doi.org/10.1111/jth.14768>.
14. Iba T., Levy J.H., Warkentin T.E., Thachil J., van der Poll T., Levi M. Scientific and Standardization Committee on DIC, and the Sci-

- entific and Standardization Committee on Perioperative and Critical Care of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Diagnosis and management of sepsis-induced coagulopathy and disseminated intravascular coagulation. *J. Thromb. Haemost.* 2019; Nov;17(11):1989-1994. doi: 10.1111/jth.14578.
15. Hess K., Grant P.J. Inflammation and thrombosis in diabetes. *J. Thromb. Haemost.* 2011; 105(Suppl 1):S43-54. doi: 10.1160/THS10-11-0739.
16. Fuller G.M., Otto J.M., Woloski B.M., McGary C.T., Adams M.A. The effects of hepatocyte stimulating factor on fibrinogen biosynthesis in hepatocyte monolayers. *J. Cell Biol.* 1985; Oct;101(4):1481-6. doi: 10.1083/jcb.101.4.1481.
17. Presnyakova M.V., Sidorkina A.N., Sidorkin V.G. Violations of the hemostasis system in the acute period of burn disease. *Tromboz, gemostaz i reologiya.* 2005; 3: 44. (in Russian)
18. Churlyayev Yu.A., Lychev V.G., Epifantseva N.N. et al. Diagnosis and treatment of disseminated intravascular coagulation in patients with severe traumatic brain injury. *Anesteziologiya i reanimatologiya.* 1995; 4: 29-32. (in Russian)
19. Thachil J., Agarwal S. Understanding the COVID-19 coagulopathy spectrum. *Anaesthesia.* 2020; Nov;75(11):1432-1436. doi: 10.1111/anae.15141.
20. Conway E.M. Reincarnation of ancient links between coagulation and complement. *J. Thromb. Haemost.* 2015; 13 (Suppl 1): 121-32. doi: 10.1111/jth.12950.
21. Jose R.J., Manuel A. COVID-19 cytokine storm: the interplay between inflammation and coagulation. *Lancet. Resp. Med.* 2020; Apr 27. (Article (in press). doi:[https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30216-2](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30216-2)).
22. Assinger A. Platelets and infection – an emerging role of platelets in viral infection. *Front Immunol.* 2014; Dec 18;5:649. doi: 10.3389/fimmu.2014.00649.
23. Escher R., Breakey N., Lämmle B. Severe COVID-19 infection associated with endothelial activation. *Thromb. Res.* 2020; 190:62. doi:10.1016/j.thromres.2020.04.014.
24. Zubairov D.M., Zubairova L.D. Microvesicles in blood. Functions and their role in thrombus formation: monograph.[Mikrovezikuly v krovi. Funktsii i ikh rol' v tromboobrazovanii (monografiya). Moscow: GEOTAR-Media; 2009. (in Russian)
25. Terpos E., Ntanasis-Stathopoulos I., Elalamy I., Kastritis E., Sergentanis T.N., Politou M. et al. Hematological findings and complications of COVID-19. *Am. J. Hematol.* 2020. doi:10.1002/ajh.25829.
26. Barnes B.J., Adrover J.M., Baxter-Stoltzfus A., Boreczuk A., Cools-Lartigue J., Crawford J.M. et al. Targeting potential drivers of COVID-19: neutrophil extracellular traps. *J. Exp. Med.* 2020; 217(6). doi:10.1084/jem.20200652.
27. Gong J., Dong H., Xia S.Q., Huang Y.Z., Wang D., Zhao Y. et al. Correlation Analysis Between Disease Severity and Inflammation-related Parameters in Patients With COVID-19 Pneumonia. *medRxiv.* 2020.02.25.20025643. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.02.25.20025643>.
28. Domingueti C.P., Fóscolo R.B., Reis J.S., Campos F.M., Dusse L.M., Carvalho Md. et al. Association of Haemostatic and Inflammatory Biomarkers with Nephropathy in Type 1 Diabetes Mellitus. *J. Diabetes Res.* 2016;2016:2315260. doi: 10.1155/2016/2315260.
29. Qin C., Zhou L., Hu Z., Zhang S., Yang S., Tao Y. et al. Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clin. Infect. Dis.* 2020 Jul 28;71(15):762-768. doi: 10.1093/cid/ciaa248.
30. Liu F., Li L., Xu M., Wu J., Luo D., Zhu Y. et al. Prognostic value of interleukin-6, C-reactive protein, and procalcitonin in patients with COVID-19. *J. Clin. Virol.* 2020; Jun;127:104370. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104370.
31. Ji W., Bishnu G., Cai Z., Shen X. Analysis Clinical Features of COVID-19 Infection in Secondary Epidemic Area and Report Potential Biomarkers in Evaluation. *medRxiv.* 2020.03.10.20033613; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.10.20033613>
32. Tan C., Huang Y., Shi F., Tan K., Ma Q., Chen Y. et al. C-reactive protein correlates with computed tomographic findings and predicts severe COVID-19 early. *J. Med. Virol.* 2020; 92:856-862. <https://doi.org/10.1002/jmv.2587>
33. Liu Y., Sun W., Guo Y., Chen L., Zhang L., Zhao S., Long D. et al. Association between platelet parameters and mortality in coronavirus disease 2019: Retrospective cohort study. *Platelets.* 2020; May 18;31(4):490-496. doi: 10.1080/09537104.2020.1754383.
34. Yang M., Ng M.H., Li C.K. Thrombocytopenia in patients with severe acute respiratory syndrome (review). *Hematology.* 2005; 10:101–105. doi:10.1080/10245330400026170.
35. Xu Z., Shi L., Wang Y., Zhang J., Huang L., Zhang C. et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir. Med.* 2020;8(4):420-422. doi:10.1016/S2213-2600(20)30076-X.0.
36. Qu R., Ling Y., Zhang Y.H.Z., Wei L-Y, Chen X., Li X. et al. Platelet-to-lymphocyte ratio is associated with prognosis in patients with coronavirus disease-19. *J. Med. Virol.* 2020; Sep;92(9):1533-1541. doi:10.1002/jmv.25767.
37. Yang X., Yu Y., Xu J., Shu H., Xia J., Liu H. et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. *Lancet Respir. Med.* 2020; 8:475 – 481. doi:10.1016/S2213-2600(20)30079-5.
38. Behrens K., Alexander W.S. Cytokine control of megakaryopoiesis. *Growth Factors.* 2018; 36(3 – 4):89 – 103. doi:10.1080/08977194.2018.1498487.
39. Yamamoto K., De Waard V., Fearn C., Loskutoff D.J. Tissue distribution and regulation of murine von Willebrand factor gene expression in vivo. *Blood.* 1998;92(8):2791 – 2801.
40. Lefrançais E., Ortiz-Muñoz G., Cadrillier A., Mallavia B., Liu F., Sayah D.M. et al. The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature.* 2017; 544(7648):105 – 109. doi:10.1038/nature21706.
41. Panigada M., Bottino N., Tagliabue P., Grasselli G., Novembrino C., Chantarangkul V. et al. Hypercoagulability of COVID-19 patients in Intensive Care Unit. A report of thromboelastography findings and other parameters of hemostasis. *J. Thromb. Haemos.* 2020 [Epub ahead of print]. <https://doi.org/10.1111/jth.14850>.
42. Ranucci M., Ballotta A., Di Dedda U., Bayshnikova E., Dei Poli M., Resta M. et al. The procoagulant pattern of patients with COVID-19 acute respiratory distress syndrome. *J. Thromb. Haemost.* 2020 Jul;18(7):1747-1751. doi: 10.1111/jth.14854.
43. Chitlur M., Sorensen B., Rivard G.E., Young G., Ingerslev J. et al. Standardization of thromboelastography: a report from the TEG-ROTEM working group. *Haemophilia.* 2011 May;17(3):532-7. doi: 10.1111/j.1365-2516.2010.02451.x.
44. Brooks A., Guillaumin J., Cooper E., Couto C. Effects of hematocrit and red blood cell-independent viscosity on canine thromboelastographic tracings. *Transfusion.* 2014; 54: 727-34. doi:10.1111/trf.12354.
45. Bolliger D., Seeberger M., Tanaka K. Principles and practice of thromboelastography in clinical coagulation management and transfusion practice. *Transfus. Med. Rev.* 2012; 26(1): 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2011.07.005>.

ОБЩЕКЛИНИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Тимашева Г.В., Валеева Э.Т., Масыгутова Л.М., Каримова Л.К., Бакиров А.Б., Репина Э.Ф.

РАННИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ И ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ НАРУШЕНИЯ ЗДОРОВЬЯ У РАБОТНИКОВ ХИМИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСА

ФБУН «Уфимский научно-исследовательский институт медицины труда и экологии человека», 450106, Уфа, Россия

Производство синтетических материалов – стекловолокна и резиновых изделий, продукция на основе отходов нефтепереработки, продолжает возрастать. Характерной особенностью условий труда данных предприятий является содержание химических веществ 1-4 класса опасности, которые могут являться потенциально опасными для работников. Представляется актуальным обоснование донозологических лабораторных критериев нарушения здоровья у работников производств. Представлены результаты изучения гематологических, биохимических, иммунологических и цитохимических показателей крови у работающих данных производств. У значительной доли обследованных работников обнаружены выраженные изменения в процессах окислительного метаболизма, липидного обмена, нарушения в иммунном статусе, в активности внутриклеточных ферментов. Изменения выявлялись у работников даже при небольшом стаже работы (5 лет) и молодом возрасте (20-30 лет). С увеличением стажа работы на производствах частота этих нарушений возрастала. На основании полученных результатов обоснованы ранние диагностические и прогностические критерии нарушения здоровья у работников различных химических производств. Для работников производства резиновых изделий: повышение уровня малонового диальдегида, понижение активности каталазы; гиперферментемия (AST, ALT, ГТТ), диспротеинемия, эритропения, снижение уровня гемоглобина, ретикулоцитоз, повышение CD3+, CD4+, CD16+, понижение CD19+, ФАЛ, повышение IgM, понижение IgA. Для работников производства стекловолокна: показатели окислительно-антиоксидантной системы, гемограммы – лимфоцитоз, эритроцитоз, лейкоцитоз понижение CD3+, повышение CD4+, CD16+, CD20+, ФАЛ, IgG, повышение общего белка, гиперферментемия (ГТТ, АЛТ), изменение активности внутриклеточных ферментов – кислой фосфатазы нейтрофилов и лимфоцитов, понижение миелопероксидазы, повышение уровня гликогена. Для работников производства оксидов олефинов – это гиперферментемия (ALT, ЩФ), изменения белкового обмена, повышение эритроцитов, ретикулоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов, эозинофилов, тромбоцитов, лейкопения, понижение ФАЛ, дисиммуноглобулинемия (повышение IgM, понижение IgA, IgG), изменения внутриклеточного метаболизма – снижение миелопероксидазы, повышение кислой фосфатазы нейтрофилов и лимфоцитов.

Ключевые слова: химические производства; лабораторные исследования; показатели окислительного метаболизма; маркеры ранних нарушений.

Для цитирования: Тимашева Г.В., Валеева Э.Т., Масыгутова Л.М., Каримова Л.К., Бакиров А.Б., Репина Э.Ф. Ранние диагностические и прогностические критерии нарушения здоровья у работников химического комплекса. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65(12): 750-756. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-12-750-756>

Timasheva G.V., Valeeva E.T., Karimova L.K., Masyagutova L.M., Bakirov A. B. Repina E.F.

EARLY DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC CRITERIA FOR HEALTH DISORDERS IN CHEMICAL WORKERS

Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology, 450106, Ufa, Russia

The production of synthetic materials – fiberglass and rubber-technical products, as well as products derived from oil refining wastes continues to grow. A characteristic feature of the working conditions of these enterprises is the content of chemicals of hazard class 1-4, which may be potentially hazardous to workers. It is imperative to justify prenosological laboratory criteria for health problems of manufacturing workers. The results of the hematological, biochemical, immunological and cytochemical parameters among manufacturing workers are presented. Significant changes in the processes of oxidative metabolism, lipid metabolism, impaired immune status, and intracellular enzyme activity were found in a significant proportion of the workers. Changes were detected in workers even with a short work experience (5 years) and of young age (20-30 years). With an increase in the occupational length of service, the frequency of these disorders increased. Based on the results obtained, early diagnostic and prognostic criteria for health disorders in workers of diverse chemical industries are substantiated. Based on the results obtained, early diagnostic and prognostic criteria for health disorders in workers of diverse chemical industries are substantiated.

For rubber manufacturing workers: increased malonic dialdehyde, reduced catalase activity, the activity of catalase is lowering; increased enzymes activity (AST, ALT, GGT), protein abnormalities, erythropenia, decreased hemoglobin levels, increased reticulocyte. For fiber glass manufacturing workers: indicators of the oxidative antioxidant system, hemograms – increased lymphocytes, erythrocytosis, leukocytosis, increased CD3 +, increased CD4 +, CD16+, CD20 +, FAL, IgG, increased total protein, hyperfermentemia (GGT, ALT), changes in the intracellular enzymes activity – acid phosphatase of neutrophils and lymphocytes, decreased myeloperoxidase, increased glycogen levels. For olefin oxides manufacturing workers – this is hyperfermentemia (ALT, alkaline phosphatase), protein metabolism changes, increased red blood cells, reticulocytes, neutrophils, lymphocytes, eosinophils, platelets, leucopenia, decreased FAL, increased IgM, decreased IgA, IgG, changes in the intracellular enzymes activity – decrease myeloperoxidase, increase acid phosphatase of neutrophils and lymphocytes.

Key words: chemical production; laboratory studies; indicators of oxidative metabolism; markers of early disorders.

Для корреспонденции: Тимашева Гульнара Вильевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. отдела токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных; e-mail: gulnara-vt60@yandex.ru

For citation: Timasheva G.V., Valeeva E.T., Masyagutova L.M., Karimova L.K., Bakirov A. B., Repina E.F. Early diagnostic and prognostic criteria for health disorders in chemical workers. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65(12): 750-756 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-12-750-756>

For correspondence: *Timasheva G.V.*, Sci. Biol, Lead Researcher of the Department of Toxicology and Genetic with an experimental clinic of laboratory animals; e-mail: gulnara-vt60@yandex.ru

Information about author:

Timasheva G.V., <http://orcid.org/0000-0003-2435-6939>;
Valeeva E.T., <https://orcid.org/0000-0002-9146-5625>;
Masyagutova L.M., <https://orcid.org/0000-0003-0195-8862>;
Karimova L.K., <http://orcid.org/0000-0003-2435-6939>;
Bakirov A. B., <https://orcid.org/0000-0003-3510-2595>;
Repina E.F., <https://orcid.org/0000-0001-8798-0846>.

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 22.05.2020
Accepted 04.07.2020

Введение. Химический комплекс включает как производство синтетических материалов (стекловолокно и резино-техническая продукция), так и выпуск продукции, получаемой на основе отходов нефтепереработки и попутного газа, что отражено в общероссийском классификаторе видов экономической деятельности (ОКВЭД). Характерной особенностью условий труда всех предприятий химического комплекса является содержание большого разнообразия веществ 1-4 класса опасности, используемых в технологии производства. Зачастую, полученные конечные и промежуточные продукты производства могут являться потенциально опасными для работников изученных производств [1–6].

Несомненно, развитие отрасли сопряжено с увеличением рабочих мест и, соответственно, работников, подверженных воздействию неблагоприятных факторов производства, что настоятельно требует разработки алгоритмов ранней донозологической диагностики нарушений как профессионального, так и общего здоровья [7–12].

Каждое из изученных производств имеет свою, присущую лишь ему специфическую, технологическую обусловленную особенность. В производстве резинотехнических изделий наиболее значительному воздействию неблагоприятных факторов подвержены работники основных профессий, которые испытывают интермиттирующее, комбинированное воздействие бензина, хлорорганических углеводородов (дихлорметан и дихлорэтан), с многократным превышением гигиенических нормативов «пиковых» концентраций, в соответствии этого условия труда аппаратчиков соответствуют классу 3.3 [2, 13].

Наиболее опасными химическими соединениями рабочей зоны производства стекловолокна являются пыль стекла и стекловолокна, фенол-формальдегидные смолы, эпоксидные смолы, метилоксиран, эпихлоргидрин, триэтанолламин, входящие в состав замазливателей. Проведенная ранее гигиеническая оценка условий труда в производстве стекловолокна относит рабочие места операторов по химическому фактору к классу 3.2; по интенсивности воздействия производственного шума (с превышением предельно допустимых уровней на 3-10 дБА) – к классу 3.1 – 3.2. Таким образом, общая гигиеническая оценка условий труда данной группы работников соответствует третьей степени вредного класса – 3.3. [3, 6, 14].

На рабочих местах операторов синтеза оксидов олефинов присутствуют этилен, пропилен, окись этилена

и пропилен, условия труда операторов соответствовали вредному классу третьей степени – 3.3 [12,15].

Понимание механизмов формирования и динамики патологического процесса, формирующегося при воздействии комплекса неблагоприятных факторов производства, способствует переходу к донозологическому подходу оценки здоровья, т.е. выявлению начальных, еще обратимых изменений в организме [1,2,16]. Диагностические критерии должны быть обоснованы изучением ранних метаболических нарушений, характерных для развития заболеваний, в том числе, обусловленных профессиональными факторами [16 – 19].

Цель работы: обоснование комплекса диагностических мероприятий и прогностических критериев на основе оценки ранних метаболических сдвигов в целях своевременной разработки профилактических мероприятий для работников различных химических производств.

Материал и методы. Для оценки метаболических нарушений были сформированы следующие группы:

1. Работники производства стекловолокна – 257 человек. Операторы производства стекловолокна составили основную группу – 137 лиц, среди которых стаж 0-5 лет имели 16,8%, 6-10 лет – 37,9%, 11-15 лет – 15,3%, более 15 лет – 13,9% лиц; в возрасте 20-29 лет были 17,8%, 30-39 лет – 24,2%, 40-49 лет – 34,9% и 50 лет и старше – 23,1% лиц. Группа контроля – 120 работников предприятия: контролеры, транспортировщики, слесари, не имеющие контакта с профессиональными вредностями.

2. Работники производства резиновых изделий – 370 человек: 210 человек (56,8%) женщины, по профессии клейщики, и 160 мужчин по профессии шпринг-машинисты, распределение по стажу: у 17,8% – стаж 6-10 лет, у 59,5% – стаж 11-15 лет, у 22,7% – стаж более 15 лет и более; в возрасте 40-49 лет находилась почти половина работающих 47,0%, 30-39 лет – 22,0%, 50 лет и старше – 20,9% и 20-29 лет – 10,1% лиц. В группу контроля входили 130 контролеров отдела технического контроля (ОТК).

3. Работники производства олефинов – 365 человек. Основной профессиональной группой являлись аппаратчики. Контингент распределился по стажу и возрасту следующим образом: стаж 0-5 лет имели 18,5%, 6-10 лет – 20,0%, 11-15 лет – 23,4% и более 15 лет – 38,1%; в возрасте 20-29 лет находилось 17,8%, 30-39 лет – 24,9%, 40-49 лет – 35,0% и 50 лет и старше – 23,1% лиц. В группу сравнения входили слесари КИПиА.

Группы сравнения в каждом производстве были сопоставимы по возрасту и стажу с лицами основных производственных.

Комплекс лабораторных исследований:

– Оценка параметров ферментативного звена антиоксидантной системы проведена по уровню активности каталазы, процессов перекисного окисления липидов по содержанию малонового диальдегида (МДА) в сыворотке крови;

– Анализ липидного профиля по содержанию общего холестерина (ОХ); триглицеридов (ТГ); холестерина липопротеидов высокой плотности (ХС ЛПВП), холестерина липопротеидов низкой плотности (ХС ЛПНП) в сыворотке крови, а также расчет индекса атерогенности (ИА);

– Изучение функционального состояния печени проведено по активности аспаратаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), содержанию билирубина и его фракций щелочной фосфатазы (ЩФ), γ -глутамилтрансферазы (ГГТ). Оценка иммунного статуса проведена по уровню содержания популяций лимфоцитов (CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD19+), их фагоцитарной активности, содержанию иммуноглобулинов мажорных групп (Ig A, M, G) в сыворотке крови;

– Анализ функционального состояния клеточных органелл проведен по уровню кислой и щелочной фосфатазы и миелопероксидазы в нейтрофилах, а также гликогена в нейтрофилах и лимфоцитах крови.

Все использованные методики лабораторной диагностики стандартизированы, унифицированы, проведены с использованием коммерческих тест-систем и наборов. [20-22].

Статистическая обработка результатов исследований проведена с использованием пакета прикладных программ «Statistica for Windows»; для определения лабораторных маркеров ранних нарушений обмена у обследованных работников рассчитаны средние величины показателей, достоверность (t) и уровень значимости (p) при сравнении показателей между профессиональными группами, определены уровень и частота отклонений лабораторных показателей от нормативных.

Результаты и обсуждение. Изучение показателей гомеостаза у работников различных производств химического комплекса выявило значительные изменения со стороны гематологических, биохимических, иммунологических, цитохимических показателей.

Анализ частоты отклонений гематологических показателей у работников в производстве оксидов олефинов выявил, что чаще всего определялось повышение среднего числа эритроцитов (32,5–24,6–26,5%), лейкоцитов (20,1–16,8–7,8%), моноцитов (22,3–16,7–23,4%), тромбоцитов (16,4–23,1–18,7%), соответственно в группах аппаратчиков, слесарей-ремонтников и слесарей КИПиА. При этом, только у аппаратчиков выявлено достоверное увеличение числа лиц с эритроцитозом в зависимости от стажа работы (0-5 лет – 37,28±6,29% и 11-15 лет – 23,0±3,95%, соответственно, $p<0,05$), что можно объяснить развитием адаптационно-компенсаторных реакций кровяной системы в ответ на воздействие комплекса токсических веществ на начальном этапе работы на производстве.

В производстве резино-технических изделий у работников выявлялись признаки анемии, статистически значимые по сравнению с группой контроля (у 11,9%-эритропения, $p<0,05$; у 11,2% – понижение уровня ге-

моглобина; $p<0,01$; лейкопения у 5,2% работников; $p<0,05$), что вероятно вызвано нарушением процессов гемопоэза как результат воздействия бензола на процессы кроветворения с последующим развитием депрессии. Оценка регенераторной активности костного мозга на фоне воздействия токсичных продуктов производства по количеству ретикулоцитов свидетельствует о повышении данного показателя у 3,85% обследованных работников в стажевой группе от 6 до 10 лет и в 5,4% случаев в стажевой группе более 15 лет.

У работников основной группы производства стекловолокна выявлено статистически достоверное ($p<0,05$, относительно работников группы сравнения) снижение содержания гемоглобина – у 30,8%; у 12,8±2,4% лиц наблюдалось повышение уровня лейкоцитов, в 8,2±1,9% случаев отмечено повышение СОЭ, число нейтрофилов было увеличено у 24,1±3,1%, лимфоцитов в 16,4±2,7% и эритроцитов у 9,2±2,1% обследованных. Следует отметить, что различия в частоте отклонений были статистически значимыми относительно группы сравнения ($p<0,05$). С увеличением длительности контакта с вредными производственными химическими факторами возрастает и доля работников с повышенным количеством эритроцитов и пониженным содержанием гемоглобина, что свидетельствует о возможном избирательном специфическом характере воздействия токсических веществ, циркулирующих в производственном цикле.

Воздействие комплекса вредных веществ на организм клейщиков резиновых изделий и операторов стекловолокна характеризуется нарушением баланса между интенсивностью свободно-радикальных процессов и активностью антиоксидантной системы. Так, по нашим данным, повышенное содержание малонового диальдегида установлено у 63,6±6,5% клейщиков и 41,3±6,5% шпринг-машинистов. В контрольной группе данный показатель демонстрировал превышение в 19,9±5,3% у обследованных лиц ($p<0,001$).

Одновременно определялись нарушения ферментативного звена: снижение уровня каталазы обнаружено у 87,2±4,5% клейщиков, 43,1±6,5% – шпринг-машинистов, что также достоверно чаще, чем у лиц контрольной группы – 17,5±5,0% ($p<0,001$). Проведенный анализ позволил установить наличие прямой корреляционной связи между стажем работы на производстве и содержанием малонового диальдегида и ($r>0,7$, $p=0,005$) у работников данных профессиональных групп.

Аналогичные изменения определялись у работников производства стекловолокна. Выявлено увеличение содержания продуктов ПОЛ у 76,6%±3,6% операторов непрерывного стекловолокна, начиная с ранних этапов воздействия производственных факторов – до 5 лет (45,5%±3,8%; $p<0,001$), наряду со снижением активности каталазы у 35,0%±4,0% обследованных основных профессиональных групп. Обнаруженные изменения могут служить показателями формирования латентной эндогенной интоксикации и развиваться в результате дисбаланса в системе «оксиданты-антиоксиданты».

При изучении функционального состояния печени установлены изменения активности индикаторных ферментов (ГГТ, ЛДГ, АлАТ, ЩФ), особенно выраженные у работников производства резино-технических изделий (табл. 1). Так, наиболее часто изученные показатели демонстрировали тенденцию к превышению в профессиональной группе клейщиков и шпринг-машинистов по

сравнению с группой контроля ($p<0,05$): у 31,3% – повышена активность ЛДГ; у 20,2%- АСТ и 16,9% – ГГТ. Частота гиперферментемии у клейщиков нарастала и при стаже 11-15 лет обнаруживалась у 42,2% лиц. Следует отметить, что дискинезия желчевыводящей системы диагностирована у 33,3% клейщиков и 30% шпреди́нг-машинистов (в группе сравнения – 18,4%, $p<0,01$)

Аналогичные изменения выявлены у операторов производства стекловолно́кна – гиперферментемия обнаружена от 6,9 до 22% (табл. 1). Повышение активности индикаторных ферментов, характеризующее цитолитический синдром, свидетельствует об обтурационных и воспалительных явлениях в печени. Отклонения в функциональном состоянии печени не сопровождалась клинической симптоматикой болезней гепатобилиарной системы у значительной части обследованных работников и возможно, обусловлены неблагоприятным воздействием факторов производственной среды на функциональное состояние печени.

Оценка показателей, характеризующих белково-синтетическую функцию печени, свидетельствует об умеренном снижении и преимущественно токсическом генезе нарушений белкового обмена у обследованных работников. В профессиональных группах клейщиков (8,1%) производства резиновых изделий выявлено повышение общего белка, что отразилось и на содержании белковых фракций: гипоальбуминемия обнаружена у 5,6% лиц, α -1-, α -2- γ -глобулиновые фракции превышали физиологические нормы у 4,2; 5,6% соответственно, определялось снижение альбумино-глобулинового коэффициента (табл. 1).

Нарушения со стороны липидного обмена у большинства работников всех изученных производств проявлялись значительно повышенными концентрациями

липидов так называемого «атерогенного профиля»: холестерина липопротеинов низкой плотности (28,5-58,6%), триглицеридов (21,1-23,4%), общего холестерина (33,1-62,7%), индекса атерогенности в 1,1-1,5 раза на фоне выраженного понижения содержания «неатерогенных» фракций: холестерина липопротеинов высокой плотности (26,7-40,6%). Достоверно чаще изменения липидного профиля диагностировались у работников основных профессий ($p<0,001$).

Установлено, что частота изменений липидного спектра у работников производства непрерывного стекловолно́кна нарастала в зависимости от стажа работы. Даже несмотря на молодой возраст и незначительный стаж работы, у каждого второго оператора производства (0-5 лет) обнаружено повышение уровня общего холестерина (52,1 %), у 39,1% понижение уровня α -холестерина. При стаже более 15 лет 81% лиц имели пограничные и повышенные значения общего холестерина, у 51,1% обнаружен пониженный уровень холестерина ЛПВП.

Аналогичная зависимость от стажа работы нарушений липидного обмена определялась у клейщиков резино-технических изделий, аппаратчиков производства оксидов олефинов. Число работников-клейщиков с нарушениями липидного обмена возрастало с увеличением стажа работы. При стаже до 5 лет у 25 % лиц был выявлен повышенный уровень ОХ и пониженный уровень ХС ЛПВП, у 16,7 % лиц – повышенные значения ТГ, у 36,4% увеличено содержание ХС ЛПНП, у 44,5 % повышен ИА. При стаже более 15 лет: уровень ОХ повышен у 74,2%, ХС ЛПНП – у 76,7%; ТГ- у 25,5%, ИА у 75%, ХС ЛПВП понижен у 48,5%.

Связь нарушений липидного спектра в зависимости от стажа работы и профессии свидетельствует о возможной «атерогенной» перестройке крови, ослаблении

Таблица 1

Отклонения биохимических показателей у работников различных производств (M±m)

Показатели	Производства, профессия					
	Резиновые изделия		Непрерывное стекловолно́кно		Оксиды олефинов	
	Клейщики	Группа сравнения	Операторы	Группа сравнения	Аппаратчики	Группа сравнения
ОХ, ммоль/л	62,7±4,5*	34,6±4,1	58,3±4,2*	27,3±4,0	33,1 ± 1,5*	18,70± 4,87
ХС ЛПВП, ммоль/л	40,6±5,8*	24,0±3,8	38,6±4,1*	24,0±3,8	26,7 ± 2,4*	14,0 ± 4,87
ТГ, ммоль/л	21,5±3,7*	14,5±3,2	21,1±3,5*	14,5±3,2	23,4 ± 2,7*	1,4 ± 0,3
ХС ЛПНП, ммоль/л	58,63±5,9*	28,9±3,9	58,2 ± 3,5*	27,3±4,0	28,5±3,9*	13,4±2,7
ИА, ед.	79,0 ± 2,7*	40,0±4,3	46,2 ± 4,7*	18,9±3,2	43,4 ± 2,7*	16,0 ± 4,9
Билирубин общий, ммоль/л	1,5±1,0*	0	9,3±2,48	4,2±1,83	8,5±1,5	7,80±3,4
АлАТ, ед/л	20,2±3,7*	4,6±1,8	11,3±3,0*	2,1±1,30	9,40±1,5*	3,2±2,2
АсАТ, ед/л	37,1±4,1*	3,8±1,7	6,9±2,2	2,1±1,30	14,1±1,8	6,3±1,3
ГГТ, ед/л	16,9±4,0*	5,4±2,0	22,1±3,5*	10,6±2,81	7,6±1,4	0
ЩФ, ед/л	4,4±0,8	4,2±0,8	10,2±2,5	8,5±2,54	31,1±2,5*	8,5±2,5
ЛДГ, ед/л	31,3±5,7*	4,5±1,8	3,3±1,5	4,2±1,83	-	-
Белок общий, г/л	8,1±1,5	4,2±1,8	17,4±3,2*	4,2±1,83	13,1±1,8	4,2±1,8
Альбумины, %	5,6±3,1	3,3 ± 1,4	-	-	13,1±1,8	3,3 ± 1,4
α -глобулины, %	4,2±2,4	4,6 ± 1,7	-	-	18,2±2,0	4,6 ± 1,7
α - ₂ -глобулины, %	5,6±2,7	8,0 ± 2,2	-	-	10,8±1,6	8,0 ± 2,2
β -глобулины, %	13,7±0,2	5,3 ± 1,8	-	-	10,8±1,6	5,3 ± 1,8
γ -глобулины, %	5,6±2,7	4,6 ± 1,7	-	-	10,8±1,6	4,6 ± 1,7
Отношение А/Г	3,5±6,0	3,3 ± 1,4	-	-	13,1±1,8	3,3 ± 1,4

Примечание. * $p<0,05$ – разница достоверна по сравнению с контрольными группами соответствующих производств.

компенсаторных «антиатерогенных» механизмов, что является фактором повышенного риска развития болезней органов кровообращения у работников.

Анализ полученных иммунологических показателей свидетельствует о формировании дефицита как клеточного, так и гуморального звена неспецифической резистентности. В профессиональной группе клейщиков (на производстве резиновых изделий) наблюдалась гиперпродукция относительного количества CD4 позитивных клеток, активация выработки CD16+ клеток. У операторов производства стекловолокна выражен дефицит супрессивных функций в связи с активацией CD3+, CD4+, что впоследствии может реализоваться развитием предраковых и раковых заболеваний кожи (табл. 2).

Изменения в гуморальном звене иммунитета у клейщиков резиновых изделий проявились повышением среднего уровня IgM у 79,1%, снижение IgA у 82%. У операторов стекловолокна выражен разнонаправленный дисбаланс всех типов иммуноглобулинов; при этом, наиболее значимые изменения характерны для IgG, превышение уровня которого характерно для 69% обследованных.

У аппаратчиков и слесарей-ремонтников производства оксидов олефинов наиболее выраженные нарушения иммунного статуса проявились в дисбалансе клеточного звена, способствующего формированию, частому обострению и хронизации воспалительных процессов респираторного тракта. В данном случае, речь идет о таких показателях, как фагоцитарная активность лейкоцитов, усиление лизоцимной активности, а также формирующаяся дисиммуноглобулинемия с повышением уровня IgM, на фоне снижения выработки IgG2 и IgA (см. табл. 2).

Проведенное исследование свидетельствует о возрастании как количества лиц с именованными показателями иммунной системы, так и о глубине этих изме-

нений, а также фазовом характере их развития. Так, первоначальный этап воздействия факторов производства характеризуется развитием адаптационных процессов, с выраженной активацией и напряжением. При этом, иммунокомпетентные клетки стремятся восстановить хрупкое равновесие в организме. В дальнейшем у работников наблюдается срыв адаптационных процессов, деятельность иммунной системы перестраивается, приводя к формированию вторичного иммунодефицита.

Цитохимические исследования функциональной активности ферментов лимфоцитов свидетельствовали о формировании разнонаправленных изменений лизосомальных и пероксидазных ферментных систем. Так, нами установлено, что для работников изученных производств степень активности кислот и щелочной фосфатазы в лейкоцитах периферической крови возрастала на фоне угнетения активности миелопероксидазы и стимулирующей выработки гликогена. (табл. 3).

Выявлена достоверная положительная корреляция между изменениями показателей ферментного профиля нейтрофилов и длительностью контакта с неблагоприятными факторами производства более 10 лет для операторов непрерывного волокна ($r=0,92$). Увеличение среднего содержания гликогена в клетках может быть обусловлено активацией анаболических и катаболических процессов в организме у обследованных лиц. Подобное состояние характеризовало дезорганизацию ферментной регуляции клетки, и, как следствие, подавление метаболических процессов, обеспечивающих клетку энергией и пластическим материалом. Полученные цитохимические сдвиги свидетельствовали о наличии цитотоксических и мембраноповреждающих эффектов вредных факторов излучения производств.

Таблица 2

Показатели иммунного статуса у работников химического комплекса ($M \pm m$)

Показатель	Единица измерения	Производство, профессия			
		Резиновых изделий		Непрерывное стекловолокно	
		Клейщики	Контроль	Операторы	Контроль
Лейкоциты	10 ⁹ /л	5,85±0,52	5,15±0,52	5,0±0,25	5,15±0,52
Лимфоциты	%	25,4±1,31*	34,4±3,38	30,12±2,18	34,4±3,38
CD3+	10 ⁹ /л	1,48±0,17	1,48±0,19	1,50±0,25	1,48±0,19
	%	55,7±1,82*	46,0±3,23	47,1±1,53*	61,8±2,72
CD4+	10 ⁹ /л	0,82±2,73*		4,10±0,40*	2,07±0,20
	%	40,6±1,94*	32,6±1,68	34,5±2,31*	33,9±2,24
CD8+	10 ⁹ /л	0,60±0,28		1,70±0,27*	0,60±0,05
	%	24,2±1,52*	25,5±1,79	22,2±1,52*	25,6±1,42
CD16+	10 ⁹ /л	0,35±0,05		1,40±0,60	0,47±0,14
	%	20,1±1,62*	9,15±1,65	18,9±1,08*	9,15±1,65
CD19+	10 ⁹ /л	0,29±0,13	0,19±0,13	1,10±0,10*	0,19±0,13
	%	10,6±1,41*	9,5±0,82	11,5±1,31	9,5±0,82
CD20+	10 ⁹ /л	0,15±0,15	0,16±0,04	0,17±0,04	0,16±0,04
	%			14,3±0,60	11,6±1,40
	10 ⁹ /л			1,20±0,10*	0,39±0,10*
IgM	0,79-1,57 г/л	3,68±0,66	1,63±0,23	1,7±0,07*	1,2±0,06
IgG	10,0-18,0 г/л	16,33±2,03*	11,89±1,25	18,8±1,05*	15,11±0,68
IgA	1,39-3,7 г/л	1,06±0,15	1,93±0,90	1,96±0,08*	2,63±0,22
IgE	до 100ме/мл	92,3±36,72*	52,41±21,4	89,6±16,72*-	52,41±21,42

Примечание. * $p < 0,05$ – разница достоверна по сравнению с контрольными группами соответствующих производств.

Ферментные системы клеточных органелл у работников химического комплекса (M±m)

Показатели, клетки	Производство, профессия		Контроль
	Оксиды олефинов	Непрерывное стекловолокно	
	Аппаратчики	Операторы	
Активность кислой фосфатазы:			
нейтрофилы	51,1±2,16*	53,0±1,4**	35,4±1,6
лимфоциты	52,2±1,16	73,0±2,3**	56,8±1,0
Активность щелочной фосфатазы: нейтрофилы	40,8±3,7	42,3±1,4**	31,6±1,7
Активность миелопероксидазы:			
нейтрофилы	1,91±0,01	2,09±0,03	2,03±0,04
Уровень гликогена:			
нейтрофилы	2,06±0,002	2,19±0,02***	1,92±0,003
лимфоциты	0,15±0,001	0,21±0,02**	0,11±0,001

Примечание. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ разница достоверна по сравнению с контролем.

Заключение. Проведенные исследования позволили выделить наиболее ранние диагностические и прогностические критерии нарушения здоровья у работников химического комплекса. Для производства резиновых изделий – показатели окислительного стресса – повышение уровня малонового диальдегида, понижение активности каталазы; гиперферментемия (АлАТ, АсАТ, ГГТ), диспротеинемия, гематологические – эритропения, снижение уровня гемоглобина, ретикулоцитоз, иммунологические – повышение CD3+, CD4+, CD 16+, IgM, НСТ спонтанный, понижение CD19+, ФАЛ, IgA, понижение НСТ стимулированный. Для работников производства непрерывного стекловолокна – показатели оксидантно-антиоксидантной системы – повышение концентрации малонового диальдегида, понижение активности каталазы; иммунологические – понижение CD3+, повышение CD4+, CD 16+, CD20+, ФАЛ, IgG, гемограммы – лимфоцитоз, эритроцитоз, лейкоцитоз, биохимические – повышение общего белка, гиперферментемия (ГГТ, АлАТ), изменение активности внутриклеточных ферментов – кислой фосфатазы нейтрофилов и лимфоцитов, понижение миелопероксидазы, повышение уровня гликогена. Для работников производства оксидов олефинов – тесты белкового обмена, гиперферментемия (АлАТ, ЩФ), в периферической крови – повышение эритроцитов, ретикулоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов, эозинофилов, тромбоцитов, а также лейкопения, иммунологические – понижение ФАЛ, дисиммуноглобулинемия (повышение IgM, понижение IgA, IgG), показатели внутриклеточного метаболизма – снижение миелопероксидазы, повышение кислой фосфатазы нейтрофилов и лимфоцитов. Использование данных тестов целесообразно для ранней и донозологической диагностики нарушений здоровья на стадии «предболезни», а также оценки уровней индивидуального риска развития патологических состояний вследствие воздействия комплекса вредных производственных факторов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 4, 5, 17-19 см. REFERENCES)

1. Измеров Н.Ф. Концепция долгосрочного социально-экономического развития Российской Федерации на период до 2020 г. («стратегия 2020») и сохранение здоровья работающего населения России. *Медицина труда и промышленная экология*. 2012; 3: 1-8.

2. Бакиров А.Б., Гимранова Г.Г. Приоритетные направления научных исследований в нефтедобывающей, нефтеперерабатывающей, нефтехимической промышленности. *Медицина труда и экология человека*. 2016; 3: 5-10.

3. Валеева Э.Т., Каримова Л.К., Бакиров А.Б., Дистанова А.А., Мухаммадиева Г.Ф. Гигиеническая оценка условий труда и профессионального риска развития новообразований кожи у работников производства искусственных волокон. *Санитарный врач*. 2019; 7: 55-62.

4. Мухаммадиева Г.Ф., Бакиров А.Б., Каримова Л.К., Каримов Д.О., Бейгул Н.А., Гимаева З.Ф. Факторы риска развития и особенности профессиональной патологии у работников, занятых производством искусственных минеральных волокон. *Медицина труда и промышленная экология*. 2018; 1: 19-23.

5. Павловская Н.А., Рушкевич О.П. Биомаркеры для ранней диагностики последствий воздействия угольной пыли на организм шахтеров. *Медицина труда и промышленная экология*. 2012; 9: 36-42.

6. Кузьмина Л.П., Измерова Н.И., Бурмистрова Т.Б. Патоморфоз современных форм профессиональных заболеваний. *Медицина труда и промышленная экология*. 2008; 6: 18-24.

7. Маринкин И.О., Потеряева Е.Л., Шпагина Л.А., Поляков А.Я. Патоморфоз и современная эволюция профессиональных и производственно обусловленных заболеваний. *Медицина труда и промышленная экология*. 2010; 8: 1-6.

8. Тимашева Г.В., Кузьмина Л.П., Бадамшина Г.Г., Каримова Л.К. Роль лабораторных исследований в диагностике ранних метаболических нарушений у работников нефтехимического производства. *Медицина труда и промышленная экология*. 2013; 3: 15-20.

9. Сабитова Р.И., Кравец Е.Д., Галиуллина Э.Ф., Шакиров Д.Ф., Камиллов Ф.Х., Буляков Р.Т., Самсонов В.М., Еникеев Д.А. Оценка состояния неспецифической защиты организма рабочих при воздействии токсических факторов производства химии и нефтехимии. *Казанский медицинский журнал*. 2016; 97(5): 784-92.

10. Лебедева Е.Н., Красиков С.И., Шаропова Н.В., Сетко Н.П., Захаров А.А. Липидный и адипокиновый профиль у работников нефтеперерабатывающего предприятия. *Вестник Оренбургского государственного университета*. 2015; 9 (184): 92-5.

11. Валеева Э.Т., Бакиров А.Б., Капцов В.А., Каримова Л.К., Гимаева З.Ф., Галимова Р.Р. Профессиональные риски здоровью работников химического комплекса. *Анализ риска здоровью*. 2016; 3: 88-97.

12. Мухаммадиева Г.Ф., Гимранова Г.Г., Валеева Э.Т., Тихонова Т.П., Бадамшина Г.Г., Тимашева Г.В., Гимаева З.Ф. Оценка состояния здоровья работников производства непрерывного стекловолокна. В кн.: Мухаммадиева Г.Ф., Бакиров А.Б., Серебряков П.В., Каримова Л.К., ред. Факторы риска и профилактика профессиональных новообразований кожи у работников производства стекловолокна. Уфа: Диалог; 2016.

13. Каримова Л.К., Гимаева З.Ф., Капцов В.А., Гизатуллина Д.Ф., Маврина Л.Н. Оценка риска здоровья работников при воздействии комплекса производственных факторов в условиях нефте-

GENERAL CLINICAL METHODS

- химических производств. *Здоровье населения и среда обитания*. 2017; 288(3): 30-5.
16. Измеров Н.Ф. Актуализация вопросов профессиональной заболеваемости. *Здравоохранение Российской Федерации*. 2013; 2: 14-7.
20. Потапов А.И., ред. Клиническая лабораторная диагностика профессиональных заболеваний. Ярославль: Канцлер; 2013.
21. Кишкун А.А., ред. Руководство по лабораторным методам диагностики. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2013.
22. Кост Е. А., ред. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования. М.: Медицина; 1975.
-
11. Sabitova R.I., Kravec E.D., Galiullina E.F., Shakirov D.F., Kamilov F.H., Bulyakov R.T., Samsonov V.M., Enikeev D.A. Assessment of the condition of nonspecific protection of the body of workers when exposed to toxic factors in the production of chemistry and petrochemistry. *Kazanskiy meditsinskij zhurnal*. 2016; 97(5): 784-92. (in Russian)
12. Lebedeva E.N., Krasikov S.I., Sharapova N.V., Setko N.P., Zakharov A.A. Lipid and adipokine profile in refinery workers. *Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta*. 2015; 9 (184): 92-5. (in Russian)
13. Valeeva E.T., Bakirov A.B., Kaptsov V.A., Karimova L.K., Gimaeva Z.F., Galimova R.R. Occupational health risks for chemical workers. *Analiz riska zdorov'yu*. 2016; 3: 88-97. (in Russian)
14. Mukhammadiyeva G.F., Gimranova G.G., Valeeva E.T., Tikhonova T.P., Badamshina G.G., Timasheva G.V., Gimaeva Z.F. Assessment of the health status of continuous fiberglass production workers. In the book: Mukhammadiyeva G.F., Bakirov A.B., Serebryakov P.V., Karimova L.K., eds. Risk factors and prevention of occupational skin tumors in fiberglass workers. [Faktory riska i profilaktika professional'nykh novoobrazovaniy kozhi u rabotnikov proizvodstva steklovolokna]. Ufa: Dialog; 2016: 55-74. (in Russian)
15. Karimova L.K., Gimaeva Z.F., Kaptsov V.A., Gizatullina D.F., Mavrina L.N. Assessment of the health risk of workers under the influence of a complex of production factors in the conditions of petrochemical production. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya*. 2017; 288(3): 30-5. (in Russian)
16. Izmerov N.F. Actualization of occupational morbidity issues. *Zdravookhranenie Rossiyskoy Federatsii*. 2013; 2: 14-7. (in Russian)
17. Kaukiainen A., Vehmas T., Rantala K., Nurminen M., Martikainen R., Taskinen H. Results of Common Laboratory Tests in Solvent-Exposed Workers. *Int. Arch. Occup Environ. Health*. 2004; 77(1): 39-46.
18. Schulte P. A., Hauser J.E. The Use of Biomarkers in Occupational Health Research, Practice, and Policy. *Toxicology Letters*. 2012; 213(1): 91-9.
19. Kasperczyk A., Dobrakowski M., Ostalowska A., Zalejska-Fiolka J., Birkner E. The Metabolism of Carbohydrates and Lipid Peroxidation in Lead-Exposed Workers. *Toxicol. and Health*. 2015; 31(12): 18-24.
20. Potapov A.I., ed. Clinical laboratory diagnostics of occupational diseases [Klinicheskaya laboratornaya diagnostika professional'nykh zabolevaniy]. Yaroslavl': Kantsler; 2013. (in Russian)
21. Kishkun A.A., ed. Laboratory Diagnostic Guide [Rukovodstvo po laboratornym metodam diagnostiki]. Moscow: GEOTAR-Media; 2013. (in Russian)
22. Kost E. A., ed. Handbook of clinical laboratory research methods. [Spravochnik po klinicheskim laboratornym metodam issledovaniya]. Moscow: Meditsina; 1975. (in Russian)

Поступила 22.05.20
Принята к печати 04.07.20

МИКРОБИОЛОГИЯ

© АНДРЮКОВ Б.Г., ЛЯПУН И.Н., 2020

Андрюков Б. Г.^{1,2}, Ляпун И. Н.¹

ЛАБОРАТОРНЫЕ СТРАТЕГИИ ДИАГНОСТИКИ COVID-19: СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ И ТЕНДЕНЦИИ РАЗВИТИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова» Минобрнауки России, 690087, г. Владивосток, Россия;

²Дальневосточный федеральный университет Минобрнауки России, 690950, г. Владивосток, Россия

Пандемия COVID-19, спровоцированная новым коронавирусом SARS-CoV-2, вызвала всплеск заболеваемости по всему миру. Стремительное распространение инфекции вызвало тяжелейший кризис глобального здравоохранения и мировой экономики. Для предотвращения дальнейшего распространения пандемии важна быстрая и точная диагностика инфекции. Стандартным методом выявления коронавируса является полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). ОТ-ПЦР требует дорогостоящего оборудования, специальной подготовки персонала, что ограничивает проведение массового тестирования и удлиняет время получения результата исследования. Серологические тесты на антитела против SARS-CoV-2 и определения защитного иммунитета у различных групп населения используют для ретроспективного выявления пациентов, перенесших бессимптомную и лёгкую форму инфекции, мониторинга протекания инфекции у госпитализированных больных, с целью отслеживания контактов и эпидемиологического надзора. Использование стандартных методов диагностики COVID-19 в условиях массовой заболеваемости, особенно при дефиците ресурсов и отсутствии соответствующей инфраструктуры связано с целым рядом ограничений. Поиск и разработка новых быстрых недорогих, простых, бесприборных, но не менее чувствительных и специфичных тестов является актуальной задачей. В обзоре рассматриваются новые лабораторные технологии диагностики новой инфекции – петлевая изотермическая амплификация (LAMP) и иммунохроматографический анализ (ИХА), которые могут стать реальной альтернативой используемым молекулярным и иммуноферментным технологиям. Динамическое развитие этих методов в последние годы расширяет перспективы их использования как для диагностики COVID-19, так и мониторинга пандемии.

Ключевые слова: COVID-19; SARS-CoV-2; полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР); иммуноферментный анализ; петлевая изотермическая амплификация (LAMP); иммунохроматографический анализ.

Для цитирования: Андрюков Б.Г., Ляпун И.Н. Лабораторные стратегии диагностики COVID-19: современные технологии и тенденции развития (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65(12): 757-766. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-12-757-766>

Andryukov B. G.^{1,2}, Lyapun I. N.¹

COVID-19 DIAGNOSTIC LABORATORY STRATEGIES: MODERN TECHNOLOGIES AND DEVELOPMENT TRENDS (REVIEW OF LITERATURE)

¹Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Russian Ministry of Education and Science, 690087, Vladivostok, Russia;

²Far Eastern Federal University of the Ministry of Education and Science of Russia, 690950, Vladivostok, Russia

The COVID-19 pandemic, associated with the new coronavirus SARS-CoV-2, has caused a surge in incidence worldwide, as well as a severe crisis in global health and economy. Therefore, fast and accurate diagnosis of infection is key to timely treatment and elimination of the spread of the virus. Currently, the standard method for detecting coronavirus is reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). However, this method requires expensive equipment and trained personnel, which limits the conduct of mass testing and lengthens the time to obtain a research result. Serological tests for antibodies against SARS-CoV-2 and the determination of protective immunity in various populations are used to retrospectively identify patients with asymptomatic and mild forms of infection, monitor the course of infection in hospitalized patients, and also track contacts and epidemiological surveillance. The use of standard methods for diagnosing COVID-19 in conditions of mass morbidity, especially in conditions of insufficient resources and lack of appropriate infrastructure, is associated with a number of limitations. Therefore, the search and development of new, fast, inexpensive, simple, device-free and no less sensitive and specific tests is an urgent task. Therefore, the search and development of new, fast, inexpensive, simple, device-free and no less sensitive and specific tests is an urgent task. The review examines new laboratory technologies for diagnosing a new infection – loop isothermal amplification (LAMP) and immunochromatographic analysis (ICA), which can become a real alternative to the used molecular and enzyme immunoassay methods. The dynamic development of these methods in recent years expands the prospects for their use both for diagnosing COVID-19 and monitoring a pandemic.

Key words: COVID-19; SARS-CoV-2; reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR); enzyme-linked immunosorbent assay; loop isothermal amplification (LAMP); immunochromatographic analysis.

Для корреспонденции: Андрюков Борис Георгиевич, д-р мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. мол. микробиологии НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г. П. Сомова, проф. Департамента биомедицины ДВФУ; e-mail: andrukov_bg@mail.ru

For citation: Andryukov B. G., Lyapun I. N. COVID-19 diagnostic laboratory strategies: modern technologies and development trends (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020;65(12): 757-766 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-12-757-766>

For correspondence: *Andryukov Boris Georgievich*, MD, Lead Researcher of the laboratory of molecular microbiology «Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology», Professor of the Department of Biomedicines «Far Eastern Federal University»; e-mail: andrukov_bg@mail.ru

Information about authors:

Andryukov B. G., <http://orcid.org/0000-0003-4456-808X>;

Lyapun I. N., <https://orcid.org/0000-0002-5290-3864>.

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

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

Received 28.09.2020
Accepted 05.10.2020

Введение. В конце 2019 г. в Китае появилась новая коронавирусная инфекция COVID-19, последующее распространение которой по миру приняло характер пандемии и вызвало тяжелейший кризис глобального здравоохранения и экономики [1]. По данным Европейского центра профилактики и контроля заболеваний COVID-19, к началу октября 2020 г. в мире насчитывалось более 32 млн заболевших и около 1 млн случаев с летальным исходом. В РФ эти показатели соответственно превысили 1,2 млн и 200 тыс. человек [2-4].

Схожесть клинических проявлений текущей инфекции с симптоматикой других ОРВИ, вероятность бессимптомного течения заболевания, сравнительно высокая контагиозность осложняют эпидемиологический мониторинг распространения вируса. В связи с этим создание платформ для эффективной диагностики COVID-19 стало особенно актуальным для своевременного выявления и лечения заболевших пациентов, для мониторинга эпидемической ситуации, ориентированного на опыт ликвидации недавних вирусных эпидемий [1, 3, 4].

Появление в XXI веке трёх новых патогенных для человека видов коронавируса вызывает серьёзные опасения. Эти РНК-содержащие β-коронавирусы семейства *Coronaviridae*, среди которых особое внимание привлекли возбудитель ближневосточного респираторного синдрома (MERS) – MERS-CoV и источник тяжёлого острого респираторного синдрома (SARS) – SARS-CoV [5-7].

Полногеномное секвенирование и филогенетический анализ показали, что коронавирус, вызывающий COVID-19, является β-коронавирусом того же подрода, что и вирус SARS-CoV. Новый вирус предложено обозначить как SARS-CoV-2 [5, 8].

Как и у других β-коронавирусов, геном SARS-CoV-2 содержит специфические последовательности РНК, кодирующие структурные и неструктурные белки, которые обеспечивают транскрипцию и репликацию вируса (полипротеин ORF1ab) и реализацию патогенных механизмов вируса. Некоторые из них экспонированы на поверхности вириона (спайковый гликопротеин S, белок оболочки E, мембранный протеин M, нуклеокапсид N) и вызывают значительный биотехнологический, фармакологический и биомедицинский интерес [6, 7, 9, 10].

Результаты молекулярно-филогенетического анализа показали, что геномные нуклеотидные последовательности SARS-CoV-2 и SARS-CoV связаны с идентичностью около 80%. Гликопротеины S этих видов вирусов в процессе инфицирования используют ангиотензин-превращающий фермент 2 (ACE2) в качестве рецептора, для проникновения в клетки человека [11].

Основными патогенетическими мишенями для всех представителей этой подгруппы β-коронавирусов являются респираторный и желудочно-кишечный тракт, печень, центральная нервная система, поражение которых становится характерным признаком коронавирусных инфекций [2, 8, 12]. До возникновения современных эпидемических вспышек β-коронавирусных инфекций (SARS в 2002-2004 г. г. и MERS в 2012 г.) [8, 10, 12], эти возбудители не относили к группе высоковирулентных патогенов человека [13, 14]. Эпидемии SARS и MERS, и особенно пандемия COVID-19, изменили существующий до этого взгляд на патогенность коронавирусов и эпидемиологию новых инфекций, на потенциальную перспективу возникновения новых вспышек и их диагностику [5-7, 15].

Одним из важнейших направлений стратегии борьбы с новой инфекцией стала необходимость массового лабораторного скрининга групп населения с высоким риском заражения. Своевременная и качественная лабораторная диагностика пациентов, инфицированных SARS-CoV-2, стала основным приоритетом в ликвидации пандемии и введении карантинных мер [1, 4, 5, 16]. В этих условиях создание быстрых, эффективных и недорогих инструментов для диагностики стало важной составляющей борьбы с новой инфекцией. Как и при ликвидации коронавирусных инфекций SARS и MERS, так и при диагностике COVID-19, перед общественным здравоохранением стоит одна и та же задача. Она связана с определением роли и места различных диагностических платформ для осуществления скрининга, диагностики и мониторинга новых коронавирусных инфекций как традиционных, так и новых диагностических платформ с учётом их преимуществ и ограничений [7, 9, 17, 18].

Результаты секвенирования генома SARS-CoV-2 стали основой для создания тест-систем для диагностики и эпидемического мониторинга инфекции, предпосылкой для создания лекарственных препаратов и вакцин [19]. На фоне отсутствия опыта ликвидации пандемии новой вирусной инфекции и научной доказательности рекомендаций по использованию лабораторных тестов и управлению диагностикой, общественное здравоохранение нуждается в решении новых вопросов и проблем, связанных со своевременностью, частотой и выбором инструментов тестирования. Ответы на эти вопросы лежат в плоскости решения дилеммы о доступности определённых типов лабораторных тестов, своевременности их проведения и информативности, в клинко-эпидемиологической и экономической обоснованности использования в быстро меняющейся и беспрецедентной для новейшей истории картине пандемии [15, 20-22].

Существуют значительные различия в выборе наиболее подходящих инструментов и эффективных методов тестирования заболевших COVID-19, их контактов, потенциальных носителей, медицинских работников и представителей других служб экстренной помощи [1, 2, 21, 22]. После десяти месяцев борьбы с COVID-19 усилия общественного здравоохранения по-прежнему оцениваются количеством проведённых тестов, а последствия пандемии – числом умерших и заболевших. При этом среди последних не учитывают миллионы лёгких и бессимптомных случаев, хотя вполне вероятно, что именно эта категория пациентов является источником инфицирования окружающих. Отрицательные тесты ПЦР и появление специфических антител считают критерием выздоровления переболевших пациентов без учёта последствий на здоровье и качества их жизни. При этом уровни антител у переболевших в дальнейшем не исследуют, как не изучается напряжённость иммунитета и возможность повторного заражения COVID-19 [17, 21]. Возможно, это связано с недостаточным пониманием иммунных сигнальных путей и общей иммунопатологии при этой инфекции [2, 3, 22].

Ситуация с диагностикой COVID-19 ещё больше осложняется из-за отсутствия понимания в обществе, прессе, среди медицинских чиновников и некоторых специалистов биомедицины различий между существующими типами доступных тестов для диагностики этой инфекции. Неудивительно, что нет единой методологии целей и задач использования их, интерпретации полученных результатов для дальнейших решений [2, 3, 23].

Один из основных вопросов выработки стратегии тестирования в период пандемии связан с существующими типами диагностических инструментов и их принципиальным различием для диагностики вирусных инфекций, клинической целесообразности и бесполезности для различных категорий пациентов на разных этапах заболевания. Другие широко обсуждаемые темы касаются времени тестирования, их периодичности и правильной интерпретации полученных результатов [2, 3, 5, 7].

Данные рутинных лабораторных исследований имеют неспецифический характер (лейкопения, лимфопения, лёгкая тромбоцитопения, повышение содержания острофазовых белков, в тяжелых случаях повышение уровней цитокинов IL2, IL4, IL6, IL7, IL10, TNF) [12, 14, 17, 18].

Все существующие на данный момент типы специальных лабораторных тестов для диагностики COVID-19 можно разделить на две категории. Одни их них обнаруживают сам вирус (антигены или нуклеиновые кислоты), другие выявляют иммунную реакцию организма человека на его присутствие (антитела классов IgM, IgG). В условиях отсутствия специфических симптомов, доказанной эффективности методов этиотропного лечения и вакцинации, результаты лабораторной диагностики становятся единственным информационным источником наличия и мониторинга течения COVID-19 [3, 23, 24].

В идеальном гипотетическом варианте при помощи теста, выявляющего вирус и имеющего 100% чувствительность и специфичность, можно обследовать всё население. В зависимости от полученных результатов выделить всех инфицированных людей и разделить их на категории в зависимости от наличия и выраженности клинической картины: с бессимптомным, лёгким, средним, тяжёлым течением. После чего всех пациентов с

положительными результатами тестирования в зависимости от клинической картины изолировать на карантин, лечение на дому, госпитализировать в медицинское учреждение.

В качестве альтернативы, в другом гипотетическом варианте, обследовать всё население на наличие антител с помощью другого теста, имеющего 100% чувствительность и специфичность для идентификации пациентов, которые ранее были инфицированы вирусом, но перенесли инфекцию бессимптомно или оказались невосприимчивы к инфекции. Эти категории населения можно было бы привлекать для оказания помощи заболевшим, периодически контролируя у них уровень специфических антител.

Реальная картина распределения заражённых COVID-19 напоминает айсберг: в меньшей, надводной части которого размещаются категории тяжело заболевших и госпитализированных пациентов, на вершине – погибшие от инфекции. Большую долю подводной части айсберга занимают пациенты, перенесшие инфекцию в бессимптомной (около 45%), лёгкой или умеренной форме, без специфической клинической картины, с ОРЗ [4, 7, 25]. Пациенты с бессимптомным течением, как и с манифестной формой инфекции, несут одинаковую вирусную нагрузку в течение одного и того же периода времени [3, 4, 7, 17].

Рассмотренные варианты, при всей их гипотетичности, помогают определить место и оценить диагностическую ценность имеющихся тестов, целесообразность их использования, особенно в условиях отсутствия терапевтических средств или вакцин.

Из первой группы тестов сразу следует исключить вирусологический метод и детекцию антигенов коронавируса, которые проводят в специализированных вирусологических лабораториях для научных исследований.

Лабораторные тесты для прямой индикации вируса и идентификации РНК. Индикация вируса является важным диагностическим этапом мониторинга уровня заболеваемости и управления эпидемиологическим процессом. Эволюция молекулярно-генетических методов лабораторной диагностики связана с развитием аналитических платформ идентификации нуклеиновых кислот, которые стали быстрыми и надёжными инструментами для прямой индикации вирусов [11, 15, 26-28].

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), нацелен на детекцию ДНК – одного из двух типов нуклеиновых кислот, обеспечивающих хранение наследственной информации о генетическом коде всех живых организмов. ПЦР является широко используемым диагностическим методом для индикации большого спектра патогенных микроорганизмов и считается «золотым стандартом» с высокой чувствительностью и специфичностью [10, 29]. Более чем за 30 лет применения, эта концептуально простая технология стала одной из наиболее распространённых в медико-биологической практике для диагностики инфекционных и наследственных заболеваний, в молекулярной биологии для научных генно-инженерных исследований [11, 30, 31].

Геном коронавирусов состоит из РНК, которая схожа с ДНК по химическому составу, но имеет ряд принципиальных отличий. ДНК хранит наследственную информацию, РНК переносит её, ДНК является двуцепочечной молекулой, РНК – одноцепочечной, имеет меньшую молекулярную массу [32, 33].

Эти отличия являются причиной того, что стандартный каталитический фермент *Tag*-полимераза, используемый в классической ПЦР-технологии для амплификации определенных фрагментов ДНК в биоматериале, неэффективно реплицирует РНК. Для детекции РНК вирусов, включая SARS-CoV-2, применяется другой вариант тестирования, получивший название ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР или Reverse Transcription PCR, RT-PCR) из-за его преимуществ в качестве специфического и чувствительного анализа для ранней диагностики вирусных инфекции [26, 27, 29, 33].

В отличие от традиционной ПЦР, которая используется для усиления целевых последовательностей ДНК, ОТ-ПЦР представляет метод амплификации специфического фрагмента РНК в комплементарное ДНК с помощью фермента обратной транскриптазы. RT-PCR проходит в два этапа: сначала молекулу РНК превращают в комплементарную ДНК (кДНК) при помощи реакции обратной транскрипции (ОТ), катализируемой ферментом обратной транскриптазой (ревертаза, РНК-зависимая ДНК-полимераза). На втором этапе амплифицируют молекулу ДНК, используя *Tag*-полимеразу и классическую схему ПЦР [11, 31]. С целью диагностики эти два этапа удобнее проводить в одной пробирке; для научных исследований – ОТ и ПЦР проводят в отдельных пробирках [31, 34].

ОТ-ПЦР, успешно зарекомендовавшая себя при тестировании вируса сезонного гриппа, одобрен ВОЗ в качестве диагностического стандарта, применяемого для диагностики COVID-19 и детекции SARS-CoV-2 [8, 35-37]. Тестирование проводится в скрининговом режиме среди бессимптомных пациентов с предполагаемыми контактами с SARS-CoV-2 для раннего выявления или определения тенденций развития инфекции [27, 28, 34, 36].

В дополнении к качественному определению РНК, при вирусных инфекциях часто используют объединенную с qPCR технологию, которая применяется для определения количества экспрессированного гена. Этот объединенный вариант, получивший название количественной RT-PCR в реальном времени (qRT-PCR, RT-qPCR), является самым мощным и чувствительным инструментом для количественного обнаружения уровня РНК [31, 34, 38].

ОТ-ПЦР является одной из многих разновидностей традиционной техники ПЦР, и её часто путают с количественной ПЦР (Quantitative PCR, Q-PCR, ПЦР в реальном времени). Ключевая разница между этими двумя вариантами заключается в том, что в отличие от ОТ-ПЦР, которая используется для обнаружения экспрессии генов посредством создания транскриптов кДНК из матричной РНК, Q-ПЦР применяется для количественного измерения продуктов ПЦР в реальном времени с использованием флуоресцентных интеркалирующих красителей или меченных зондов [11, 15, 27, 37].

Технология ПЦР-диагностики отработана десятилетиями, есть подготовленные специалисты и необходимое оборудование, высокая чувствительность и специфичность ПЦР даёт основание доверять полученным результатам. Как нередко бывает в клинической лабораторной диагностике, не уделяется должное внимание преаналитическому этапу – взятию и транспортировке биоматериала, которые, как правило, проводит неподготовленный персонал [26, 27, 31, 38].

Сбор и пробоподготовка являются ключевыми этапами проведения тестов на вирусную РНК. Время отбора

проб, правильное их взятия и оптимальные типы образцов имеют определяющее значение для получения правильного результата. Чтобы предотвратить деградацию РНК, после взятия мазков их погружают в транспортную среду (буфер для лизиса или стерильный физраствор). Хранить образцы следует при температуре 2-8°С до 72 ч [11, 35, 36]. При необходимости более длительного хранения предпочтительная температура для сохранности взятого биоматериала -70°С и ниже [35, 37].

Распространёнными типами исследуемых образцов являются секреты, взятые из носо- и ротоглотки, при этом материал из носоглотки является предпочтительным [38, 20, 21, 29]. Образцы должны быть получены с помощью тупферов с тампонами из полиэстера и доставлены в лабораторию как можно скорее после сбора. У пациентов с пневмонией для исследования берут дополнительные материалы: мокрота и бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ). После сбора мазки помещают в жидкость для высвобождения вирусной РНК из тампонов в раствор, откуда в последующем извлекают и амплифицируют нуклеиновую кислоту [11, 15, 20, 29].

Вероятность детекции коронавируса в каждом из перечисленных материалов варьируется в разных пределах и может меняться у отдельных пациентов, поэтому отрицательный результат тестирования не исключает возможности инфицирования человека. Получение ложноотрицательного результата может быть связано с неравномерным распределением вируса в дыхательной системе, с игнорированием стандартов взятия образцов [35, 36, 39]. При получении положительного результата существует небольшая вероятность вирусной контаминации в процессе тестирования или перекрестного инфицирования (ложноположительный результат).

При выполнении теста следует учитывать, что некоторые компоненты, находящиеся в пробе, могут снижать или полностью ингибировать активность используемых каталитических ферментов (транскриптазы, *Tag*-полимеразы), что, соответственно, будет частично или полностью блокировать амплификацию ДНК, снижать качество диагностики и являться одной из причин появления ложноотрицательных результатов ПЦР [39, 40]. *Tag*-полимераза полностью инактивируется при наличии в пробе даже следов крови (от 0,004%). Качество взятия материала и предварительная обработка образца является ключевым этапом при ПЦР-тестировании, влияющим на диагностическую надежность и эффективность метода [34, 35, 39, 40].

Причиной ложноотрицательного результата может стать изменение последовательностей вирусной РНК. Как и другие вирусы, SARS-CoV-2 мутирует по мере распространения пандемии [22, 25, 41]. Генетическое разнообразие и быстрая эволюция нового коронавируса наблюдались в различных исследованиях [41]. Эти мутации изучают с целью отслеживания глобального распространения вируса, изменения его вирулентных свойств [22, 42]. Большинство изменений не оказывают заметного влияния, но некоторые из них, образовавшиеся в областях праймеров и зондов SARS-CoV-2, могут снизить эффективность ПЦР-тестирования и стать причиной ложноотрицательных результатов [22, 34, 43].

Риск ложных результатов, является важной проблемой, связанной с методом ОТ-ПЦР-РВ, и в значительной степени влияет на эффективность борьбы с распространением инфекции [42]. Многие случаи COVID-19 с типичной клинической картиной и соответствующим

заклЮчением исследования компьютерной томографии (КТ) не диагностированы ПЦР-тестированием в 35-50% [28, 29].

Для исключения или минимизации вероятности ложноположительных результатов, при выполнении каждого цикла ОТ-ПЦР SARS-CoV-2 рекомендуется использовать отрицательный матричный контрольный материал (NTC, No Template Control), не содержащий нуклеаз. Результат тестирования NTC должен быть отрицательным, а возникновение положительных результатов будет свидетельствовать о перекрёстном загрязнении образца [2, 35, 37].

Чувствительность и специфичность RT-PCR ниже 100%, полученный отрицательный результат при ПЦР-тестировании не исключает возможности заражения COVID-19 [28, 29]. Для достижения максимальной эффективности молекулярно-генетической диагностики имеет значение правильное выполнение стандартов операционных процедур (СОП) и лабораторной практики, связанных со взятием исследуемых материалов, условиями транспортировки образцов и их хранением, взятием альтернативных типов биоматериалов у одного пациента [28, 43].

Несмотря на то, что ОТ-ПЦР SARS-CoV-2 является методом выбора при диагностике COVID-19, его результаты следует интерпретировать с осторожностью, с учётом данных КТ и клинических симптомов заболевания, что облегчает раннюю постановку диагноза и обеспечивает своевременное лечение пациентов. Эффективность метода значительно повышается при использовании для тестирования нескольких типов образцов из верхних и нижних дыхательных путей, при соблюдении СОП и надлежащей лабораторной практики.

Серологические методы детекции антител и определения защитного иммунитета у недавно инфицированных SARS-CoV-2. Вторая группа широко используемых методов – тесты, предназначенные для определения серологического статуса пациентов и детекции специфических антител классов IgA, IgM, IgG, определения защитного иммунитета у различных групп населения, инфицированных SARS-CoV-2. Результаты тестов на антитела особенно важны для выявления предыдущего инфицирования пациентов с маловыраженной симптоматикой или бессимптомной формой заболевания [2, 23, 44].

Серологические тесты в наиболее распространённых форматах твёрдофазного иммуоферментного анализа (ИФА) хорошо известны и зарекомендовали себя как сравнительно простые, безопасные, чувствительные и специфичные диагностические платформы для выявления антител, вырабатываемых в ответ на SARS-CoV-2 в сыворотке или плазме крови [23, 44, 45]. В качестве антигена при конструировании системы использует один из иммуногенных белков SARS-CoV-2 (как правило, спайковый гликопротеин S или нуклеокапсид N). Полный цикл исследования занимает не менее 1,5-2 часов и требует специального лабораторного оборудования [20, 44, 46].

Основное требование к тест-системам – отсутствие перекрестной реактивности с антителами, вырабатываемыми к другим распространённым коронавирусам, вызывающим менее серьёзные ОРВИ. Перекрестную реактивность при постановке ИФА полностью исключать нельзя. Ложноположительные результаты встречаются при инфицировании другим видом β -коронавируса в случае использования тест-систем, в которых в качестве

антигена использовался нуклеокапсид N [44, 45, 47]. По оценкам разработчиков, большинство серологических тестов ИФА имеют специфичность более 99% и чувствительность 96% [2, 23, 45, 47]. Многие авторы, чтобы избежать ложноотрицательных результатов, указывают на необходимость исследований на антитела против нескольких антигенов [2, 23, 47, 48].

Динамика иммунного ответа против SARS-CoV-2 и, в частности, сероконверсия при COVID-19, находятся в стадии изучения, как и корреляция уровня специфических антител с вирусной нагрузкой, и роль в элиминации вируса [20, 23, 47]. Средняя продолжительность появления антител IgM и IgA составляет 5–7 дней, тогда как антитела IgG обнаружены через 14 дней после появления симптомов у лиц с инфекциями, подтверждёнными ОТ-ПЦР [45].

Требуют подтверждения и защитные свойства антител от повторного инфицирования пациентов, переболевших COVID-19, и продолжительность сохранения защитного иммунитета [20, 23, 47, 48].

Исследования динамики появления противовирусных антител у пациентов с другими коронавирусными инфекциями в период эпидемий SARS и MERS показали, что специфические иммуноглобулины выявлялись у 80-100% пациентов в среднем через 14–20 дней после постановки диагноза, что соответствовало 2-3 нед от начала появления клинических симптомов болезни [9, 12, 26, 49]. Сероконверсия является надёжным диагностическим признаком коронавирусной инфекции, как и обнаружение вирусной РНК [11, 49-51].

Результаты серодиагностики на антитела к SARS-CoV-2 могут быть использованы для ретроспективного выявления пациентов, перенесших бессимптомную и лёгкую формы инфекции, мониторинга протекания инфекции у госпитализированных больных, отслеживания контактов и эпидемиологического надзора на региональном уровне для определения истинных масштабов пандемии и уровня летальности [23, 45, 47]. Появление специфических антител, например, у медицинских работников, работающих в условиях, потенциально опасных вторичным инфицированием COVID-19, могло бы служить основанием для допуска к работе [2, 3, 7, 49]. Исследование сероконверсии у инфицированных SARS-CoV-2 может быть использовано для диагностики ПЦР-отрицательных больных, в том числе, поступивших на поздней стадии заболевания, и для ретроспективной оценки чувствительности молекулярно-генетического тестирования.

Поиск и разработка новых методов для экспресс-диагностики COVID-19. Для реализации эффективных мер по контролю за распространением инфекции в период ликвидации пандемии решающее значение имеет раннее и надёжное обнаружение вируса [6,13,52,53]. Массовое тестирование заболевших и бессимптомных носителей оказалось весьма эффективным в борьбе с пандемией. Оно связано с громадными финансовыми расходами на приобретение необходимого оборудования, тест-систем, создание специализированных лабораторий [23, 52-54]. В условиях ограниченных ресурсов и оборудования, отсутствие возможности проведения стандартной лабораторной диагностики COVID-19 становится фактором, ограничивающим возможность борьбы с распространением вируса. Поиск и разработка диагностических инструментов, соответствующих современной концепции ASSURED (доступных, чувстви-

тельных, специфичных, удобных для пользователя, быстрых, надежных и бесприборных) является актуальной задачей [13, 23, 52, 54].

Одной из современных высокотехнологичных тенденций индикации и идентификации инфекционных патогенов в клинической лабораторной диагностике является развитие технологий point-of-care (POC). Их преимущества, такие как простота, быстрое получение результата, экономичность и отсутствие необходимости в подготовленных специалистах и дорогостоящего лабораторного оборудования, снижают финансовые затраты и время на верификацию возбудителей и опосредуют активный рост их использования для диагностики [52-54].

Ряд молекулярных методов из арсенала технологий POC разработаны и доступны для экспресс-диагностики пациентов с COVID-19.

Петлевая изотермическая амплификация (LAMP).

В последнее время для скрининговой и мониторинговой диагностики вирусных инфекций всё более популярным становится быстрый, простой и экономичный метод петлевой изотермической амплификации с обратной транскрипцией (Loop mediated isothermal amplification, LAMP и RT-LAMP), аналогичный классической ПЦР [6, 54, 55].

Этот одностадийный метод амплификации детектирует РНК вируса в различных биосубстратах с точностью, сопоставимой с RT-qPCR, который, являясь золотым стандартом для обнаружения SARS-CoV-2, требует обученного персонала, сложной инфраструктуры и длительного времени анализа, что ограничивает его использование [54-56]. В условиях пандемии COVID-19 новая и экономичная лабораторная POC-технология RT-LAMP стала альтернативой ОТ-ПЦР как несложный инструмент скрининга в условиях ограниченных ресурсов [6, 54, 56-58].

Подобно ОТ-ПЦР, тесты LAMP очень чувствительны и надежны, при условии их проведения во время острой стадии инфекции, и позволяют получать результат в течение 20-30 мин. Ключевым этапом при разработке тест-систем RT-LAMP является выбор целевых мишеней вируса и использование соответствующих четырёх праймеров, нацеленных на различные консервативные области генома [54, 59, 60]. Праймеры связываются с комплементарными последовательностями кДНК-

мишени и образуют ДНК в форме гантелей. Затем на этапе циклической амплификации непрерывно производятся несколько копий таких гантелей ДНК. Продукты, образующиеся на этапе циклической амплификации, используются в фазе элонгации для циклического синтеза ДНК различных размеров.

Разработан одностадийный экспресс-тест для диагностики COVID-19 со временем анализа 30 мин [55]. При конструировании набора использовались праймеры N_1 и N_{15} , нацеленные на гены, кодирующие N нуклеокапсид, спайковый гликопротеин (S_{17} и O_{117}) и репликазу (*ORF1ab*) SARS-CoV-2 соответственно. Высокая чувствительность и 100% специфичность теста подтверждена на образцах сыворотки, мочи, слюны, мазков из рото- и носоглотки с использованием колориметрической и флуоресцентной детекции [55].

Технологические преимущества LAMP, такие как амплификация при постоянной температуре 60-65° С (что исключает необходимость использования термоблокера), более быстрое получение результата при сохранении аналогичной чувствительности и специфичности, делают его более подходящим для скрининга COVID-19, чем RT-PCR [55, 57, 59]. Важными достоинствами этого уникального метода являются высокая экономичность и простота выполнения с возможностью выявления амплификационного продукта и оценки результата визуально, по изменению цвета после добавления одного из интеркалирующих красителей [57, 58]. Современные модификации технологии RT-LAMP позволяют получать количественный результат в режиме реального времени [58, 61, 62] (табл. 1).

Немаловажными преимуществами этого одностадийного метода является выполнение тестирования в широких диапазонах температур и pH, что облегчает и ускоряет этап пробоподготовки [56, 57, 59, 60].

Примером успешного клинического опыта создания эффективного инструмента для диагностики COVID-19 является тест N_1 -STOP-LAMP, разработанный австралийскими учёными, основанный на методе RT-LAMP с набором праймеров для детекции участка CDC N_1 гена нуклеокапсида (N) SARS-CoV-2. При проведении испытаний на клинических образцах, предварительно проведенных методом RT-qPCR с E-геном, новая тест-система

Таблица 1

Сравнение методов петлевой изотермической амплификации (LAMP) и классической полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Критерии	LAMP	ПЦР
Температурные циклы	Изотермальная амплификация (60-65° С)	Необходимость различных температурных циклов
Количество праймеров	4(6) специально разработанных праймеров	2 праймера
Время анализа	До 30 мин	2-4 часа
Выход ДНК	Выход ДНК - 10-20 мкг	Выход ДНК - до 0,2 мкг
Визуальная детекция	Возможна	Невозможна
Экономичность и простота выполнения	Экономичный, прост в выполнении	Требует дорогостоящего оборудования и подготовленных специалистов
Чувствительность к ингибиторам пробы	Нечувствительна	Чувствительна
Возможность мультиплексирования	Возможно	Невозможно
Известность метода, оценка в клинических условиях	Мало известен, клиническая оценка продолжается	Хорошо известен, клиническая эффективность доказана

показала 87% чувствительности и 100% специфичности при среднем времени выявления положительного результата 14 мин [61].

Ограничением применения LAMP-тестирования является отсутствие у исследователей достаточного опыта использования метода в условиях эпидемических вспышек и чрезвычайных ситуаций, в клинической интерпретации результатов [54, 59, 61, 62]. Быстрое развитие технологий способствует появлению на рынке новых тест-систем, в том числе, разрешённых для детекции SARS-CoV-2 (табл. 2).

О перспективности LAMP-технологий, как инструмента для диагностики COVID-19, свидетельствуют последние разработки, сочетающие возможности метода с системой молекулярного иммунитета CRISPR-Cas12(13), коллатеральная активность которой против РНК-мишеней вирусов обеспечивает основу для высокоспецифичной и чувствительной детекции SARS-CoV-2 [62].

Иммунохроматографический анализ (ИХА). Другой перспективной технологией экспресс-диагностики коронавирусных инфекций и, в частности, COVID-19, является иммуноанализ латерального потока (lateral flow immunoassay, LFIA), который в России больше известен как иммунохроматографический анализ (ИХА) [6, 13, 52]. Эта диагностическая платформа, основанная на иммуносерологическом тестировании, широко известна в мире уже более 60 лет, все эти десятилетия непрерывно совершенствовалась, в том числе, как простой и экономичный тест РОС для диагностики инфекций [52, 53, 65, 66].

В отличие от молекулярно-генетических диагностических технологий, серологические ИХА тесты могут обнаруживать не только инфекционное заражение пациентов (детектировать антигены в биосубстратах), но и оценивать реакцию иммунной системы (детектировать в крови антитела), и тем самым обеспечивать необходимой информацией для принятия организационных решений [6, 65, 66]. В отличие от ИФА, весь цикл исследования с использованием тест-систем ИХА занимает от 10 до 20 мин [6, 53, 67, 68].

В контексте диагностики инфекций SARS, MERS, COVID-19 экспресс-тесты LFIA чаще всего используются для проверки наличия антител пациента (IgM, IgG) или вирусных антигенов [13, 53, 66, 67]. С помощью ИХА тестов можно выявить не только инфицированных пациентов, но и проводить ретроспективную диагностику тех кто перенёс заболевание бессимптомно, выздоровел и в настоящее время обладает определённой степенью иммунной защиты [6, 66, 69, 70].

ИХА тест-системы для определения антител против SARS-CoV-2 обнаруживают два типа антител по отдельности или оба одновременно, выпускаются в виде наборов для тестирования специалистами клиничко-диагностических лабораторий. Для анализа требуется капля капиллярной или венозной крови пациента, сыворотки или плазмы. Образец наносится на прокладку, далее последовательно вносятся специфические реагенты (конъюгированные антитела) и реагенты для продвижения и взаимодействия антигенов и антител против SARS-CoV-2, присутствующих в образце. Считывание результатов происходит визуально по появляющимся цветовым полосам в контрольной и тестовой зонах.

Проведено ретроспективное исследование динамики образования антител к SARS-CoV-2 с оценкой чувствительности и специфичности четырёх тест-систем ИХА у пациентов, чтобы диагностировать значимость экспресс-серологических тестов в ведении пациентов с COVID-19, диагноз у которых установлен молекулярным тестированием (ОТ-ПЦР) [68]. Через 3 нед. после появления симптомов заболевания все тесты показали наличие антител (IgM, IgG) в сыворотке крови обследуемых. У пациентов с COVID-19, осложнённым пневмонией, выявлено более раннее появление антител против SARS-CoV-2 [68].

Разработан и тестируется ИХА-тест для обнаружения антител IgG к SARV-CoV-2 в сыворотке крови человека [13]. Конструктивные особенности этой тест-системы связаны с использованием наночастиц полистирола, модифицированных лантаноидами, и рекомбинантного нуклеокапсидного протеина SARS-CoV-2, помещённого на нитроцеллюлозную мембрану для захвата специфических антител. Процесс анализа занимает 10 мин [13].

В соответствии с технологией ИХА, инфекционные маркёры могут быть обнаружены в крови (антитела), слюне, секрете верхних дыхательных путей на протяжении всего инфекционного цикла (заражение, инкубационный период, разгар, реконвалесценция) [66, 68, 69]. В отличие от молекулярных методов, использование ИХА экспресс-тестов не требует специальной подготовки специалистов и может использоваться для скрининговых исследований в полевых условиях, на вокзалах, аэропортах, в частных медицинских кабинетах, необорудованных диагностических пунктах, сельских больницах [65, 66, 68].

Использование индивидуальных ИХА тест-систем оказалось более дорогостоящим по сравнению с ИФА в практических приложениях для диагностики инфекций SARS, MERS, COVID-19, их применение оказалось экономически оправданным клиническими преимуществами этой диагностической платформы [65 – 67, 70].

Таблица 2

Тест-системы LAMP (RT-LAMP), разрешённые для детекции SARS-CoV-2

Страна-производитель, фирма-разработчик	Название	Описание	Ссылка
Seasun Biomaterials Inc., Южная Корея	AQ-TOPTM COVID-19 Rapid Detection Kit.	Качественное (RT-LAMP) выявление РНК в пробах слизи рото- и носоглотки, БАЛ и мокроте в острой фазе инфекции. Ответ <30 мин	[63]
Color Genomics, Inc., США	Color Genomics SARS-COV-2 RT-LAMP Diagnostic Assay	Качественное (RT-LAMP) выявление РНК в пробах слизи рото- и носоглотки, БАЛ и мокроте в острой фазе инфекции. Ответ <30 мин	[64]
Мельбурнский университет, Австралия	N1-STOP-LAMP	Качественное (RT-LAMP) выявление участка CDC N1 гена нуклеокапсидного (N) SARS-CoV-2 в пробах слизи рото- и носоглотки, инфекции. Ответ <20 мин	[61]

ИХА тест-системы, одобренные для диагностики COVID-19 [52]

Страны-производители, компании-разработчики	Чувствительность / специфичность тест-систем, %	Описание тест-системы	Используемые биосубстраты, время анализа	Ссылки
US / China, Cellex Inc.	93,8/95,6	Детекция IgM/IgG к нуклеокапсиду SARS-CoV-2	Сыворотка, плазма, цельная кровь (K2-EDTA, цитрат Na), 20 мин	[71]
US, ChemBio	92,7 (IgM) и 95,9 (IgG)/99,0 (IgM и IgG)	Детекция IgM/IgG к нуклеокапсиду SARS-CoV-2	Сыворотка, плазма, цельная кровь (K2-EDTA, гепарин), 15 мин	[72]
US, Autobio Diagnostics Co. Ltd. (+ Hardy Diagnostics)	95,7 (IgM) и 99,0 (IgG)/99,0 (IgM и IgG)	Детекция IgM/IgG к антигенным белкам SARS-CoV-2	Сыворотка, плазма, цельная кровь (K2-EDTA, гепарин), 15 мин	[73]
US / China, Healgen Scientific LLC	96,7 (IgG), 86,7 (IgM), 96,7 / 98,0 (IgG), 99,0 (IgM), 97,0	Детекция IgM/IgG к антигенным белкам SARS-CoV-2	Сыворотка, плазма, цельная кровь (K2-EDTA, гепарин), 10 мин	[74]
China, Hangzhou Biotest Biotech Co., Ltd	92.5 (IgM), 91.56 (IgG)/98.1 (IgM), 99.52 (IgG)	Детекция IgM/IgG к S1 локусу S белка SARS-CoV-2	Сыворотка, плазма, цельная кровь (K2-EDTA, гепарин), 20 мин	[75]
US / China, Aytu Biosciences / Orient Gene Biotech	87.9 (IgM) & 97.2 (IgG)/100,0 (IgG и IgM)	Детекция IgM/IgG к антигенным белкам SARS-CoV-2	Сыворотка, плазма, цельная кровь (K2-EDTA, цитрат Na), 10 мин	[76]

В ходе борьбы с пандемией COVID-19 разработано и предложено множество различных диагностических систем, основанных на принципах ИХА, которые различаются между собой чувствительностью и специфичностью [68, 70]. Некоторые из предложенных платформ прошли необходимую экспертизу и получили разрешение на использование в клинической практике (табл. 3).

Надежная эффективность и высокая чувствительность при детекции специфических антител к SARS-CoV-2 с использованием ИХА показывает, что эти технологии могут быть полезным диагностическим инструментом в дополнение к молекулярным методам для диагностики COVID-19.

Международный опыт использования серологических тестов на основе ИХА для устранения эпидемических вспышек коронавирусных инфекций показал важность и необходимость этого диагностического инструмента. Наиболее рациональным применением этого диагностического инструмента является массовый скрининг населения из групп риска, пациентов с бессимптомной формой заболевания. Все положительные результаты должны быть подтверждены количественными молекулярно-генетическими методами.

Заключение. Некоторые успехи в борьбе с пандемией COVID-19 достигнуты, в том числе, благодаря хорошо зарекомендовавшим себя основным инструментам лабораторной диагностики, в первую очередь, молекулярно-генетическим и иммуноферментным методам. На оптимизацию этих технологий потребовались десятилетия, но сейчас они имеют ключевое значение в выявлении и контроле распространения COVID-19. Опыт, полученный при ликвидации эпидемий SARS, MERS, послужили основой для разработки лабораторной стратегии для индикации вируса SARS-CoV-2 и антител к нему в период пандемии COVID-19. Их грамотное выполнение, своевременная и правильная интерпретация результатов позволяют вовремя принимать необходимые организационные решения. По-прежнему существует необходимость в поиске и разработке быстрых, надежных, экономичных, но не менее чувствительных и специфичных диагностических инструментов для выявления и борьбы с распространением инфекции, вызванной SARS-CoV-2.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. World Health Organization (WHO) official website. Available at: <https://www.who.int/docs/default-source/coronavirus/situation-reports/20200701-covid-19-sitrep-163.pdf?sfvrsn=c202f05b2> (accessed on September 2, 2020).
2. Centers for Disease Control and Prevention (2019). Novel coronavirus, Wuhan, China. Information for Healthcare Professionals. Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/hcp/index.html> (Accessed on September 11, 2020).
3. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) COVID 19 (2020). Available at: <https://www.ecdc.europa.eu/en/novel-coronavirus-china> Online: last update August 11, 2020.
4. Guan W.J., Ni Z.Y., Hu Y., Liang W.H., Ou C.Q., He J.X. et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(18):1708–20. Doi: 10.1056/NEJMoa2002032.
5. Gorbalenya A.E., Baker S.C., Baric R.S., de Groot R.J., Drosten C., Gulyaeva A.A. et al. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: The species and its viruses – a statement of the Coronavirus Study Group. *bioRxiv*. 2020. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.02.07.937862v1> (Accessed on August 30, 2020).
6. Wu J.L., Tseng W.P., Lin C.H., Lee T.-F., Ming-Yi Chung, Huang C.-H. et al. Four point-of-care lateral flow immunoassays for diagnosis of COVID-19 and for assessing dynamics of antibody responses to SARS-CoV-2. *J. Infect.* 2020; 81(3): 435–42. Doi: 10.1016/j.jinf.2020.06.023.
7. Ghebreyesus T.A., Swaminathan S. Scientists are sprinting to outpace the novel coronavirus. *Lancet*. 2020; 395(10226): 762–64. Doi: 10.1016/S0140-6736(20)30420-7.
8. World Health Organization. Novel Coronavirus (2019-nCoV) technical guidance (2020). Available at: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance> (Accessed on September 11, 2020).
9. Petrosillo N., Viceconte G., Ergonul O., Ippolito G., Petersen E. COVID-19, SARS and MERS: are they closely related? *Clin. Microbiol. Infect.* 2020; 26(6): 729–34. Doi: 10.1016/j.cmi.2020.03.026.
10. Noh J.Y., Yoon S.W., Kim D.J., Lee M.S., Kim J.H., Na W. et al. Simultaneous detection of severe acute respiratory syndrome, Middle East respiratory syndrome, and related bat coronaviruses by real-time reverse transcription PCR. *Arch. Virol.* 2017; 162(6): 1617–23. Doi: 10.1007/s00705-017-3281-9.

11. Pfefferle S., Reucher S., Nörz D., Lütgehetmann M. Evaluation of a quantitative RT-PCR assay for the detection of the emerging coronavirus SARS-CoV-2 using a high throughput system. *Euro Surveill.* 2020; 25(9): 2000152. Doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.9.2000152.
12. Pallesen J., Wang N., Corbett K.S., Wrapp D., Kirchdoerfer R.N., Turner H.L. et al. Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017; 114(35): E7348–57. Doi: 10.1073/pnas.1707304114.
13. Chen Z., Zhang Z., Zhai X., Li Y., Lin L., Zhao H. et al. Rapid and Sensitive Detection of anti-SARS-CoV-2 IgG, Using Lanthanide-Doped Nanoparticles-Based Lateral Flow Immunoassay. *Anal. Chem.* 2020; 92(10): 7226–31. Doi: 10.1021/acs.analchem.0c00784.
14. Terpos E., Ntanasis-Stathopoulos I., Elalamy I., Kastritis E., Sergentanis T.N., Politou M., et al. Hematological findings and complications of COVID-19. *Am. J. Hematol.* 2020; 95(7): 834–47. Doi: 10.1002/ajh.25829.
15. Corman V.M., Landt O., Kaiser M., Molenkamp R., Meijer A., Chu D.K. et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro. Surveill.* 2020; 25(3): 2000045. Doi: 10.2807/1560-7917.
16. Chu D.K.W., Pan Y., Cheng S.M.S., Hui K.P.Y., Krishnan P., Liu Y. et al. Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia. *Clin. Chem.* 2020; 66(4): 549–55. Doi: 10.1093/clinchem/hvaa029.
17. Oliveira B.A., Oliveira L.C., Sabino E.C., Okay T.S. SARS-CoV-2 and the COVID-19 disease: a mini review on diagnostic methods. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao. Paulo.* 2020; 62: e44. Doi: 10.1590/S1678-9946202062044.
18. Lu H., Stratton C.W., Tang Y.W. An Evolving Approach to the Laboratory Assessment of COVID-19. *J. Med. Virol.* 2020. Doi:10.1002/jmv.25954.
19. Catanzaro M., Fagiani F., Racchi M., Corsini E., Govoni S., Lanni C. Immune response in COVID-19: addressing a pharmacological challenge by targeting pathways triggered by SARS-CoV-2. *Sig. Transduct. Target. Ther.* 2020; 5: 84. Doi: 10.1038/s41392-020-0191-1.
20. Pascarella G., Strumia A., Piliengo C., Bruno F., Del Buono R., Costa F. et al. COVID-19 diagnosis and management: a comprehensive review. *J. Intern. Med.* 2020; 288(2):192-206. doi: 10.1111/joim.13091.
21. Zou L., Ruan F., Huang M., Liang L., Liang L., Huang H., Hong Z. et al. SARS-CoV-2 viral load in upper respiratory specimens of infected patients. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(12): 1177–9. Doi: 10.1056/NEJMc2001737.
22. Callaway E., Ledford H., Mallapaty S. Six months of coronavirus: the mysteries scientists are still racing to solve. *Nature.* 2020; 583(7815): 178–9. Doi: 10.1038/d41586-020-01989-z.
23. Patel R., Babady E., Theel E.S., Storch G.A., Pinsky B.A., George K. et al. Report from the American Society for Microbiology COVID-19. International Summit, 23 March 2020: Value of Diagnostic Testing for SARS-CoV-2/COVID-19. *mBio.* 2020; 11(2): e00722-20. Doi: 10.1128/mBio.00722-20.
24. Tang Y.W., Schmitz J.E., Persing D.H., Stratton C.W. Laboratory Diagnosis of COVID-19: Current Issues and Challenges. *J. Clin. Microbiol.* 2020; 58(6): e00512-20. Doi: 10.1128/JCM.00512-20.
25. Wu A., Peng Y., Huang B., Ding X., Wang X., Niu P. et al. Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. *Cell. Host. Microbe.* 2020; 27(3): 325–8. Doi: 10.1016/j.chom.2020.02.001.
26. Shen Z., Xiao Y., Kang L., Ma W., Shi L., Zhang L. et al. Genomic Diversity of Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus 2 in Patients with Coronavirus Disease 2019. *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71(15): 713–20. Doi: 10.1093/cid/ciaa203.
27. Phan T. Genetic diversity and evolution of SARS-CoV-2. *Infect. Genet. Evol.* 2020; 81: 104260. Doi: 10.1016/j.meegid.2020.104260.
28. Wang Y., Kang H., Liu X., Tong Z. Combination of RT-qPCR testing and clinical features for diagnosis of COVID-19 facilitates management of SARS-CoV-2 outbreak. *J. Med. Virol.* 2020; 92(6): 538–39. Doi: 10.1002/jmv.25721.
29. Wang Y., Wang Y., Chen Y., Qin Q. Unique epidemiological and clinical features of the emerging 2019 novel coronavirus pneumonia (COVID-19) implicate special control measures. *J. Med. Virol.* 2020; 92: 568–76. Doi: 10.1002/jmv.25748.
30. Adams N.M., Leelawong M., Benton A., Quinn C., Haselton F.R., Schmitz J.E. COVID-19 diagnostics for resource – limited settings: Evaluation of “unextracted” qRT-PCR. *J. Med. Virol.* 2020. Doi: 10.1002/jmv.26328.
31. Alcoba-Florez J., Gil-Campesino H., de Artola D.G., González-Montelongo R., Valenzuela-Fernández A., Ciuffreda L. et al. Sensitivity of different RT-qPCR solutions for SARS-CoV-2 detection. *Int. J. Infect. Dis.* 2020; 99: 190-2. Doi: 10.1016/j.ijid.2020.07.058.
32. Malik Y.S., Sircar S., Bhat S., Sharun K., Dhama K., Dadar M. et al. Emerging novel coronavirus (2019-nCoV)-current scenario, evolutionary perspective based on genome analysis and recent developments. *Vet. Q.* 2020; 40(1): 68–76. Doi: 10.1080/01652176.2020.1727993.
33. Kim J.Y., Ko J.H., Kim Y., Kim Y.J., Kim J.M., Chung Y.S. et al. Viral Load Kinetics of SARS-CoV-2 Infection in First Two Patients in Korea. *J. Korean. Med. Sci.* 2020; 35(7): e86. Doi: 10.3346/jkms.2020.35.e86.
34. Tahamtan A., Ardebili A. Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: issues affecting the results. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 2020; 20(5): 453-4. Doi: 10.1080/14737159.2020.1757437.
35. Udugama B., Kadhiresan P., Kozlowski H.N., Malekjahani A., Osborne M., Li V.Y.C. et al. Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection. *ACS Nano.* 2020; 14(4): 3822–35. Doi: 10.1021/acsnano.0c02624.
36. Sri Santosh T., Parmar R., Anand H., Srikanth K., Saritha M. A Review of Salivary Diagnostics and Its Potential Implication in Detection of Covid-19. *Cureus.* 2020; 12(4): e7708. Doi:10.7759/cureus.7708.
37. Wan D.Y., Luo X.Y., Dong W., Zhang Z.W. Current practice and potential strategy in diagnosing COVID-19. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2020; 24(8): 4548–53. Doi: 10.26355/eurrev_202004_21039.
38. Bustin S.A., Nolan T. RT-qPCR Testing of SARS-CoV-2: A Primer. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(8): 3004. Doi: 10.3390/ijms21083004.
39. Yang Y., Yang M., Shen C., Wang F., Yuan J., Li J. et al. Evaluating the accuracy of different respiratory specimens in the laboratory diagnosis and monitoring the viral shedding of 2019-nCoV infections. *medRxiv.* 2020. Doi: 10.1101/2020.02.11.20021493.
40. Jo S., Kim S., Shin D.H., Kim M.S. Inhibition of SARS-CoV 3CL protease by flavonoids. *J. Med. Chem. Enzyme. Inhib.* 2020; 35(1): 145–51. Doi: 10.1080/14756366.2019.1690480.
41. Yip C.C., Ho C.C., Chan J.F., Kai-Wang To K., Shuk-Ying Chan H., Cheuk-Ying Wong S. et al. Development of a Novel, Genome Subtraction-Derived, SARS-CoV-2-Specific COVID-19-nsp2 Real-Time RT-PCR Assay and Its Evaluation Using Clinical Specimens. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(7): 2574. Doi: 10.3390/ijms21072574.
42. Winichakoon P., Chaiwarith R., Liwsrisakun C., Salee P., Goonna A., Limsukon A. et al. Negative nasopharyngeal and oropharyngeal swab does not rule out COVID-19. *J. Clin. Microbiol.* 2020; 58(5): e00297-20. Doi: 10.1128/JCM.00297-20.
43. Wan Z., Zhang Y., He Z., Liu J., Lan K., Hu Y. et al. A Melting Curve-Based Multiplex RT-qPCR Assay for Simultaneous Detection of Four Human Coronaviruses. *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17(11): 1880. Doi: 10.3390/ijms17111880.
44. Zhong L., Chuan J., Gong B., Shuai P., Zhou Y., Zhang Y. et al. Detection of serum IgM and IgG for COVID-19 diagnosis. *Sci. China Life Sci.* 2020; 63(5): 777-80. Doi: 10.1007/s11427-020-1688-9.
45. Guo L., Ren L., Yang S., Xiao M., Chang D., Yang F. et al. Profiling early humoral response to diagnose novel Coronavirus disease (COVID-19). *Clin. Infect. Dis.* 2020. 71(15): 778-85. Doi: 10.1093/cid/ciaa310.
46. Xiang F., Wang X., He X., Peng Z., Yang B., Zhang J. et al. Antibody Detection and Dynamic Characteristics in Patients with COVID-19. *Clin. Infect. Dis.* 2020. ciaa461. Doi: 10.1093/cid/ciaa461.
47. Lv H., Wu N.C., Tsang O.T., Yuan M., Perera R.A.P.M., Leung W.S. et al. Cross-reactive Antibody Response between SARS-CoV-2 and SARS-CoV Infections. *Cell Rep.* 2020; 31(9): 107725. Doi: 10.1016/j.celrep.2020.107725.
48. Brouwer P.J.M., Daniels T.G., van der Straten K., Snitselaar J.L., Aldon

- Y., Bangaru S. et al. Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability. *Science*. 2020; 369(6504): 643–50. Doi: 10.1126/science.abc5902.
49. Chia W.N., Tan C.W., Foo R., Kang A.E.Z., Peng Y., Sivalingam V. et al. Serological differentiation between COVID-19 and SARS infections. *Emerg. Microbes Infect.* 2020; 9(1): 1497–1505. Doi: 10.1080/22221751.2020.1780951.
50. Wang S.F., Tseng S.P., Yen C.H., Yang J.-Y., Ching-Han Tsao, Chun-Wei Shen et al. Antibody-dependent SARS coronavirus infection is mediated by antibodies against spike proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014; 451(2): 208–14. Doi: 10.1016/j.bbrc.2014.07.090.
51. Döhla M., Boesecke C., Schulte B., Diegmann C., Sib E., Richter E. et al. Rapid point-of-care testing for SARS-CoV-2 in a community screening setting shows low sensitivity. *Public Health*. 2020; 182: 170–2. Doi: 10.1016/j.puhe.2020.04.009.
52. Johns Hopkins University Health Safety Center official website (2020). Available at: <https://www.centerforhealthsecurity.org/resources/COVID-19/serology/Serology-based-tests-for-COVID-19.html> (accessed on 14 June 2020).
53. Augustine R., Hasan A., Das S., Ahmed R., Mori Y., Notomi T. et al. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): A Rapid, Sensitive, Specific, and Cost-Effective Point-of-Care Test for Coronaviruses in the Context of COVID-19 Pandemic. *Biology* (Basel). 2020; 9(8): 182. Doi: 10.3390/biology9080182.
54. Huang W.E., Lim B., Hsu C.C., Xiong D., Wu W., Yu Y. et al. RT-LAMP for rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2. *Microb. Biotechnol.* 2020; 13(4): 950–61. Doi: 10.1111/1751-7915.13586.
55. Lamb L.E., Bartolone S.N., Ward E., Chancellor M.B. Rapid detection of novel coronavirus/Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *PLoS One*. 2020; 15(6): e0234682. Doi: 10.1371/journal.pone.0234682.
56. Shen M., Zhou Y., Ye J., Al-Maskri A., Kang Y., Zeng S. et al. Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus. *J. Pharm. Anal.* 2020; 10(2): 97–101. Doi: 10.1016/j.jpha.2020.02.010.
57. Yu L., Wu S., Hao X., Dong X., Mao L., Pelechano V. et al. Rapid Detection of COVID-19 Coronavirus Using a Reverse Transcriptional Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Diagnostic Platform. *Clin. Chem.* 2020; 66(7): 975-7. Doi: 10.1093/clinchem/hvaa102.
58. Kashir J., Yaqinuddin A. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assays as a rapid diagnostic for COVID-19. *Med. Hypotheses*. 2020; 141: 109786. Doi: 10.1016/j.mehy.2020.109786.
59. Thompson D., Lei Y. Mini review: Recent progress in RT-LAMP enabled COVID-19 detection. *Sensors and Actuators Reports*. 2020; 2(1): 100017. Doi: 10.1016/j.sn.2020.100017.
60. Koch T., Dahlke C., Fathi A., Kupke A., Krähling V., Okba N.M.A. et al. Safety and immunogenicity of a modified vaccinia virus Ankara vector vaccine candidate for Middle East respiratory syndrome: an open-label, phase 1 trial. *Lancet. Infect. Dis.* 2020; 20(7): 827–38. Doi: 10.1016/S1473-3099(20)30248-6.
61. Lee J.Y.H., Best N., McAuley J., Porter J.L., Seemann T., Schultz M.B. et al. Validation of a single-step, single-tube reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of SARS-CoV-2 RNA. *J. Med. Microbiol.* 2020. Doi: 10.1099/jmm.0.001238.
62. Ali Z., Aman R., Mahas A., Sivakrishna Rao G., Tehseen M., Mar-sic T. et al. iSCAN: An RT-LAMP-coupled CRISPR-Cas12 module for rapid, sensitive detection of SARS-CoV-2. *Virus Res.* 2020; 288: 198129. Doi: 10.1016/j.virusres.2020.198129.
63. Seasun Biomaterials Inc. official website (2020). Available at: <http://www.seasunbio.com>. (accessed on 02/09/2020).
64. Color Genomics, Inc., official website (2020). Available at: <https://www.color.com>. (accessed on 06/09/2020).
65. Montesinos I., Gruson D., Kabamba B., Dahma H., Van den Wijngaert S., Reza S. et al. Evaluation of two automated and three rapid lateral flow immunoassays for the detection of anti-SARS-CoV-2 antibodies. *J. Clin. Virol.* 2020; 128: 104413. Doi: 10.1016/j.jcv.2020.104413.
66. Andryukov B.G. Six decades of lateral flow immunoassay: from determining metabolic markers to diagnosing COVID-19. *AIMS Microbiol.* 2020; 6(3): 280–304. Doi: 10.3934/microbiol.2020018.
67. Zhang Y., Kong H., Liu X., Cheng J., Zhang M., Wang Y. et al. Quantum dot-based lateral-flow immunoassay for rapid detection of rhein using specific egg yolk antibodies. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 2018; 46(8): 1685–93. Doi: 10.1080/21691401.2017.1389749.
68. Wu J.L., Tseng W.P., Lin C.H., Chien-Hao Lina, Tai-Fen Leeb, Ming-Yi Chung et al. Four point-of-care lateral flow immunoassays for diagnosis of COVID-19 and for assessing dynamics of antibody responses to SARS-CoV-2. *J. Infect.* 2020; 81(3): 435-2. Doi: 10.1016/j.jinf.2020.06.023.
69. Wen T., Huang C., Shi F.J., Xiao-Yan Zeng, Tian Lu, Shou-Nian Ding et al. Development of a lateral flow immunoassay strip for rapid detection of IgG antibody against SARS-CoV-2 virus. *Analyst*. 2020. Doi: 10.1039/d0an00629g.
70. Nicol T., Lefeuvre C., Serri O., Piverta A., Joubau F., Dubée V. et al. Assessment of SARS-CoV-2 serological tests for the diagnosis of COVID-19 through the evaluation of three immunoassays: Two automated immunoassays and one rapid lateral flow immunoassay (NG Biotech). *J. Clin. Virol.* 2020; 129: 104511. Doi: 10.1016/j.jcv.2020.104511.
71. Cellex Ltd. official website. Cellex qSARS-CoV-2 IgG/IgM Rapid Test (2020). Available at: <https://cellexcovid.com> (accessed on August, 23, 2020).
72. ChemBio Ltd. official website. DPP® COVID-19 IgM/IgG System (2020). Available at: <http://chembio.com> (accessed on August, 22, 2020).
73. Hardy diagnostics official website. Anti-SARS-CoV-2 Rapid Test (2020). Available at: <https://hardydiagnostics.com/sars-cov-2> (accessed on August, 23, 2020).
74. Healgen Scientific LLC official website. COVID-19 Antibody Rapid Detection Kit (2020). Available at: <https://www.healgen.com/if-respiratory-covid-19> (accessed on August, 25, 2020).
75. Hangzhou Biotest Biotech Co., Ltd official website. Right Sign™ COVID-19 IgM/IgG Rapid Test Kit (2020). Available at: <https://www.healgen.com/if-respiratory-covid-19> (accessed on August, 25, 2020).
76. Aytu Biosciences/Orient Gene Biotech official website. The COVID-19 IgG/IgM Point-of-Care Rapid Test (2020). Available at: <https://stocknewsnow.com/companynews/5035338834942348/AYTU/101843> (accessed on August, 24, 2020).

Поступила 28.09.20

Принята к печати 05.10.20

© КИМИРИЛОВА О.Г., ХАРЧЕНКО Г.А., 2020

Кимирилова О. Г., Харченко Г. А.

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ МЕТОДОВ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ КОКСИЕЛЛЁЗА У ДЕТЕЙ

ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 414000, Астрахань, Россия

Актуальность проблемы коксиеллёза у детей определяется эндемичностью этой патологии для ряда регионов России. Цель исследования: оценить результаты диагностики коксиеллёза у детей методами реакции связывания комплемента (РСК), иммуноферментного анализа (ИФА), полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Проведён ретроспективный анализ результатов обследования на коксиеллёз в 3-х группах детей в возрасте от 7 до 17 лет: 1-я группа (n=30) – методом РСК; 2-я группа (n=34) – методом ИФА; 3-я группа (n=35) – методом ПЦР, находившихся на стационарном лечении в ГБУЗ «Областная инфекционная клиническая больница им. А. М. Ничоги» г. Астрахань в период с января 2010 по январь 2020 г.

Наиболее информативными методами диагностики коксиеллёза у детей в течение первых 7 дней от начала болезни является ПЦР (специфичность – 95%, чувствительность – 92%), после 7 дня ИФА (специфичность – 91%, чувствительность – 94%). Чувствительность РСК – 70%, специфичность 87%.

Ключевые слова: дети; коксиеллёз; лабораторная диагностика; РСК; ИФА; ПЦР.

Для цитирования: Кимирилова О. Г., Харченко Г. А. Клиническая значимость методов лабораторной диагностики коксиеллёза у детей. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020;65 (12): 767-770. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-12-767-770>

Kimirilova O. G., Kharchenko G. A.

CLINICAL SIGNIFICANCE OF LABORATORY DIAGNOSTICS METHODS FOR COXYELLOSIS IN CHILDREN

Astrakhan state medical University Ministry of health of Russia, 414000, Astrakhan, Russia

The urgency of the problem of coxyellosis in children is determined by the endemic nature of this pathology for a number of regions of Russia. The purpose of the study: to evaluate the results of diagnosis of coxyellosis in children using the methods of complement binding reaction (RSC), enzyme immunoassay (ELISA), and polymerase chain reaction (PCR). Retrospective analysis of the survey on Coxiella in 3 groups of children aged 7 to 17 years: group 1 (n=30) method RSK; group 2 (n=34) – by ELISA; group 3 (n=35) – PCR, were hospitalized in GBUZ «Regional clinical infectious hospital named. A. M. Nicholi» Astrakhan in the period from January 2010 to January 2020.

The most informative methods of diagnosis of coxyellosis in children during the first 7 days from the onset of the disease is the PCR reaction (specificity-94%, sensitivity-91%), after the 7th day of the disease ELISA (specificity -91%, sensitivity – 94%). The sensitivity of the RSC method is 70%, the specificity is 87%.

Key words: children; coxiellosis; laboratory diagnostics; RSC; ELISA; PCR.

For citation: Kimirilova O. G., Kharchenko G. A. Clinical significance of laboratory diagnostics of coxyellosis in children. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020;65 (12): 767-770 (in Russ.)

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-12-767-770>

For correspondence: Kimirilova Olga Gennadjevna; e-mail: 0lgakim@mail.ru

Information about authors:

Kimirilova O. G. <http://orcid.org/0000-0003-4066-2431>;

Kharchenko G. A. <http://orcid.org/0000-0001-7764-0995>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 03.06.2020

Accepted 16.06.2020

Показатель заболеваемости коксиеллёзом в России 0,07 на 100 тыс. населения, на ряде территорий Сибири, Центральной Чернозёмной зоны Южного Федерального округа находится в интервале от 5,39 до 16,3 на 100 тыс. населения [1, 2].

Основными симптомами типичных форм коксиеллёза являются: лихорадка до 39-40°C, сопровождающаяся ознобами, головные боли, бессонница, сухой болезненный кашель, миалгии, ретробульбарные боли, увеличение размеров печени. При аэрогенном пути заражения развивается специфическая пневмония [3-6]. *Coxiella*

burnetii может длительно персистировать в организме человека, способствуя развитию затяжных и хронических форм болезни. У 50% инфицированных коксиеллёзом, болезнь протекает атипично [7, 8].

Лабораторными методами диагностики коксиеллёза являются: культуральный (выделение возбудителя из крови, мокроты, мочи на культуре клеток), биологический, серологический (РСК, РНИФ). Чаще используются ИФА (определения специфических антител (АТ) к антигенам (АГ) *Coxiella burnetii* – IgM, IgG), ПЦР – молекулярно-генетический метод обнаружения генома

Для корреспонденции: Кимирилова Ольга Геннадьевна, канд. мед. наук, доц. каф. детских инфекций АГМУ; e-mail: 0lgakim@mail.ru

возбудителя в крови [2,9]. Результаты серодиагностики, ПЦР при коксиеллёзе, представленные в ряде научных работ [10-13], носят неоднозначный характер по их значимости в плане постановки диагноза коксиеллёза.

Цель исследования – оценить результаты диагностики коксиеллёза у детей методами РСК, ИФА, ПЦР.

Материал и методы. Проведено ретроспективное, когортное исследование. Источниками информации являлись: «Сведения о инфекционных и паразитарных заболеваниях» Управления Роспотребнадзора Астраханской области (АО), медицинская документация – 99 карт стационарного больного, результаты обследования пациентов с верифицированным диагнозом коксиеллёза, в возрасте от 7 до 17 лет, лечившихся в ГБУЗ АО «Областная инфекционная больница им. А. М. Ничоги» г. Астрахань в период с января 2010 г. по январь 2020 г.

Учитывались случаи болезни, подтвержденные результатами лабораторных исследований: 1) РСК с антигеном Бернета (СПб. НИИЭМ им. Пастера); 2) ИФА крови с использованием коммерческой тест-системы «*S. burnetii* ELISA IgM, IgG»; 3) ПЦР крови с использованием реагентов «АмплиСенс *Coxiella burnetii*» (ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора).

Взятие биоматериала для обнаружения антител к *S. burnetii* проводилось в день госпитализации (4,6±1,2 день от начала болезни), затем через 7-10 дней (12,6±2,8 и 21,5±1,9 день от начала болезни). Подтверждением диагноза коксиеллёза служило: наличие АТ класса IgM, нарастание титра специфических АТ в парных сыворотках крови, исследуемых в РСК и ИФА; детекция ДНК *S. burnetii*, при исследовании методом ПЦР. Всем больным проводили общеклинические и биохимические исследования крови в соответствии со стандартами оказания медицинской помощи больным коксиеллёзом. Лабораторные исследования (общеклинические, биохимические, РСК, ИФА, ПЦР) проводились в лаборатории ГБУЗ АО «Областная инфекционная клиническая больница им. А.М. Ничоги» г. Астрахань.

Заключение этического комитета на проведение исследования не запрашивалось.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета «Statistica 6,0 (Stat Soft, USA). Количественные показатели оценивали по среднему арифметическому значению и стандартному отклонению. Сравнение количественных показателей в 3 группах обследованных (РСК, ИФА ПЦР) выполнено с применением дисперсионного анализа, качественных показателей с применением критерия χ^2 .

Результаты. Из 99 детей, вошедших в исследование, 94 (95%) приходилось на детей из организованных коллективов (школьники младших и старших классов), проживающих в городе 87 (88%). В возрастной структуре больных коксиеллёзом на долю детей в возрасте 7-10 лет приходилось 28 (28%), 11 – 14 лет – 49 (50%), старше

14 лет 22 (22%) случая коксиеллёза, от общего количества больных. Во всех возрастных группах больных коксиеллёзом преобладали мальчики до 80% (табл. 1).

Клиническая симптоматика коксиеллёза обуславливалась сочетанием лихорадки у 89 (90%) с ознобами у 56 (56%), головной болью у 26 (26%), сухим кашлем у 32 (32%), миалгией у 20 (20%), ретробульбарными болями у 12 (12%), увеличением печени у 76 (76%) пациентов, с повышением активности АЛТ до 1,4±0,3 мкмоль/л и показателя билирубина до 24,5±2,6 мкмоль/л. Изменения в общем анализе крови разнонаправленные: умеренный лейкоцитоз у 15%, лейкопения у 20%, нормоцитоз у 65%, анемия у 23%, тромбоцитопения у 6%, ускорение СОЭ у 31% из 99 больных. По результатам РСК с АГ *S. burnetii*, в парных сыворотках крови, установлено, что чувствительность этого метода исследования 70%, специфичность 87%. В первые 5-6 дней от начала болезни АТ выявлялись у 20% больных в титре 1:80,0±32,5, в конце 2-3-й нед от начала болезни у 50% в титре 1:380,0±86,5.

Исследование специфических АТ класса IgM, IgG в сыворотке крови методом ИФА проводилось у 34 больных. АТ класса IgM появлялись в крови 32 (94%) больных коксиеллёзом на 7,6±1,8 день болезни в титре 1:120,0±21,5 и у 9 (28%) из них сохранялись до 17,8±2,3 дня от начала болезни в титре 1:420,0±124,8. АТ класса IgG обнаруживались в первые 7 дней от начала болезни у 9 (26%) из 34 больных в титре 1:40,0±10,6, в конце 2-3-й нед у 32 (94%) больных в титре 1:280,0±65,9. Специфичность метода 91%, чувствительность 94% (табл. 2). У 2 (6%) пациентов, при наличии характерных симптомов коксиеллёза, специфические АТ класса IgM и IgG отсутствовали, при наличии ДНК *S. burnetii* (на 6-й день от начала болезни), что не исключает ложноотрицательный результат ИФА причины которого могут быть различными (особенности чувствительности, нарушения условий постановки реакции и др.).

Специфичность и чувствительность ПЦР по обнаружению ДНК коксиелл в сыворотке крови – 95% и 92% соответственно (табл. 2).

Максимальное количество положительных результатов ПЦР у 32 (91%) из 35 пациентов приходилось на первые 7 дней от начала болезни. У 3 (9%) пациентов, при проведении исследования после 10 дня от начала болезни, результаты ПЦР отрицательные, при наличии специфических АТ класса IgG в титре 1:140,0±34,6. Отрицательный результат ПЦР у этих больных обуславливается поздним проведением ПЦР-диагностики от начала болезни.

Приводим клиническое наблюдение. Больной А., 14 лет, поступил на стационарное лечение 15 марта 2017 г. с направительным диагнозом «Вирусная инфекция неуточненной этиологии».

Из анамнеза болезни установлено, что со 2 марта 2017 г. отмечают: повышение температуры тела до

Таблица 1

Дети, обследованные по поводу коксиеллёза

Показатель	Группы обследованных			p
	1-я (n=30)	2-я (n=34)	3-я (n=35)	
Девочки/мальчики, абс.	24/6	27/7	29/6	0,890
Возраст, годы	11,6±4,2	14,3±3,4	11,9±4,6	0,670

Примечание. 1-я группа – больные, обследованные методом РСК; 2-я группа – методом ИФА крови; 3-я группа – методом ПЦР; p – значимость качественных показателей при df=2.

39,5°C, слабость, нарушения аппетита, сна. Лечился самостоятельно симптоматическими средствами и антибактериальными препаратами. За медицинской помощью обратился 15.03.2017 г.

Эпидемиологический анамнез: проживает в сельской местности. У семьи есть подсобное хозяйство (несколько коров). Молоко употребляет в пищу без термической обработки. Все члены семьи здоровы, лихорадящих лиц в окружении больного нет.

Объективно: состояние средней тяжести. Температура тела 37,9° С. Кожные покровы чистые. Периферические лимфоузлы не пальпируются. Редкий сухой кашель. Число дыханий 18 в 1 минуту. Аускультативно дыхание проводится по всем полям. Слева в нижней доле выслушиваются мелкопузырчатые хрипы, не меняющие своей локализации. Рентгенографически установлено наличие инфильтративных изменений в нижней доле левого лёгкого. Гемодинамика удовлетворительная. Число сердечных сокращений 86 в 1 мин. Тоны сердца громкие, шумов нет. Артериальное давление 110/70 мм. рт. ст. Аппетит умеренно снижен. Тошноты, рвоты нет. Зев бледно-розовой окраски. Живот мягкий, чувствительный при глубокой пальпации справа. Печень на 2 см ниже края рёберной дуги, мягко эластической консистенции. В общем анализе крови количество лейкоцитов $11,6 \times 10^9/\text{л}$, формула крови без существенных изменений. Количество эритроцитов $4,1 \times 10^{12}/\text{л}$, тромбоциты $105 \times 10^9/\text{л}$. СОЭ – 15 мм/ч, билирубин – 19,7 мкмоль/л, АЛТ – 1,6 мкмоль/л. Результаты обследования на коксиеллёз от 15. 03. 2017 г.: ПЦР – отрицательная, ИФА – АТ класса IgM отсутствуют, АТ класса IgG положительные в титре 1:200 с увеличением титра АТ во второй сыворотке крови до 1:400.

Отсутствие ДНК и специфических АТ класса IgM объясняется поздним проведением исследования от начала болезни (на 14-й день). В эти сроки от начала болезни ПЦР становится отрицательной, АТ класса IgM замещаются АТ класса IgG, титр которых в динамике нарастает. В последующем АТ класса IgG к *S. burnetii* сохраняются в крови лиц, перенесших коксиеллёз. Нарастание титра АТ класса IgG в нашем примере свидетельствует о текущем заболевании и является основанием для постановки диагноза: острый коксиеллёз.

Обсуждение. По нашим данным специфичность РСК составляла 87%, чувствительность 70%. Считают, что РСК позволяет выявлять АТ к *S. burnetii* на 2-3-й неделе от начала болезни и только у 60% больных коксиеллёзом [12]. Противоположные результаты приводятся в исследовании [14], где установлены положительные результаты РСК у 27% больных коксиеллёзом на 1 нед, у 73% на 2-4 нед от начала болезни. Различия в оценке диагностической значимости РСК может обуславливаться методическим качеством исследований и различиями в оценке полученных данных. Недостатками РСК являются ретроспективный характер и длительное

наличие комплементфиксирующих АТ у переболевших коксиеллёзом, возможность перекрестных реакций у больных с брюшным тифом, орнитозом, что снижает значимость РСК для диагностики острого коксиеллёза. Учитывая длительное наличие АТ в крови людей, перенесших коксиеллёз, РСК может использоваться для выявления иммунных лиц среди населения эндемичных по коксиеллёзу территорий.

При изучении серологических маркёров коксиеллёза в ИФА, у лихорадящих больных, на наличие специфических АТ класса IgM и IgG к *S. burnetii* выявлено 17,2% серопозитивных лиц с высоким титром АТ нарастающих в динамике; считается, что это позволяет диагностировать коксиеллёз и установить период болезни [13]. Специфические АТ класса IgM к *S. burnetii* обнаруживались у 59% пациентов в течение 2 нед от начала болезни, а АТ класса IgG у 55% больных с 7 по 32 день от начала болезни [14]. По нашим данным специфичность ИФА к *S. burnetii* составляла 91%, чувствительность 94%.

При оценке результатов ИФА необходимо учитывать, что IgM появляются в крови больных коксиеллёзом в конце 1-й недели от начала болезни и достаточно быстро исчезают. IgG обнаруживаются позже и могут сохраняться в крови в течение длительного времени после перенесенного заболевания, что требует проведения дополнительного обследования с целью определения нарастания титра АТ класса IgG, обнаружения ДНК возбудителя методом ПЦР (в зависимости от длительности заболевания). Определение АТ к *S. burnetii* позволяет установить стадию патологического процесса при коксиеллёзе: наличие IgM (при отсутствии IgG) указывает на острое течение коксиеллёза, нарастание титра АТ класса IgG (в сочетании или без IgM) свидетельствует о хроническом течении болезни или начале периода реконвалесценции коксиеллёза. Специфичность ПЦР крови, по нашим данным, составляет 95%, чувствительность 92%. ПЦР необходимо проводить в течение первых двух недель от начала болезни и до начала антибактериальной терапии, потому что она быстро становится отрицательной при появлении и нарастании титра специфических АТ [10]. Положительный результат ПЦР на наличие в крови ДНК возбудителя свидетельствует об острой стадии коксиеллёза [15].

Заключение. Результаты исследования позволяют считать, что наиболее информативными методами диагностики коксиеллёза у детей являются: в течение первых 7 дней от начала болезни ПЦР (специфичность – 95%, чувствительность – 92%), после 7 дня от начала болезни ИФА (специфичность – 91%, чувствительность – 94%).

Сероконверсия АТ к *S. burnetii* в парных сыворотках крови в 4 раза и более свидетельствует об остром коксиеллёзе, отсутствие сероконверсии является следовой реакцией ранее перенесенного заболевания.

Таблица 2

Диагностическая значимость методов лабораторной диагностики коксиеллёза у детей

Методы исследования	Количество больных	Специфичность метода, %	Чувствительность метода, %
РСК с АГ Бернета	30	87	70
Определение АТ в сыворотке крови методом ИФА	34	91	94
Определение ДНК коксиел Бернета методом ПЦР	35	95	92

Подтверждением диагноза острый коксиеллёз являются: наличие ДНК *C. burnetii* в крови и/или IgM, увеличение титра IgG в парных сыворотках крови.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 4, 5, 10, 15 см. REFERENCES)

1. Карпенко С.Ф., Галимзянов Х.М., Касимова Н.Б., Рубальский О.В., Красков А.В., Горева В.Н. Возрастные аспекты клинико-эпидемиологических проявлений коксиеллёза. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы.* 2012;6:16-9.
2. Яковлев Э.А., Борисевич С.В., Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В. Заболеваемость лихорадкой Ку в Российской Федерации и странах Европы: реалии и проблемы. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2015; 4: 49-54.
3. Учайкин В. Ф. Руководство по инфекционным болезням у детей. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2002.
6. Кимирилова О.Г., Красилова И.М., Дёмина О.А., Лендова Л.С., Хаймин Е.В. Клинико-эпидемиологические особенности лихорадки Ку у детей. *Детские инфекции. Материалы XVIII Конгресса детских инфекционистов России «Актуальные вопросы инфекционной патологии и вакцинопрофилактики».* М.; 2019;18:71-2.
7. Лобан К.М., Лобзин Ю.В., Лукин Е.П. Риккетсиозы человека. Руководство для врачей. СПб: ЭЛБИ-СП; 2002.
8. Инфекционные болезни: Национальное руководство. Ющук Н.Д., Венгеров Ю.Я., ред. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2019.
9. Панферова Ю.А., Фрейлихман О.А., Токаревич Н.К., Карпенко С.Ф., Галимзянов Х.М. Сравнение диагностической эффективности методов детекции *Coxiella burnetii* в крови больных лихорадкой Ку на основе амплификации фрагментов гена 16Sp РНК (стандартная ПЦР) и гена gro EL (ПЦР в режиме реального времени). *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2016; 3: 70-4.
11. Карпенко С.Ф., Галимзянов Х.М., Неталиева С.Ш., Горева О.Н. Особенности эпидемиологии и лабораторной диагностики коксиеллеза в Астраханской области. *Инфекция и иммунитет.* 2013; 3(2):136.
12. Фрейлихман О.А., Токаревич Н.К., Кондрасева В.Д. Лабораторные методы диагностики Ку лихорадки и генотипирование *Coxiella burnetii*. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение.* 2017; 2: 49-60.
13. Чекалова Т.А., Шныков С.Н., Неталиева С.Ш., Бабаева М.А. Диагностическая значимость определения спектра антител к *Coxiella burnetii* в I и II фазовых состояниях. *Эпидемиология и инфекционные болезни.* 2018; 23(4):165-7.
14. Карпенко С.Ф. Клинико-патогенетическое и прогностическое значение некоторых факторов резистентности у больных коксиеллезом. Дис... д-ра мед. наук. М.; 2017.

REFERENCES

1. Karpenko S.F., Galimzyanov H.M., Kasimova N.B., Rubalsky O.V., Kraskov A.V., Goreva V.N. Age-related aspects of clinical and epidemiological manifestations of coxiellosis. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktual'nye voprosy.* 2012;6:16-9.(in Russian)

2. Yakovlev E.A., Borisevich S.V., Popova A.U., Ezhlova E.B., Demina U.V. Incidence of Ku fever in the Russian Federation and European countries: realities and problems. *Problemy osobo opasnykh infektsiy.* 2015; 4: 49-54.(in Russian)
3. Uchaykin V.F. *Guide to infectious diseases in children [Rukovodstvo po infektsionnym boleznyam u detey].* Moscow: GEOTAR-Media; 2002.(in Russian)
4. Wielders C.C., Teunis P.F., Hermans M.H., Van der Hoek W., Schneeberger P.M. Kinetics of antibody response to *Coxiella burnetii* infection (Q fever): Estimation of the seroresponse onset from antibody levels. *Epidemics.* 2015; 13: 37-43.
5. Eldin S., Mélenotte S., Mediannikov O., Ghigo E., Million M., Edouard S. et. al. From Q Fever to *Coxiella burnetii* Infection: a Paradigm Change. *Clinical Microbiology Reviews.* 2017; 30(1): 115-90.
6. Kimirilova O.G., Krasilova I.M., Demina O.A., Lendova L.S., Haimin E.V. Clinical and epidemiological features of Cu fever in children. Children's infections. Materials of the XVIII Congress of children's infectious diseases of Russia "Current issues of infectious pathology and vaccination"[*Detskie infektsii. Materialy XVIII Kongressa detskikh infektsionistov Rossii «Aktual'nye voprosy infektsionnoj patologii i vaksino profilaktiki»*]. Moscow. 2019; 18:71-2.(in Russian)
7. Loban K.M., Lobzin U.V., Lukin E.P. Human Rickettsioses [Rickettsiozy cheloveka]. A guide for physicians. St.Petersburg: ALBI-SP; 2002.(in Russian)
8. Infectious diseases: National leadership [Infektsionnye bolezni: Natsional'noe rukovodstvo]. Yushchuk N.D., Vengerov Yu.A., eds. Moscow: GEOTAR-Media; 2019.(in Russian)
9. Panferova U.A., Freilikhman O.A., Tokarevich N.K., Karpenko S.F., Galimzyanov H. M. Comparison of diagnostic effectiveness of methods for detecting *Coxiella burnetii* in the blood of patients with Ku fever based on the amplification of fragments of the 16Sp RNA gene (standard PCR) and the gro EL gene (real-time PCR). *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2016;3:70-4.(in Russian)
10. Schneeberger P.M., Hermans M.H., van Hannen E.J., Schellekens J.J., Leenders A.C., Wever P.C. Real-time PCR with serum samples is indispensable for early diagnosis of acute Q fever. *Clinical and vaccine Immunology.* 2010;17(2): 286-90.
11. Karpenko S.F., Galimzyanov H. M., Netalieva S.S., Goreva O.N. Features of epidemiology and laboratory diagnostics of coxyellosis in the Astrakhan region. *Infektsiya i immunitet.* 2013; 3(2):136.(in Russian)
12. Freidlikhman O.A., Tokarevich N.K., Kondrasheva V.D. Laboratory methods for diagnosing Cu fever and genotyping *Coxiella burnetii*. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie.* 2017; 2: 49-60.(in Russian)
13. Chekalova T.A., Shnykov S.N., Netalieva S.S., Babayeva M.A. Diagnostic significance of determining the spectrum of antibodies to *Coxiella burnetii* in phase I and II States. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni.* 2018;23(4): 165-7.(in Russian)
14. Karpenko S.F. Clinical-pathogenetic and prognostic value of some resistance factors in patients with coxyellosis. Diss. Moscow; 2017. (in Russian)
15. Jager M.M., Weers-Pothoff G., Hermans M.A., Meekelenkamp J.E., Schellekens J.A., Renders N.M. et. al. Evaluation of a diagnostic algorithm for acute Q fever in an outbreak setting. *Clinical and vaccine Immunology.* 2011; (18): 963-8.

Поступила 03.06.20

Принята к печати 16.06.20

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Боронина Л.Г.^{1,2}, Саматова Е.В.², Кукушкина М.П.², Блинова С.М.¹, Панова С.А.², Устюгова С.С.²

ПОИСК ОПТИМАЛЬНОГО АЛГОРИТМА ТЕСТИРОВАНИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА КАРБАПЕНЕМАЗ У НОЗОКОМИАЛЬНЫХ ШТАММОВ

¹ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 620028, Екатеринбург, Россия;

²ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница», 620149, Екатеринбург, Россия

Устойчивость представителей порядка Enterobacterales к эртапенему – 12,1%. Наиболее высокая частота нечувствительности к данному антимикробному препарату отмечена среди изолятов K. pneumoniae 29,4%. Среди всех изолятов энтробактерий устойчивость к имипенему и меропенему проявляли – 17,2% и 20%. Доля штаммов P. aeruginosa устойчивых к меропенему и имипенему по 50,9% соответственно, к дорипенему – 45%. A. baumannii, устойчивых к меропенему – 66,6%, имипенему – 63,6%, дорипенему – 83,3%. У K. pneumoniae обнаружены гены резистентности: NDM (n=2), KPC (n=10), OXA (n=1); у P. aeruginosa: VIM (n=8), NDM (n=1), OXA (n=1); A. baumannii OXA (n=1). Оптимально использование молекулярных методов, в частности ПЦР-РВ, для осуществления эффективного надзора за распространением продуцентов карбапенемаз, имеющими тенденцию к широкому распространению в условиях стационара. Молекулярные методы позволяют быстро получить результат (в течение рабочего дня) и принять адекватное решение о проведении антибиотикотерапии.

Ключевые слова: Enterobacterales; неферментирующие грамотрицательные бактерии; карбапенемазы; инфекция.

Для цитирования: Боронина Л.Г., Саматова Е.В., Кукушкина М.П., Блинова С.М., Панова С.А., Устюгова С.С. Поиск оптимального алгоритма тестирования и характеристика карбапенемаз у нозокомиальных штаммов. *Клиническая лабораторная диагностика*, 2020; 65(12): 771-777. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-12-771-777>

Boronina L.G.^{1,2}, Samatova E.V.², Kukushkina M.P.², Blinova S.M.¹, Panova S.A.², Ustyugova S.S.²

SEARCH FOR AN OPTIMAL TEST ALGORITHM AND CHARACTERISTIC OF CARBAPENEMASES IN NOSOCOMIAL STRAINS

¹Urals State Medical University, chair of clinical laboratory diagnostics and bacteriology, 620028, Ekaterinburg, Russia;

²Regional Children's Clinical Hospital, clinical microbiology laboratory, 620149, Ekaterinburg, Russia

Resistance of representatives of the order Enterobacterales to ertapenem 12.1%. The highest frequency of insensitivity to this antimicrobial drug was noted among isolates of K. pneumoniae 29.4%. Among all enterobacterial isolates, resistance to imipenem and meropenem was 17.2% and 20%. The proportion of P. aeruginosa strains is 50.9% resistant to meropenem and imipenem, respectively, and 45% to doripenem. In turn, A. baumannii is resistant to meropenem – 66.6%, imipenem – 63.6%, doripenem – 83.3%. The following resistance genes were found in K. pneumoniae: NDM (n=2), KPC (n=10), OXA (n=1); in P. aeruginosa: VIM (n=8), NDM (n=1), OXA (n=1); A. baumannii OXA (n=1). At present, it is optimal to use molecular methods, in particular real-time PCR, to effectively monitor the distribution of carbapenemase producers, which tend to be widely distributed in a hospital setting. Molecular methods allow you to quickly get the result (during the working day) and give an adequate decision on antibiotic therapy.

Key words: Enterobacterales; non-fermenting gram-negative bacteria; carbapenemases; infection.

For citation: Boronina L.G., Samatova E.V., Kukushkina M.P., Blinova S.M., Panova S.A., Ustyugova S.S. Search for an optimal test algorithm and characteristic of carbapenemases in nosocomial strains. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65(12): 771-777 (in Russ.) DOI:<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-12-771-777>

For correspondence: Boronina Lyubov Grigorievna, Doctor of Medical Sciences, Professor of chair of clinical laboratory diagnostics and bacteriology; e-mail: boroninalg@mail.ru

Information about authors:

Boronina L.G., <http://orcid.org/0000-0003-0152-962X>;
Samatova E.V., <http://orcid.org/0000-0003-3154-6201>;
Kukushkina M.P. <https://orcid.org/0000-0003-1980-9099>;
Blinova S.M., <http://orcid.org/0000-0003-4783-825X>;
Panova S.A., <https://orcid.org/0000-0003-4347-0929>;
Ustyugova S.S., <https://orcid.org/0000-0002-0053-4884>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 04.06.2020
Accepted 15.06.2020

Введение. Распространение устойчивости бактерий к карбапенемам, которые ранее считались одними из надёжных антимикробных препаратов (АМП) ведёт к

большим трудностям при лечении тяжёлых ИСМП [1, 2]. Грамотрицательные бактерии являются наиболее частыми возбудителями, ИСМП, в том числе сепсиса,

Для корреспонденции: Боронина Любовь Григорьевна, д-р мед. наук, проф. каф. клин. лаб. диагностики и бактериологии; e-mail: boroninalg@mail.ru

пневмонии, инфекций мочевыводящих путей, среди них выделяют представителей порядка *Enterobacterales*, среди которых чаще всего встречается *Klebsiella pneumoniae*, неферментирующие грамотрицательные бактерии (НГОб) – *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii* [1, 3 – 5].

Согласно молекулярной классификации Ambler, выделяют четыре класса β -лактамаз. Сериновые β -лактамазы включают класс А (KPC, GES, TEM, SHV, STX-M, SME, IMI, NMC-A), класс С (Amp C: FOX, CMY, DNA, ACT, ACC), класс D (OXA). Класс В включает металло-бета-лактамазы (МБЛ): В, MBLs: IMP, VIM, NDM, GIM, SPM, SIM [1, 5]. Резистентность грамотрицательных бактерий порядка *Enterobacterales* к карбапенемам может быть связана с: 1) гиперпродукцией хромосомных β -лактамаз Amp C, 2) β -лактамазами расширенного спектра (БЛРС) в сочетании с нарушением проницаемости клеточной стенки, потерей пориновых каналов, 3) ферментативной инактивацией АМП за счёт продукции карбапенемаз. У *P. aeruginosa* устойчивость к карбапенемам может быть связана с нарушением транспорта АМП внутрь клетки в результате мутаций, ведущих к потере импием-специфического мембранного порина OprD, и гиперэкспрессией механизмов активного выведения – эффлюксных помп [1–5]. Наиболее часто резистентность к карбапенемам, обусловлена продукцией карбапенемаз. Причины нечувствительности у *A. baumannii* к данной группе АМП разнообразны: изменение проницаемости наружной мембраны клеточной стенки, эффлюкс, продукция приобретённых карбапенемаз (МБЛ и OXA-карбапенемаз), гиперпродукция видоспецифических β -лактамаз (OXA-51 и родственных ферментов) [4].

В феврале 2017 г. эксперты ВОЗ впервые представили перечень резистентных микроорганизмов, представляющих наибольшую опасность для общественного здоровья, где среди грамотрицательных бактерий лидируют карбапенеморезистентные штаммы *A. baumannii* и *P. aeruginosa*, представители порядка *Enterobacterales*, продуцирующие БЛРС и карбапенемазы [5]. Обмен мобильными генетическими элементами, такими как интегроны, легко встраивающиеся в плазмиды, и транспозоны, внутри популяции, ведёт к быстрому распространению устойчивых штаммов [2, 3].

Для повышения качества оказания медицинской помощи и предотвращения возникновения и распространения инфекционных заболеваний, в частности ИСМП необходимо обеспечить раннее выявление грамотрицательных бактерий, продуцирующих карбапенемазы путём постоянного мониторинга антибиотикорезистентности возбудителей и определения механизмов резистентности.

Цель – определение последовательности тестирования штаммов грамотрицательных бактерий к карбапенемам, механизмов резистентности и частоты распространения карбапенемаз.

Материал и методы. С января по декабрь 2019 г. исследовано 6100 проб различного клинического материала (кроме фекалий) от 2483 пациентов ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница», госпитализированных в отделение анестезиологии и реанимации (ОРИТ), ОРИТ новорожденных и недоношенных детей № 2, онкогематологический центр, отделение патологии и недоношенных, отделения торакальной хирургии и хирургическое отделение для новорожденных больных, нефрологическое и неврологическое отделение. Исследованы кровь, спинномозговая жидкость, содержимое

трахеи, моча, отделяемое ран и конъюнктивы, мокрота, выпот из плевральной полости, материал из ротоглотки, аутопсийный материал – ткань лёгких.

Взятие клинического материала на бактериологическое исследование производили согласно общепринятым методам [6].

Для посева крови забранной из интактной вены и/или катетера использованы системы для гемокультур «Signal» («Oxoid», Великобритания), флаконы для автоматического анализатора гемокультур «ВАСТЕС™ FX» («Becton Dickinson», США), бульон с сердечно-мозговым экстрактом с 0,025% SPS, CO₂ и вакуумом («Conda», Испания). При культуральном исследовании спинномозговой жидкости использован модифицированный посев, согласно нормативной документации [7]: чашки с шоколадным и кровяно-сывороточным агарами (оригинальные рецепты) [8, 9] инкубировали при +35°С в атмосфере с 5% CO₂ в течение 48 ч, 0,1% полужидкий сывороточный агар при +37°С в течение 5 сут с ежедневным просмотром. Посев катетеров осуществлялся полуквантитативным методом по D. Makі на кровяно-сывороточный агар (инкубация при +37°С в атмосфере с 5% CO₂ в течение 72 ч) и погружением катетера в сахарный бульон для изучения его внутреннего канала, инкубация при +37°С в течение трёх суток с ежедневным просмотром. Пунктаты, экссудаты засеивали на кровяно-сывороточный агар (инкубация при +37°С в аэробной атмосфере в течение 48 ч), свежеприготовленный кровяно-сывороточный агар (инкубация при +37°С в анаэробных условиях в течение 7 сут), прорегенерированную тиогликолевую среду и двухфазную среду, включающую плотный питательный агар и бульон (инкубация при +37°С в аэробной атмосфере в течение 5 сут) с ежедневным просмотром. На питательные среды Эндо, желточно-солевой, кровяно-сывороточный, шоколадный агар (инкубация в атмосфере с 5% CO₂) и агар Сабуро осуществлялся посев мокроты, бронхоальвеолярного лаважа, содержимого трахеи [10]. Пробы с отделяемым ран, конъюнктивы дополнительно засеивали на прорегенерированную тиогликолевую среду. Посев мочи осуществлялся по методу Айзенберга на 5% кровяной агар [11]. Идентификацию выделенных микроорганизмов проводили бактериологическим методом, на полуавтоматическом АТВ Expression (bioMérieux, Франция) и автоматическом Phoenix M50 (Becton Dickinson, США) анализаторах. Определение антибиотикочувствительности проводили диско-диффузионным методом, на полуавтоматическом SENSITITRE (TREC Diagnostic Systems, США/Великобритания) и автоматическом Phoenix M50 (Becton Dickinson, США) анализаторах. Постановка и оценка антибиотикочувствительности диско-диффузионным методом проводилось в соответствии с действующей нормативной документацией [12]. Для выявления продукции карбапенемаз без их дифференциации у *P. aeruginosa* и представителей порядка *Enterobacterales* применялся фенотипический метод – метод инактивации карбапенемов (Carbapenem Inactivation Method, CIM) [13].

Для обнаружения грамотрицательных бактерий, резистентных к карбапенемам не зависимо от механизма резистентности, при первичном посеве клинического материала от онкологических больных использована среда «CHROMagar™ KPC» (DRG, Франция).

Молекулярно-биологическая детекция генов, кодирующих карбапенемазы у выделенных штаммов, осуществлялась методом мультиплексной полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной

детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени с использованием наборов реагентов «АмплиСенс® MDR MBL-FL» и «АмплиСенс® MDR KPC/OXA-48-FL» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Выявлялись гены, кодирующие приобретённые сериновые карбапенемазы групп KPC и OXA-48-подобных (OXA-48, OXA-162) и МБЛ с карбапенемазной активностью групп VIM, IMP, NDM.

Результаты и обсуждение. В исследовании представлены результаты тестирования *A. baumannii* и *P. aeruginosa*, представителей порядка *Enterobacterales*, в связи с тем, что согласно информации ВОЗ, именно эти виды среди резистентных грамотрицательных бактерий, наиболее часто вызывают тяжёлые инвазивные инфекции и требуют постоянного контроля резистентности.

С января по декабрь 2019 г. из клинического материала 900 пациентов выделено 940 штаммов грамотрицательных бактерий: *Pseudomonas aeruginosa* ($n=202$), *Acinetobacter baumannii* ($n=62$), *Escherichia coli* ($n=236$), *Klebsiella pneumoniae* ($n=223$), *Klebsiella oxytoca* ($n=41$), *Enterobacter cloacae* ($n=69$), *Enterobacter aerogenes* ($n=5$), *Serratia marcescens* ($n=55$), *Proteus mirabilis* ($n=23$), *Proteus vulgaris* ($n=4$), *Morganella morganii* ($n=5$), *Citrobacter freundii* ($n=5$), *Citrobacter koseri* (*diversus*) ($n=5$), *Citrobacter amalonaticus* ($n=1$), *Pseudomonas putida* ($n=2$).

Небольшое количество протестированных к дорипенему изолятов обусловлено тем, что этот АМП входит не во все коммерческие панели для определения резистентности. Суммарная доля карбапенемнечувствительных штаммов грамотрицательных бактерий (резистентные и умеренно-резистентные к меропенему и/или имипенему у *P. aeruginosa*, *A. baumannii* или эртапенему у энтеробактерий) среди всех штаммов, составила 14% ($n=132$).

Устойчивость представителей порядка *Enterobacterales* к эртапенему – 12,1%, что ниже, чем в целом по РФ – 23,6%, соответственно [14, 15]. Наиболее высокая частота нечувствительности к эртапенему отмечена среди изолятов *K. pneumoniae* – 29,4% соответственно, что ниже, чем показатели в целом по РФ – 41,6% соответственно [15]. Среди изолятов энтеробактерий устойчивость к имипенему и меропенему проявляли 17,2% и 20% соответственно. Среди изолятов *K. pneumoniae* устойчивы к имипенему – 35,5%, к меропенему – 44,7%. Согласно исследованию МАРАФОН в 2015-2016 гг., среди всех энтеробактерий резистентность к имипенему – 6,9%, к меропенему – 6,5% штаммов, изолятов *K. pneumoniae* – 11,9 и 12,2%, соответственно [15]. При выявлении умеренной резистентности или резистентности к эртапенему у энтеробактерий определялась чувствительность к меропенему и имипенему и проводился СИМ-тест.

Штаммы *P. aeruginosa* устойчивы к меропенему и имипенему в 50,9%, к дорипенему – 45%, что ниже данных общероссийских исследований: резистентных изолятов к имипенему – 67,5% и меропенему – 55,5%, согласно данным исследования «МАРАФОН» 2015-2016 гг. [16].

Штаммы *A. baumannii* устойчивы к меропенему – 66,6%, имипенему – 63,6%, дорипенему – 83,3%, что в целом ниже опубликованных данных по России: резистентных изолятов к имипенему – 77,5%, меропенему – 77,2%, согласно данным исследования «МАРАФОН» 2015-2016 гг. [17], но выше данных отдельных городов, так в многопрофильных стационарах Санкт-Петербурга, доля меропенемустойчивых штаммов *A. baumannii* составила 41,4%, имипенемустойчивых приблизилась к 50% исследованных штаммов [18].

Устойчивые к карбапенемам изоляты выделялись от пациентов, длительно находящихся на стационарном лечении в онкогематологии, реанимационных отделениях перинатального центра, после оперированных врождённых пороков сердца, врождённых пороков развития, бронхо-лёгочной дисплазии, пневмонии, хронического обструктивного бронхита, хронической почечной недостаточности, инфекции мочевыводящих путей. Карбапенеморезистентные штаммы часто обнаружены у пациентов длительно и неоднократно лечившихся в нескольких стационарах, подвергавшихся полостным операциям, получающих массивную терапию АМП, пациентов на паллиативном наблюдении.

Источниками выделения этих штаммов являлись кровь ($n=8$), спинномозговая жидкость ($n=2$), содержимое трахеи ($n=67$), моча ($n=36$), отделяемое ран ($n=10$) и конъюнктивы ($n=2$), мокрота ($n=4$), выпот из плевральной полости ($n=1$), ротоглотка ($n=1$), аутопсийный материал – ткань лёгких ($n=1$). Выделены штаммы, устойчивые к карбапенемам: *P. aeruginosa* ($n=55$), *A. baumannii* ($n=22$), *Escherichia coli* ($n=2$), *Klebsiella pneumoniae* ($n=40$), *Klebsiella oxytoca* ($n=1$), *Enterobacter cloacae* ($n=7$), *Serratia marcescens* ($n=2$), *Proteus mirabilis* ($n=2$), *Pseudomonas putida* ($n=1$).

Штаммы *P. aeruginosa*, устойчивые к карбапенемам, резистентны или умеренно-резистентны к меропенему и имипенему. Один изолят *A. baumannii* умеренно-резистентный к меропенему, но чувствительный к имипенему. 67,5% штаммов *K. pneumoniae* одновременно устойчивы ко всем карбапенемам: эртапенему, меропенему, имипенему.

У пяти пациентов одновременно обнаружены несколько видов грамотрицательных бактерий, устойчивых к карбапенемам: *P. aeruginosa* и *A. baumannii* ($n=2$), *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* ($n=3$). Все случаи наблюдались у пациентов ОРИТ с диагнозами: хронический обструктивный бронхит, бронхолёгочная дисплазия, острое поражение ЦНС, острая гнойно-деструктивная пневмония.

Часто карбапенемазопродуцирующие штаммы грамотрицательных бактерий имеют фенотип множественной резистентности к АМП (MDR, multiple drug resistance) – нечувствительны как минимум к трём АМП различных классов [3]. Такие штаммы были среди *P. aeruginosa* ($n=32$), *A. baumannii* ($n=15$), *K. pneumoniae* ($n=29$). Такие изоляты обнаружены у детей из ОРИТ, онкогематологических больных, пациентов, находящихся на гемодиализе при хронической почечной недостаточности. Для определения экстремальной лекарственной резистентности (XDR, extensively drug resistance) или панрезистентности (PDR, pandrug resistance), согласно экспертной группе Европейского общества по клинической микробиологии и инфекционным заболеваниям (ESCMID), у бактерий порядка *Enterobacterales* предложено использовать 17 категорий АМП (содержащих 28 АМП), у *P. aeruginosa* – 8 категорий (17 АМП), у *A. baumannii* – 9 категорий (22 АМП) [3]. В лабораторной клинической микробиологии такое количество АМП не тестируется, поэтому достоверно выявить количество штаммов с XDR и PDR-фенотипом резистентности в нашем исследовании не удалось.

Наиболее распространённым механизмом устойчивости грамотрицательных бактерий к карбапенемам является продукция карбапенемаз, спектр которых достаточно широк. Для выявления карбапенемаз используются несколько методов определения их продукции,

как фенотипические, так и молекулярно-генетические. С 2017 г. в практику внедрён метод инактивации карбапенемов (СИМ) [1, 13]. Молекулярно-биологическая детекция генов, кодирующих карбапенемазы, у грамотрицательных бактерий осуществлялась методом мультиплексной ПЦР-РВ с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации, выявлялись гены, кодирующие приобретённые сериновые карбапенемазы групп КРС, ОХА-48-подобных (ОХА-48, ОХА-162), МБЛ с карбапенемазной активностью групп VIM, IMP, NDM. Для определения антибиотикочувствительности на автоматическом анализаторе Phoenix M50 использованы три вида панелей. Один вид панелей позволяет определить факт наличия карбапенемаз, второй – обеспечивает дифференцировку класса карбапенемаз, третий – не предназначен для выявления карбапенемаз. Для

определения колонизации слизистой оболочки прямой кишки грамотрицательными бактериями, резистентных к карбапенемам, не зависимо от механизма, у онкогематологических больных приобретена хромогенная среда CHROMagar KPC (DRG, Франция).

MDR штаммы, независимо от результатов детектирования СИМ-теста для энтеробактерий и *P. aeruginosa*, сохранялись с целью определения генов резистентности. В тестирование не включены изоляты одного и того же вида микроорганизмов при повторном выделении одного больного из того же материала или из разных локусов, но с одним и тем же результатом антибиотикочувствительности. Карбапенемазы у исследованных грамотрицательных бактерий и их генотипы резистентности в сравнении с фенотипическими методами представлены в таблице.

Резистентность к карбапенемам фенотипическим и молекулярно-генетическим методом

Микроорганизмы	Биоматериал, n-количество штаммов	№ штамма	СИМ	Гены резистентности, ПЦР-РВ					
				VIM	IMP	NDM	КРС	ОХА-48, 162	
				Класс В		А	Д		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	кровь, n=3	1-2	+	-	-	-	+	-	
		3	-	-	-	+	-	-	
		4-5	+	-	-	-	+	-	
	содержимое трахеи, n=5	6	+	-	-	-	+	-	
		7	+	-	-	-	-	-	
		8	-	-	-	-	-	-	
		9-11	+	-	-	-	+	-	
		12	+	-	-	-	+	+	
	моча, n=6	13	+	-	-	+	-	-	
		14	-	-	-	-	-	-	
		15	+	-	-	-	+	-	
	Всего	отделяемое конъюнктивы, n=1 n=15			0	0	2	10	1
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	кровь, n=1	16	-	-	-	-	-	-
			17-20	+	+	-	-	-	-
		содержимое трахеи, n=14	21	+	-	-	-	-	+
22			+	-	-	-	-	-	
23-28			-	-	-	-	-	-	
29			-	-	-	+	-	-	
30			-	-	-	-	-	-	
31			-	-	-	-	-	-	
мокрота, n=1		32	-	-	-	-	-	-	
		33-34	+	+	-	-	-	-	
выпот в плевральную полость, n=1 раневое отделяемое, n=3		35	-	-	-	-	-	-	
		36	-	-	-	-	-	-	
моча, n=2		37	+	+	-	-	-	-	
		38	+	+	-	-	-	-	
отделяемое конъюнктивы, n=1 ротолотка, n=1	39	+	+	-	-	-	-		
	40	+	+	-	-	-	-		
Всего	n=24			8	0	1	0	1	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	кровь, n=1	41	.	-	-	-	-	-	
		42	.	-	-	-	-	-	
	ликвор, n=1	43	.	-	-	-	-	-	
		44	.	-	-	-	-	+	
	аутопсийный материал (лёгкое), n=1	44	.	-	-	-	-	+	
Всего	n=5			0	0	0	0	1	
<i>Pseudomonas putida</i>	кровь, n=1	45	+	-	-	-	-	-	
		46	+	-	-	-	-	-	
Всего	n=2			0	0	0	0	0	

Примечание. СИМ - метод инактивации карбапенемов (Carbapenem Inactivation Method).

При определении продукции карбапенемаз, наиболее распространённым из фенотипических методов, имеются ограничения, так СИМ рассчитан для определения карбапенемаз у представителей порядка *Enterobacterales* и *P. aeruginosa* [1].

В 84,7% случаев наблюдается корреляция между методами определения карбапенемаз, приведенными в таблице. У *K. pneumoniae* методом ПЦР обнаружены гены резистентности: *NDM* ($n=2$), *KPC* ($n=10$), *OXA* ($n=1$); у *P. aeruginosa*: *VIM* ($n=8$), *NDM* ($n=1$), *OXA* ($n=1$); *A. baumannii* *OXA* ($n=1$). Такое распределение генов в отношении *P. aeruginosa* и *A. baumannii* не противоречит данным по России [2-4, 16, 17]. Относительно *K. pneumoniae* в больнице лидируют *KPC*, в целом по России среди бактерий порядка *Enterobacterales*, согласно данным исследований «МАРАФОН» в 2013-2014 гг. и 2015-2016 гг., преобладает группа *OXA-48* [15].

У *K. pneumoniae* штамм № 7, *P. aeruginosa* № 22 при положительном тесте СИМ гены резистентности не выявлены. Мы можем использовать только наборы, обладающие регистрационным удостоверением на медицинское изделие и паспортом качества. Имеющиеся ПЦР-наборы на рынке, которые соответствуют требованиям, не включают весь известный спектр генов.

У *K. pneumoniae* штамм № 8, 14, *P. aeruginosa* № 35, где СИМ-тест отрицателен и *A. baumannii* № 42, – другим фенотипическим методом (анализатором Phoenix M50) выявлен факт наличия или конкретный класс карбапенемаз, но гены резистентности использованными ПЦР-наборами не определены. Ни один фенотипический метод не обладает 100% чувствительностью. По данным литературы, чувствительность СИМ-теста 82%, при определении чувствительности на анализаторе, в том числе Phoenix M50, 95-97% [2, 19]. Существует метод, где при приготовлении суспензии тестируемого изолята стерильную дистиллированную воду или 0,9% физиологический раствор заменяют на триптиказо-соевый бульон, что повышает чувствительность до 93%, но в рутинной практике не используется из-за дороговизны [2]. Наличие умеренно активных ферментов (карбапенемаз), в частности, типа *OXA-48*, снижает чувствительность их определения [2]. Разрешённые к применению в РФ ПЦР-наборы не включают весь спектр генов, ответственных за выработку карбапенемаз различных классов, можно предположить, в данных случаях имеет место продукция карбапенемаз, что требует дальнейшего изучения.

У *K. pneumoniae* штамм № 3 СИМ-тест отрицателен, другим фенотипическим методом (анализатором Phoenix M50) выявлена продукция карбапенемазы класса D, но при этом обнаружен ген резистентности класса B – *NDM*. Ингибитор, используемый для выявления карбапенемаз в анализаторе Phoenix M50, является коммерческой тайной. У нас пока недостаточно накопленных данных для однозначных заключений, что требует дальнейшего изучения, в доступной литературе информации о специфичности применённых методов не обнаружено. Так как мировыми исследователями «золотым стандартом» обнаружения продуцентов карбапенемаз признан молекулярный метод, скорее всего здесь продуцируются карбапенемазы класса B.

У *P. aeruginosa* штамма № 29 СИМ-тест отрицателен и другим фенотипическим методом (анализатор Phoenix M50) не выявлен факт наличия карбапенемаз, при этом обнаружен ген класса B – *NDM*, что подчеркивает, что

ПЦР-РВ вне конкуренции при определении наиболее часто встречающихся классов карбапенемаз.

У *P. aeruginosa* штамма № 39 СИМ-тест положительный, другим фенотипическим методом (анализатором Phoenix M50) не выявлен факт наличия карбапенемаз, гены резистентности использованными ПЦР-наборами не выявлены. При выделении данного штамма в лаборатории имелась хромогенная среда CHROMagar KPC, при посеве на неё культура *P. aeruginosa* дала рост, что свидетельствует в пользу продукции карбапенемазы у данного штамма.

Методика СИМ-теста предполагает его использование только у энтеробактерий и *P. aeruginosa*, в качестве эксперимента он поставлен на культуре *Pseudomonas putida*, выделенной от пациента с онкогематологическим заболеванием. В результате СИМ-тест положительный, гены резистентности методом ПЦР не выявлены. 100% уверенности, что продукция карбапенемазы имеет место, нет.

Скринингом выявления карбапенемрезистентных штаммов грамотрицательных бактерий является использование хромогенных сред. Чувствительность CHROMagar KPC варьирует в пределах от 43% до 100%. Чувствительность CHROMagar KPC для детекции карбапенемаз класса D (*OXA-48*) – 87.7% [19, 20]. Бесспорным преимуществом является то, что результат можно получить уже на следующий день с момента посева клинического материала.

У 30,4% протестированных штаммов: *P. aeruginosa* ($n=11$) и *A. baumannii* ($n=3$), продукция карбапенемазы не выявлена, что свидетельствует о других механизмах резистентности к карбапенемам.

Исходя из возможностей оснащения лаборатории, приобретения коммерческих диагностических средств для детекции карбапенемаз, зарегистрированных в РФ, оптимальным предлагается алгоритм, представленный на рисунке.

Если пациент находится в тяжёлом или неотложном состоянии, возможно определение генов, кодирующих карбапенемазы, непосредственно в нативном материале предполагаемого очага инфекции.

В нашей больнице организован центр инфекционного контроля, включающий совместную работу врача-бактериолога, врача-эпидемиолога, клинического фармаколога. В его работу входит микробиологический мониторинг и оперативное информирование, в том числе клиницистов, о выделении MDR штаммов, проведение эффективных изоляционно-ограничительных мероприятий, поддержание оптимальной степени микробиологического контроля больничной среды, внедрения современных технологий уборки помещений и обеззараживания медицинских отходов, защиту пациента от вторичного эндогенного инфицирования. Согласно внутрибольничным приказам регламентировано разделение потоков пациентов с разной степенью эпидемической опасности на всех этапах лечебно-диагностического процесса, закреплён принцип рационального использования АМП, в том числе с учётом результатов микробиологического исследования, направленных на ограничение селекции антибиотикоустойчивых штаммов микроорганизмов.

Заключение. Устойчивость представителей порядка *Enterobacterales* к эртапенему – 12,1%. Наиболее высокая частота нечувствительности к данному АМП отмечена среди изолятов *K. pneumoniae* – 29,4%. Среди



Детекция карбапенемаз в лаборатории клинической микробиологии в течение рабочего дня.

изолятов энтеробактерий устойчивость к имипенему и меропенему проявляли 17,2% и 20%. Доля штаммов *P. aeruginosa*, устойчивых к меропенему и имипенему по 50,9% соответственно, к дорипенему – 45%. *A. baumannii* устойчивых к меропенему – 66,6%, имипенему – 63,6%, дорипенему – 83,3%. У *K. pneumoniae* обнаружены гены резистентности: *NDM* ($n=2$), *KPC* ($n=10$), *OXA* ($n=1$); у *P. aeruginosa*: *VIM* ($n=8$), *NDM* ($n=1$), *OXA* ($n=1$); у *A. baumannii* *OXA* ($n=1$). Оптимальным является использование молекулярных методов, в частности ПЦР-РВ, для осуществления эффективного надзора за распространением продуцентов карбапенемаз, имеющих тенденцию к широкому распространению в условиях стационара. Молекулярные методы позволяют получить результат в течение рабочего дня и принять адекватное решение о проведении антибиотикотерапии.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 11, 13 см. REFERENCES)

1. Савинова Т.А., Лазарева А.В., Шамина О.В., Крыжановская О.А., Чеботарь И.В., Маянский Н.А. Генотипы и носительство металло-бета-лактамаз среди карбапенеморезистентных *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных у детей г. Москвы. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2018; 20(4):370-4.
2. Попов Д.А. Сравнительная характеристика современных методов определения продукции карбапенемаз. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2019; 21(2):125-33.
3. Полищук А.Г., Якубович Е.И., Полухина О.В., Осовских В.В., Евтушенко В.И. Карбапенемазопродуцирующие грамотрицательные бактерии в специализированном стационаре ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий» Санкт-Петербурга». *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2017; 19(3):235-42.
4. Хрульнова С.А., Коробова А.Г., Федорова А.В., Фролова И.Н., Савочкина Ю.А., Клясова Г.А. Детекция генов, приобретенных карбапенемаз у изолятов *Acinetobacter baumannii*, выделенных из гемокультуры больных опухолями системы крови. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2019; 21(1):56-60.
5. Козлов Р.С., Стецок О.У., Андреева И.В. Цефтазидим-авибактам: новые «правила игры» против полирезистентных грамотрицательных бактерий. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2018; 20(1):24-34.
6. Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории. Методические указания 4.2.2039-05. М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России; 2005.
7. Лабораторная диагностика менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов. Методические указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2017.
8. Боронина Л.Г. Питательная среда для выявления *H. influenzae* и способ ее получения. Патент РФ № 2006136958/13; 2009.
9. Боронина Л.Г., Саматова Е.В. Питательная среда для выделения, культивирования и определения гемолитических свойств бактерий из клинического материала. Патент РФ № 2011128466/10; 2013.
10. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клиничко-диагностических лабораториях ЛПУ. Приказ МЗ СССР № 535 от 22.04.85. М.; 1985.
12. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии. Клинические рекомендации. Версия-2018-03. М.: Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии; 2018.
14. Шайдуллина Э.Р., Эйдельштейн М.В., Склеенова Е.Ю., Сухорукова М.В., Козлов Р.С. Антибиотикорезистентность нозокомальных карбапенемазопродуцирующих штаммов *Enterobacteriales* в России: результаты эпидемиологического исследования 2014-2016 гг. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2018; 20(4):362-9.
15. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Иванчик Н.В., Склеенова Е.Ю., Шайдуллина Э.Р., Азизов И.С. и др. Антибиоти-

- корезистентность нозокомиальных штаммов *Enterobacterales* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН 2015-2016». *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2019; 21(2):147-59.
16. Эйдельштейн М.В., Шек Е.А., Сухорукова М.В., Скленова Е.Ю., Иванчик Н.В., Шайдуллина Э.Р. и др. Антибиотикорезистентность, продукция карбапенемаз и генотипы нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН 2015-2016». *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2019; 21(2):160-70.
17. Шек Е.А., Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Скленова Е.Ю., Иванчик Н.В., Шайдуллина Э.Р. и др. Антибиотикорезистентность, продукция карбапенемаз и генотипы нозокомиальных штаммов *Acinetobacter* spp. в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН 2015-2016». *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2019; 21(2):171-80.
18. Светличная Ю.С. Распространение карбапенемустойчивых штаммов *A. baumannii* в многопрофильных стационарах Санкт-Петербурга. *Медицинский альманах*. 2015; (5):102-5.
19. Гаязова Д. Выявление микроорганизмов, продуцирующих карбапенемазы. Режим доступа. URL: <https://fedlab.ru/upload/medialibrary/000/prezentatsii-/prezentatsii-samara/%D0%93%D0%B0%D1%8F%D0%B7%D0%BE%D0%B2%D0%B0.pdf>. (дата обращения: 21.02.2020).
20. Кречикова О.И. Фенотипические методы выявления механизмов резистентности. Возможности использования CHROMAgar в клинической практике. НИИ антимикробной химиотерапии. Улан-Удэ. 2 сентября. Режим доступа. – URL: <https://chromagar.ru/wp-content/uploads/Fenotip-metody-ESBL-KPC-Hromagary-Ulan-Ude-02-sent-2016.pdf>. (дата обращения: 21.02.2020).
- gigieny i epidemiologii Rospotrebnadzora; 2017. (in Russian)
8. Boronina L.G. Culture medium for the detection of *H. influenzae* and method for its preparation. Patent RF № 2006136958/13; 2009. (in Russian)
9. Boronina L.G., Samatova E.V. Nutrient medium for isolation, cultivation and determination of hemolytic properties of bacteria from clinical material. Patent RF №2011128466/10; 2013. (in Russian)
10. On the unification of microbiological (bacteriological) research methods used in clinical diagnostic laboratories of hospitals. Order of the Ministry of Health of the USSR No. 535 of 04.22.85. [Ob unifikatsii mikrobiologicheskikh (bakteriologicheskikh) metodov issledovaniya, primenyaemykh v kliniko-diagnosticheskikh laboratoriyakh LPU. Prikaz MZ SSSR № 535 ot 22.04.85]. Moscow; 1985. (in Russian)
11. Essential procedures for clinical microbiology. Isenberg H.D., ed. Washington, D.C.: ASPRESS; 1998.
12. Determination of the sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs. Interregional Association of Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. Clinical recommendations. Version 2018-03. [Opredelenie chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antibakterial'nym preparatam. Mezhtseional'naya assotsiatsiya po klinicheskoy mikrobiologii i antimikrobnoy himioterapii. Klinicheskie rekomendatsii. Versiya-2018-03]. Moscow: Mezhtseional'naya assotsiatsiya po klinicheskoy mikrobiologii i antimikrobnoy khimioterapii; 2018. (in Russian)
13. Zwaluw K., Haan A., Pluister G.N. et al. The Carbapenem Inactivation Method (CIM), a Simple and Low-Cost Alternative for Carba NP Test to Assess Phenotypic Carbapenemase Activity in Gram Negative Rjds. *PLoSOne*. 2015; 10 (3): e0123690.
14. Shaydullina E.R., Eydel'shtein M.V., Skleenova E.Yu., Sukhorukova M.V., Kozlov R.S. Antibiotic resistance of nosocomial carbapenemase-producing strains of Enterobacterales in Russia: results of an epidemiological study 2014-2016. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2018; 20(4):362-9. (in Russian)
15. Sukhorukova M.V., Eydel'shtein M.V., Ivanchik N.V., Skleenova E.Yu., Shaydullina E.R., Azizov I.S. et al. Antibiotic resistance of nosocomial Enterobacterales strains in Russian hospitals: results of a multicenter epidemiological study "MARAFON 2015-2016". *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2019; 21(2):147-59. (in Russian)
16. Eydel'shtein M.V., Shek E.A., Sukhorukova M.V., Skleenova E.Yu., Ivanchik N.V., Shaydullina E.R. et al. Antibiotic resistance, production of carbapenemases and genotypes of nosocomial strains of *Pseudomonas aeruginosa* in Russian hospitals: results of a multicenter epidemiological study "MARAFON 2015-2016". *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2019; 21(2):160-70. (in Russian)
17. Shek E.A., Sukhorukova M.V., Eydel'shtein M.V., Skleenova E.Yu., Ivanchik N.V., Shaydullina E.R. et al. Antibiotic resistance, production of carbapenemases and genotypes of nosocomial strains of *Acinetobacter* spp. in Russian hospitals: the results of the multicenter epidemiological study "MARAFON 2015-2016". *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2019; 21(2):171-80. (in Russian)
18. Svetlichnaya Yu.S. Distribution of carbapenem resistant strains of *A. baumannii* in multidisciplinary hospitals in St. Petersburg. *Meditsinskij al'manah*. 2015; (5):102-5. (in Russian)
19. Gayazova D. Identification of microorganisms producing carbapenemase. Rezhim dostupa. – URL: <https://fedlab.ru/upload/medialibrary/000/prezentatsii-/prezentatsii-samara/%D0%93%D0%B0%D1%8F%D0%B7%D0%BE%D0%B2%D0%B0.pdf>. (data obrashcheniya: 21.02.2020). (in Russian)
20. Krechikova O.I. Phenotypic methods for identifying resistance mechanisms. Possibilities of using CHROMAgar in clinical practice. Research Institute of Antimicrobial Chemotherapy. Ulan-Ude. September 2. Rezhim dostupa. – URL: <https://chromagar.ru/wp-content/uploads/Fenotip-metody-ESBL-KPC-Hromagary-Ulan-Ude-02-sent-2016.pdf>. (data obrashcheniya: 21.02.2020). (in Russian)

REFERENCES

1. Savinova T.A., Lazareva A.V., Shamina O.V., Kryzhanovskaya O.A., Chebotar' I.V., Mayanskiy N.A. Genotypes and carriage of metallo-beta-lactamases among carbapenemase-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated in children of Moscow. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2018; 20(4):370-4. (in Russian)
2. Popov D.A. Comparative characteristics of modern methods for determining the production of carbapenemases. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2019; 21(2):125-33. (in Russian)
3. Polishchuk A.G., Yakubovich E.I., Poluhina O.V., Osovskikh V.V., Evtushenko V.I. Carbapenemase-producing gram-negative bacteria in a specialized hospital of St. Petersburg Russian Scientific Center for Radiology and Surgical Technologies. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2017; 19(3):235-42. (in Russian)
4. Khrul'nova S.A., Korobova A.G., Fedorova A.V., Frolova I.N., Savochkina Yu.A., Klyasova G.A. Detection of genes acquired by carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* isolates isolated from the blood culture of patients with tumors of the blood system. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2019; 21(1):56-60. (in Russian)
5. Kozlov R.S., Stetsyuk O.U., Andreeva I.V. Ceftazidime-avibactam: new "rules of the game" against multiresistant gram-negative bacteria. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2018; 20(1):24-34. (in Russian)
6. Technique for collecting and transporting biomaterials to microbiological laboratories. Guidelines 4.2.2039-05. Technique for collecting and transporting biomaterials to microbiological laboratories. Guidelines 4.2.2039-05. [Tekhnika sbora i transportirovaniya biomaterialov v mikrobiologicheskie laboratorii. Metodicheskie ukazaniya 4.2.2039-05]. Moscow: Federal'nyi tsentr Gossanepidnadzora Minzdrava Rossii; 2005. (in Russian)
7. Laboratory diagnosis of meningococcal infection and purulent bacterial meningitis. Methodical instructions. [Laboratornaya diagnostika meningokokkovoy infektsii i gnoynnykh bakterial'nykh meningitov. Metodicheskie ukazaniya]. Moscow: Federal'nyi tsentr

ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Пискунов Д. П.^{1,3}, Данилова Л. А.¹, Пушкин А. С.^{2,3}, Рукавишникова С. А.^{2,3}

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ И ЭНДОГЕННЫХ ФАКТОРОВ НА КАЧЕСТВО ПРЕАНАЛИТИЧЕСКОГО ЭТАПА ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

¹Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Минздрава РФ, 194100 Санкт-Петербург, Россия;

²Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И. П. Павлова Минздрава РФ, 197022, Санкт-Петербург, Россия;

³ГБУЗ Городская многопрофильная больница № 2, 194354, Санкт-Петербург, Россия

Представлен обзор литературы по анализу влияния эндогенных и экзогенных факторов на качество преаналитического этапа лабораторных исследований. Показана значимость учета внешних и внутренних факторов влияния на образцы крови на преаналитическом этапе лабораторных исследований.

Среди экзогенных рассмотрен ряд факторов: флеботомия, пробирки для образцов, транспортировка и хранение. На данном этапе существует ряд факторов способных существенно повлиять на результаты тестирования. Среди аспектов процесса флеботомии рассмотрены: подготовка персонала, контаминация дезинфектантами, диаметр игл, контаминация материалами игл. В обзоре рассмотрены возможные контаминации компонентами пробирок, а также важность выбора правильных антикоагулянтов и наполнителей. Транспортировка и хранение биологических образцов также может быть источником ошибок на преаналитическом этапе лабораторного тестирования. Проанализирована проблема определения стабильности аналитов при хранении, а также аспекты транспортировки образцов современными средствами.

Среди эндогенных факторов рассмотрены: гемолиз, липемия, иктеричность, метаболизм клеток. Гемолиз относят к самым частым следствиям ошибок на преаналитическом этапе. Показана важность выбора способа идентификации гемолизированных пробирок и неоднородность смещений результатов в разных аналитических системах. Также в обзоре показано влияние различных классов липопротеинов на мутность образца, возможные преаналитические ошибки и воздействие на измерение аналитов. Показано возможное воздействие высоких концентраций билирубина на измерение аналитов. Также рассмотрен метаболизм некоторых клеток и его воздействие на образцы.

Ключевые слова: преаналитический этап; обзор литературы; качество лабораторных тестов.

Для цитирования: Пискунов Д. П., Данилова Л. А., Пушкин А. С., Рукавишникова С. А. Влияние экзогенных и эндогенных факторов на качество преаналитического этапа лабораторных исследований. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65(12): 778-784. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-12-778-784>

Piskunov D.P.^{1,3}, Danilova L.A.¹, Pushkin A.S.^{2,3}, Rukavishnikova S.A.^{2,3}

INFLUENCE OF EXOGENOUS AND ENDOGENOUS FACTORS ON THE QUALITY OF THE PREANALYTICAL STAGE OF LABORATORY TESTS (REVIEW OF LITERATURE)

¹ Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, Saint Petersburg, Russia;

² Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia;

³ «City Multiprofile Hospital № 2», Saint Petersburg, Russia

A literature review in the article presents an analysis of the influence of endogenous and exogenous factors on quality of preanalytical phase of laboratory testing. The review shows significance of external and internal factors influencing blood samples at preanalytical phase of laboratory testing. Among the exogenous factors considered: phlebotomy, test tubes for samples, transportation and storage. A number of factors exist at this phase that significantly affect test results. We examined these aspects of phlebotomy process: staff training, disinfectant contamination, needle diameter, needle material contamination. The review considers possible contamination with tube components and the importance of choosing the right anticoagulants and excipients. Transportation and storage of biological samples can be a source of errors at the preanalytical phase of laboratory testing. We analyzed the problem of determining the stability of analytes during storage and aspects of transportation samples by modern means.

Among the endogenous factors considered: hemolysis, lipemia, ictericity, cell metabolism.. Hemolysis is one of the most frequent consequences of errors at the preanalytical phase. We analyzed importance of choosing a method for identifying hemolyzed tubes and the heterogeneity of bias results on different analytical systems. The review shows contribution of various classes of lipoproteins to turbidity of sample, possible preanalytical errors and impact on analytical tests. We examined possible effects of high bilirubin concentrations on analyte measurements. In the review, we also examined metabolism of some cells and its effect on samples.

Key words: preanalytical phase; literature review; quality of laboratory tests.

For citation: Piskunov D.P., Danilova L.A., Pushkin A. S., Rukavishnikova S. A. Influence of exogenous and endogenous factors on the quality of the preanalytical stage of laboratory tests (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65 (12): 778-784 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-12-778-784>

For correspondence: Piskunov D.P., PhD student Saint-Petersburg State Pediatric Medical University Ministry of Health of the Russian Federation; doctor of biochemistry department of clinical laboratory, St.-Petersburg State Budgetary Healthcare Institution «City Multi-field Hospital № 2»; e-mail: dmi6141@gmail.com

Information about authors:

Piskunov D. P., <https://orcid.org/0000-0002-9752-2539>;
Danilova L. A., <https://orcid.org/0000-0003-0665-1755>;
Pushkin A.S. <https://orcid.org/0000-0003-2875-9521>;
Rukavishnikova S.A., <https://orcid.org/0000-0002-8161-2425>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 22.01.2020
Accepted 15.06.2020

Введение. В обзоре анализируются вопросы влияния эндогенных и экзогенных факторов на качество преаналитического этапа лабораторных исследований. Так, диагностика *in vitro* стала незаменимым инструментом в клинической практике для диагностики и мониторинга заболеваний [1]. Согласно исследованиям U.Roch и соавт. [2], клинико-лабораторные тесты несут до 70% необходимой информации для принятия клинического решения. По этой причине важные решения в отношении ведения пациента могут опираться на небольшие изменения результатов лабораторных исследований. Таким образом, необходимо контролировать весь процесс лабораторного тестирования и учитывать факторы влияния на пробы пациентов.

Согласно ГОСТ Р 53079.4 — 2008 «Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований»: «Достоверность отражения в результатах лабораторных исследований состояния внутренней среды пациента, содержания искомым компонентов биологических материалов в значительной степени зависят от условий, в которых пациент находился в период, предшествующий взятию у него образца биоматериала, от условий и процедур забора образца, его первичной обработки и транспортировки в лабораторию, то есть от факторов преаналитического этапа лабораторного исследования». Преаналитическая фаза, включающая назначение тестов, взятие образцов, их хранение и транспортировку, а также подготовку образцов перед тестированием, на данный момент является критически важным аспектом для обеспечения качества процесса лабораторного тестирования. [3]. В работах G. Lipri и соавт. [4] отмечается, что преаналитические ошибки значительно влияют на достоверность полученных результатов тестов, поэтому оказывают большее влияние на последующее лечение пациентов. Ведущими факторами, способствующими повышению количества ошибок на преаналитическом этапе, являются отсутствие стандартизации различных методов сбора образцов, обработки, транспортировки и подготовке образцов, а также пренебрежение уже имеющимися руководствами или рекомендациями [5].

Важным критерием работы лаборатории является время оборота теста «turn around time» (TAT), который служит одним из параметров для измерения производительности любой лаборатории. Существует разница в толковании термина «TAT» среди клиницистов и врачей лаборатории. Для лабораторного персонала TAT включает время от получения образца в лаборатории до со-

ставления отчета. С другой стороны, врачи клиницисты рассматривают TAT с момента подачи заявки до получения отчета [6]. Многие описывают термин «терапевтическая TAT», то есть время от заказа теста до времени, когда решение о лечении принимается на основании результата теста. Таким образом, «терапевтический TAT» включает три фазы любого лабораторного теста: преаналитический, аналитический и постаналитический этапы. Причины задержек в TAT чаще всего связаны с преаналитической и постаналитической фазами. Наиболее распространенные причины задержек тестирования связаны со сбором и транспортировкой образцов, прерыванием рутинного тестирования для срочных анализов и передачей результатов. [6].

Влияние внешних факторов на качество образцов на преаналитическом этапе

Флеботомия. Венопункция является одной из наиболее часто выполняемых медицинских процедур в здравоохранении [7]. В зависимости от страны, взятие крови может выполняться сертифицированными флеботомистами, медсестрами, врачами и даже административным персоналом [8]. Сбор крови остается одним из ведущих источников преаналитических ошибок [7], которые часто могут привести к ошибкам в качестве образцов и безопасности пациентов. Основными факторами, которые влияют на процедуру венопункции, являются: недостаточная подготовка флеботомистов, плохое соблюдение существующих рекомендаций и отсутствие стандартизации [9]. В литературе присутствуют рекомендации для повышения качества процедуры взятия крови, однако сама процедура крайне зависима от флеботомиста.

В качестве руководства по флеботомии во всем мире используются два ключевых документа: руководство H3-A6 «Процедуры для сбора диагностических образцов крови с помощью венопункции», изданное в 2007 г. Институтом клинико-лабораторных стандартов — CLSI [Clinical Laboratory Standards Institute. Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture; Approved Standard—Sixth Edition. CLSI document H3- A6.] и руководство по взятию образцов крови, выпущенное Всемирной организацией здравоохранения в 2010 г. [WHO guidelines on drawing blood: best practices in phlebotomy]. Данные руководства включают в себя многие процедуры и подробно описывают порядок проведения флеботомии, но вопрос применения их на практике остается открытым, так как необходима адап-

тация этих документов к особенностям системы здравоохранения отдельных государств [10]. Европейские страны используют общепринятые стандарты, однако в некоторых из них приняты руководящие принципы по флеботомии на национальном уровне. Согласно обзору Европейской федерации клинической химии и лабораторной медицины, рабочей группы по преаналитическому этапу (EFLM WG-PA) [8], только семь европейских стран имеют национальные рекомендации по флеботомии: Ирландия, Великобритания, Испания, Словения, Швеция, Италия и Хорватия. Основными причинами того, что страны не внедрили национальные руководящие принципы, по-видимому, является отсутствие времени или инициативы для выполнения этой работы или из-за внедрения других - главным образом CLSI - руководящих принципов [8].

Стандартизация процесса флеботомии важна, так как на данном этапе существует ряд факторов, способных существенно повлиять на результаты тестирования. Перед взятием образца крови кожу очищают и дезинфицируют спиртом. Если алкоголь не высыхает полностью перед венопункцией, он может случайно попасть в пробу крови. Это загрязнение может вызвать гемолиз или помешать измерению уровня этанола в крови [11]. Чтобы свести к минимуму влияние антисептиков, перед получением образцов крови кожа должна быть полностью сухой. Немаловажным фактором являются иглы для флеботомии. Одной из проблем, связанных с иглами, является гемолиз, который вызывает выделение гемоглобина и других внутриклеточных аналитов (например, калия, лактатдегидрогеназы, аспартатаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, неорганического фосфата и магния) в сыворотку или плазму [12]. Эти аналиты будут ложно увеличены в образцах, тогда как альбумин, щелочная фосфатаза и натрий будут ложно снижены по причине разведения образцов. Свободный гемоглобин в сыворотке или плазме может помешать нескольким клиническим анализам, что приведет к неточным результатам или потребует повторного забора крови. Обнаружено, что иглы малого диаметра (25 калибра или менее) связаны со статистически значимым увеличением содержания калия и других аналитов в сыворотке крови вследствие гемолиза [12]. Более медленные скорости потока в иглах с меньшим отверстием также связаны с повышенной свертываемостью, окклюзией и вариациями результатов тестов [13]. Иглы большого диаметра (больше 19-го калибра) могут вызывать гемолиз из-за турбулентности, т. е. увеличения неламинарного кровотока [12]. Поэтому важно подбирать иглу по размеру вены; в большинстве условий сбора предпочтительны иглы 21-го калибра [11]. Компоненты металлической иглы (например, хром, железо, марганец и никель) могут загрязнять образцы крови и мешать последующим химическим реакциям или ложно повышать уровень металлов в крови [14].

Использование шприцев вместо вакуумных пробирок может существенно отразиться на качестве образцов крови, согласно исследовательским данным T.Ashavaid и соавт. [15] частота гемолиза в образцах, собранных с помощью шприцев, в 200 раз выше, чем в пробирках с вакуумом. Это связано с высокой нагрузкой на мембраны эритроцитов во время движения поршня шприца.

Выбор пробирки для взятия образцов. Исследования показали, что большая часть времени теста обусловлена факторами на преаналитическом этапе, вклю-

чая эффективность доставки образцов [16]. Одним из факторов является время свертывания крови, а для получения сыворотки (пробирки с активатором сгустка и разделением геля) требуется 30 мин для свертывания. Следовательно, чтобы сократить проблему времени свертывания, некоторые лаборатории используют образцы плазмы для тестирования. Однако известно, что плазма часто не является приемлемой альтернативой сыворотки [17]. Плазма имеет свой набор недостатков, например, проблему полного смешивания крови с антикоагулянтами, разницу в значениях результатов для некоторых аналитов при измерении в сыворотке и плазме (калий, лактатдегидрогеназа), что требует изменения референсных интервалов [18]. Также исследования стабильности аналитов имеют более высокий показатель в сыворотке, чем в плазме [19].

Пробирки для забора крови состоят из резиновых пробок, материалов стенок, разделительных гелей, активаторов сгустка, антикоагулянтов и поверхностно-активных веществ, которые могут влиять на результаты анализов.

Современные пробирки изготавливают из пластика, который обладает рядом преимуществ, сводя к минимуму выход биологически опасного материала вследствие разрушения пробирки, повышенной ударопрочностью, увеличивает допуск на скорость центрифугирования, уменьшая вес при транспортировке, облегчает утилизацию при сжигании и снижает затраты на утилизацию биологически опасных отходов. Однако пластиковые пробирки ограничены повышенной газопроницаемостью по сравнению со стеклянными пробирками [20].

Компоненты резиновых пробок потенциально могут загрязнять образцы крови и вызывать ошибки анализа, так как в производстве резиновых пробок используются некоторые металлы, такие как кальций, алюминий, магний и цинк. Другие потенциальные загрязнители, обнаруженные в резиновых пробках, включают серу, серо-содержащие ускорители вулканизации, жирные кислоты и пероксиды. [21] Таким образом, предпочтительнее заполнять пробирки до их назначенного объема и хранить в вертикальном положении, чтобы минимизировать выщелачивание из пробки и не концентрировать потенциальные загрязнители в небольших объемах образца.

Нанесение силиконовых или глицериновых смазок на пробки облегчает установку и удаление пробок из пробирок для сбора крови. Глицерин не следует использовать при измерении концентрации триглицеридов в крови, поскольку глицерин является компонентом анализа. Силиконизированные пробки являются предпочтительными, потому что силикон меньше влияет на точность анализов. Однако силикон на резиновых пробках может ложно повышать уровень ионизированного магния и общего трийодтиронина [22]. Таким образом, смазка-пробка должна рассматриваться как потенциальный источник ошибок в анализах клинической лабораторной диагностики.

Некоторые пробирки содержат разделительные гели, которые образуют барьер между сгустком и сывороткой во время центрифугирования. Разделительные гели заметно улучшают стабильность сывороточного и плазменного аналита, устраняя необходимость в аликвотировании сыворотки и облегчая хранение и транспортировку. На положение геля влияют контролируемые производителем переменные (удельный вес, предел текучести, вязкость, плотность и материал пробирки),

лабораторные условия (скорость центрифугирования, температура, условия ускорения и замедления, а также условия хранения) и факторы пациента (терапия гепарином, низкий гематокрит, повышенный белок плазмы, удельный вес) [23]. Преимуществами таких пробирок является простота использования, более короткое время обработки за счет активации сгустка. В идеале лабораторные результаты не должны зависеть от взаимодействия с разделительными гелями. Однако, несколько отчетов показывают влияние гелей на концентрацию аналитов. Объем образца, время хранения, температура и тип геля могут влиять на адсорбцию лекарств на геле [24]. Гидрофобные лекарственные средства, такие как фенитоин, фенобарбитал, карбамазепин, хинидин и лидокаин, могут адсорбироваться на гидрофобных разделительных гелях. Эта адсорбция может снизить концентрацию лекарственного средства в сыворотке на 20-50% через 24 ч при 4°C [25]. Концентрация прогестерона подвергается зависящему от времени снижению до 50% при хранении над разделительным гелем в течение 6 дней. [26]. Также капли геля и масла могут мешать пробозаборнику, частицы геля могут покрывать и изолировать электроды, тем самым изменяя электрический потенциал и измеряемые концентрации электролитов.

Как фактор влияния на стабильность аналитов рассматриваются и сурфактанты, т. е. вещества, улучшающие перемешивание образца, распределение активатора сгустка и предотвращающие адсорбцию белков, эритроцитов и тромбоцитов к стенкам пробирки. Согласно данным R.Bowen и соавт. [27], сурфактанты способны влиять на концентрацию ионизированного магния и лития, а также на концентрацию жирных кислот.

Кровь, собранная для анализа сыворотки, должна сворачиваться как можно быстрее и в полной мере, чтобы облегчить отделение сгустка во время центрифугирования. Если стеклянные поверхности активируют свертывание менее чем за 30 мин, то для пластиковых пробирок требуются активаторы сгустка. Стекло, кремнезем, каолин, бентонит используются в качестве активаторов через внутренний путь, который зависит от площади поверхности, а также активаторов сгустков в виде частиц, таких, как неорганические силикаты, которые относительно медленны (30–60 мин) [28]. Второй тип активатора сгустка активирует внешний путь, является биохимически активным и зависит от концентрации. Хотя эти активаторы сгустка работают быстро (10–20 мин), сгустки получаются желатиновые и не отделяются чисто. Таким образом, полученная сыворотка часто имеет худшее качество [28]. В исследованиях C.Wang и соавт. [29] сообщалось о влиянии активаторов сгустка на лабораторные исследования. Так, было показано, что кремнезем или кремнийорганическое поверхностно-активное вещество ложно повышают концентрацию лития, определенную ион-специфическим электродным анализатором, концентрация тестостерона также может повышаться при исследовании образцов в пробирках, содержащих активатор сгустка.

Когда плазма используется для диагностических анализов, необходимо позаботиться о выборе подходящего антикоагулянта. Наиболее часто используемые антикоагулянты в пробирках для сбора крови представляют собой этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА), гепарин и цитрат. Антикоагулянты могут быть в жидком или твердом виде (порошкообразном, кристаллизованном или лиофилизированном) и должны добавляться в со-

ответствующих концентрациях для сохранения аналитов, чтобы предотвратить вмешательство в связывание или осаждение комплексов антиген-антитело. Калия ЭДТА (K₂EDTA) является широко используемым хелатирующим агентом, который связывает кальций и предотвращает образование сгустков. Это антикоагулянт выбора для проведения подсчета клеток крови (СВС). EDTA может связывать ионы металлов, такие как европий, который присутствует в некоторых реагентах для иммуноанализа, или цинк и магний, которые являются общими кофакторами для ферментов (например, щелочной фосфатазы), используемых в качестве реагентов для иммуноанализа [30]. Таким образом, соотношение крови к EDTA является критическим для оптимальных результатов теста.

Гепарин используется в сочетании с солями лития, натрия и аммония в качестве антикоагулянта. Растворы гепарина разбавляют образцы, поэтому в пробирках используются сухие соли гепарина. Гепарин может мешать измерению хлорида, потому что электроды хлорид-иона выбирают такие ионы, как гепарин, которые имеют энергию гидратации большую, чем хлорид [31]. При использовании гепарина также возможно ложное занижение уровня альбумина и значительно более высокая активность КФК и ГГТП при нарушении соотношения гепарин/образец. [32]

Таким образом, качество пробирок для сбора крови также является важным фактором для получения надежных результатов лабораторного тестирования. Высокое качество пробирок позволяет отчасти стандартизировать процесс забора крови.

Транспортировка и хранение образцов. Попытки определить стабильность аналитов на преаналитической стадии лабораторных исследований можно обнаружить в научных публикациях уже в 1954 г. [33]. Позже были сформулированы рекомендации ВОЗ [Quality of diagnostic samples. Recommendations of the Working Group on Preanalytical Quality of the German Society for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine] и CLSI [Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Procedures for the handling and processing of blood specimens for common laboratory tests; approved guideline. Document H18-A4]. Однако, часто эти рекомендации трудно применять в повседневной практике, поскольку описанные времена стабильности аналитов часто несовместимы со временем, затрачиваемым на транспортировку образцов крови от места сбора в лабораторию. Таким образом, часто происходит задержка перед отделением плазмы от эритроцитов, что может также изменять стабильность аналитов.

Требования к условиям хранения и транспортировки образцов биоматериалов в клиническую лабораторию отражены в ГОСТ Р 53079.4 — 2008. Согласно данным требованиям: «Условия хранения образцов биоматериалов, взятых у пациентов, определяются стабильностью в этих условиях искомого аналита. Максимально допустимая нестабильность, выраженная в процентном отклонении результата после хранения от исходного уровня, не должна превышать половины размера общей ошибки определения, рассчитываемой из суммы биологической и аналитической вариации данного аналита. Максимально допустимое время хранения измеряется периодом времени, в течение которого в 95% образцов содержание аналита сохраняется на исходном уровне».

Критерии стабильности анализов часто разнятся, например, ВОЗ сообщает, что стабильность калия и фосфата в цельной крови составляет менее 1 ч, однако есть исследования, рекомендуемые отделять сыворотку в первые 2 ч для этих анализов [34]. Несмотря на имеющиеся публикации, встречается мнение о неполной информации о стабильности анализов [19]. Иногда публикации имеют недостаточно большую выборку [35], также образцы центрифугируют, а затем разделяют на аликвоты и замораживают перед тестированием, что может внести смещение в результаты [36]. В исследованиях наблюдаемые изменения концентрации анализов анализируются различными методами: t-критерий Стьюдента [37], дисперсионный анализ [38], тест Уилкоксона [39], изменение более 10% относительно базовых концентраций [36, 40] или из аналитического подхода SCL (significant change limits) [41], а также сочетание аналитических и биологических вариаций [42]. Таким образом, эти исследования дают значительно разные пределы стабильности анализов.

Транспортировка биологических образцов также может быть источником ошибок на преаналитическом этапе лабораторного тестирования. Продолжающаяся централизация служб лабораторной медицины во всем мире способствует возникновению проблем, связанных с оптимальными условиями транспортировки образцов [43].

Транспортировка на большие расстояния авиатранспортом сопровождается некоторыми негативными факторами воздействия на пробы. Основное значение при такой перевозке будут играть изменение атмосферного давления и вибрация. Было установлено, что снижение давления до 600-200 мбар приводит к более высокому гемолизу образцов крови по сравнению с 1000 мбар (765 мм.рт.ст.). [44].

Использование пневмонической транспортной системы (ПТС) первоначально сопровождалось проблемой, в основном связанной с возможным повреждением клеток крови из-за высоких ускоряющих и замедляющих сил. Однако эти проблемы были в основном преодолены так, что использование пневмопочты в настоящее время является обычным явлением во многих медицинских учреждениях по всему миру. Единственным недостатком остается потенциальное влияние высокоскоростной транспортировки на активацию тромбоцитов, в то время как о дополнительных проблемах качества образца сообщений в литературе нет [45]. Другой неотъемлемый и довольно очевидный недостаток ПТС представлен ограниченным диапазоном пространства, что делает эти системы пригодными только для доставки образцов на небольшое расстояние, чаще всего в пределах границ больницы.

Недавно появился новый способ доставки биологических образцов - дрон, также известный как беспилотный летательный аппарат (БПЛА). Международная организация гражданской авиации (ИКАО) в настоящее время классифицирует беспилотники по двум категориям: автономные БПЛА (управление автономно бортовыми компьютерами) и БПЛА с дистанционным управлением (управляемые пилотом-человеком на земле). Использование транспортных средств первого класса в настоящее время запрещено из-за правовых и имущественных вопросов, в то время как последний класс подлежит гражданскому регулированию в соответствии с ИКАО и согласно соответствующим национальным авиационным стандартам. Существуют исследования T.Amukele [46], показывающие приемлемость исполь-

зования БПЛА для доставки образцов в лабораторию, при этом влияния на точность широкого спектра клинической химии, гематологии и коагулологических тестов не обнаружено. Однако, на данный момент существуют большие риски использования БПЛА в связи с высокой аварийностью. Риск того, что люди будут ранены или даже подвергнуты биологическому загрязнению в результате столкновения с БПЛА, несущими пробирки с кровью, все еще слишком высок [47].

Влияние внутренних факторов на качество образцов на преаналитическом этапе

Гемолиз. Самым частым следствием ошибок на преаналитическом этапе является гемолиз образцов. Гемолиз обычно определяют, как повреждение или полное разрушение эритроцитов в крови. Этот патологический процесс условно подразделяют на две основные категории: гемолиз *in vivo*, когда эритроциты повреждаются из-за наличия гемолитических заболеваний, или гемолиз *in vitro* когда эритроциты повреждаются на любом этапе от сбора крови до анализа. В настоящее время гемолизированные образцы являются основной преаналитической проблемой в лабораторной диагностике, поскольку высвобождение гемоглобина и других внутриклеточных соединений в сыворотке или плазме может поставить под угрозу качество тестирования [48]. В литературе существуют противоречия относительно того, как лаборатория должна обращаться с гемолизированными образцами [49], но их автоматическая идентификация с использованием индекса гемолиза (НП) в настоящее время широко распространена. Превосходство данного подхода над традиционным визуальным осмотром центрифугированных образцов было описано Simundic A.M. и соавт. [50]. Также следует учитывать рекомендации производителя аналитических систем и реактивов относительно гемолизированных проб, по причине не одинаковых эффектов интерференции на различных анализаторах [51].

Липемия. В отличие от гемолиза, в новых публикациях липемия уделяется гораздо меньше внимания. Общая частота образцов липемии колеблется в пределах 0,5-2,5%, в зависимости от типа больницы и доли стационарных и амбулаторных образцов [52]. Липемия - это помутнение образца, вызванное накоплением частиц липопротеинов. Поскольку липопротеины различаются по размеру, не все классы вносят одинаковый вклад в мутность. Самые крупные частицы, хиломикроны, с размером 70-1000 нм, вносят наибольший вклад в возникновении мутности образца. Накопление мелких частиц, липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) не приводит к липемии образцов [53]. Наиболее распространенной преаналитической причиной липемии является забор крови после еды. Накопление липопротеинов в образце пациента может влиять на измеряемые анализы физическими и химическими взаимодействиями. Липемия может неспецифически вмешиваться в различные иммуноанализы. Липопротеины могут мешать реакции антиген-антитело, блокируя точки связывания на антителах. В зависимости от характера реакции, помехи могут вызывать как ложно повышенный, так и ложно уменьшенный результат [54]. Наиболее распространенным способом воздействия липемии на результаты лабораторных исследований является интерференция при спектрофотометрии. Частицы липопрот-

теина в образце могут поглощать свет. Количество поглощенного света обратно пропорционально длине волны и уменьшается от 300 до 700 нм, [55]. Поэтому методы, которые используют более низкие длины волн, больше подвержены влиянию липемии, поскольку поглощение является самым высоким в этой части спектра. Многие анализы клинической химии такие как: аланинаминотрансфераза (АлАТ), аспаргатаминотрансфераза (АсАТ), глюкоза измеряются при длине волны 340 нм, и на большинство из этих методов сильно влияет липемия. Важно, что направление и степень помех будут отличаться при сравнении разных методов и аналитических систем для одного и того же параметра [56].

Иктеричность. Высокие концентрации билирубина в сыворотке или плазме могут вызывать помехи в анализах вблизи пика поглощения билирубина ~ 456 нм. Также билирубинемия может влиять на качество теста и химическим взаимодействием, например, с реакциями, катализируемыми пероксидазой. Наиболее широко опубликованные исследования посвящены влиянию интерференции билирубина в методах Яффе для измерения креатинина. [57]

Метаболизм клеток. Немаловажным фактором влияния на анализы в процессе хранения и транспортировки образцов становится метаболизм клеток крови.

Исследований о зависимости изменений уровня аналитов и количества/параметров клеток крови крайне мало. Однако, существуют современные исследования о метаболизме клеток крови. Так, например, активированные лимфоциты резко увеличивают энергетические потребности для поддержки метаболических процессов, необходимых для роста, пролиферации и эффекторной функции [58], а переход тромбоцитов из состояния покоя в активированное состояние требует кардинальных изменений в доступности АТФ. Тромбоциты обладают молекулярным механизмом, необходимым для генерации АТФ как в процессе гликолиза, так и окислительно-фосфорилирования [59].

Возраст пациента также играет роль фактора, влияющего на стабильность аналитов в пробах. Так, с возрастом происходит снижение внутриклеточного уровня окисления глюкозы во всех тканях организма. Среди возможных причин этого выделяют снижение физической активности, дисфункцию митохондрий, гормональные изменения (то есть снижение IGF-1 и DHEA), повышенный окислительный стресс и воспаление [60].

Выводы. Многие указанные выше внешние и внутренние факторы, оказывающие влияние на качество преаналитического этапа лабораторных исследований, изучены недостаточно и требуют дальнейшего изучения.

Для повышения качества преаналитического этапа лабораторных исследований требуется учитывать, как экзогенные, так и эндогенные факторы влияния на пробы во время преаналитического этапа.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-9, 11-60 см. REFERENCES)

10. Ковалевская С. Н., Хоровская Л. А., Петрова Н. Г. Процедура флеботомии для клинических лабораторных исследований перспективы совершенствования преаналитического этапа лабораторного процесса. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 59 (8): 61-4.

REFERENCES

1. Raman G., Avendano E., Chen M. Update on Emerging Genetic Tests Currently Available for Clinical Use in Common Cancers, in Technology Assessment Report. Rockville, MD: *Agency for Healthcare Research and Quality*; 2013.
2. Rohr U., Binder C., Dieterle T., Giusti F., Messina C., & Toerien E. et al. The Value of In Vitro Diagnostic Testing in Medical Practice: A Status Report. *PLOS ONE*. 2016; 11(3).
3. Lippi G., Banfi G., Church S., Cornes M., De Carli G., & Grankvist K. et al. Preanalytical quality improvement. In pursuit of harmony, on behalf of European Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Working group for Preanalytical Phase (WG-PRE). *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2015; 53(3).
4. Lippi G., Cadamuro J. Novel Opportunities for Improving the Quality of Preanalytical Phase. A Glimpse to the Future? *Journal of Medical Biochemistry*. 2017; 36(4): 293-300.
5. Simundic A. Preanalytical Phase – an updated review of the current evidence. *Biochemia Medica*. 2014; 6-6.
6. Steindel S. J., Howanitz P. J. Physician satisfaction and emergency department laboratory test turnaround time. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2001; 125: 863–71.
7. Ialongo C., Bernardini S. Phlebotomy, a bridge between laboratory and patient. *Biochemia Medica*. 2016; 26(1): 17-33.
8. Simundic A., Cornes M., Grankvist K., Lippi G., Nybo M., Kovalevskaya S. et al. Survey of national guidelines, education and training on phlebotomy in 28 European countries: an original report by the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) working group for the preanalytical phase (WG-PA). *Clin. Chem Lab. Med.* 2013; 51(8):1585-93.
9. Simundic A., Church S., Cornes M., Grankvist K., Lippi G., Nybo M. et al. Compliance of blood sampling procedures with the CLSI H3-A6 guidelines: An observational study by the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) working group for the preanalytical phase (WG-PRE). *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2015; 53(9): 1321-31.
10. Kovalevskaya S. N., Khorovskaya L. A., Petrova N. G. The procedure of phlebotomy for clinical laboratory studies: perspectives of development of pre-analytical stage of laboratory process. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2014; 59(8): 61-4. (in Russian)
11. Stankovic A., Smith S. Elevated Serum Potassium Values. *Pathology Patterns Reviews*. 2004; 121(1): 105-12.
12. Lippi G., Salvagno G., Montagnana M., Brocco G., Cesare Guidi G. Influence of the needle bore size used for collecting venous blood samples on routine clinical chemistry testing. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2006; 44(8): 1009-14.
13. Prabhu S., Kazarian T., Hakobyan N., Jabbar F., Dunham T., Valentino I. Needles and needleless devices for infusion of anti-haemophilic factor concentrate: impact on protein structure and function. *Haemophilia*. 2006; 12(1): 58-61.
14. Cornelis R., Heinzow B., Herber R., Molin Christensen J., Poulsen O., Sabbioni E. et al. Sample Collection Guidelines for Trace Elements in Blood and Urine. *Journal Of Trace Elements In Medicine And Biology*. 1996; 10(2): 103-27.
15. Ashavaid T., Dandekar S., Keny B., Bhambhawani V. Influence of blood specimen collection method on various preanalytical sample quality indicators. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2008; 23(2): 144-9.
16. Chung H. J., Lee W., Chun S., Park H. I., Min W. K. Analysis of turnaround time by subdividing three phases for outpatient chemistry specimens. *Annals of Clinical & Laboratory Science*. 2009; 39(2): 144-9.
17. Miles R. Comparison of Serum and Heparinized Plasma Samples for Measurement of Chemistry Analytes. *Clinical Chemistry*. 2004; 50(9): 1704-6.
18. Er T., Tsai L., Jong Y., Chen B. Selected Analyte Values in Serum Versus Heparinized Plasma Using the SYNCHRON LX PRO Assay Methods/Instrument. *Laboratory Medicine*. 2006; 37(12): 731-2.
19. Oddo C., Lombard E., Portugal H. Stability study of 81 analytes in human whole blood, in serum and in plasma. *Clinical Biochemistry*. 2012; 45(6): 464-9.

20. Kratz A., Stanganelli N., Van Cott E.M. A comparison of glass and plastic blood collection tubes for routine and specialized coagulation assays: a comprehensive study. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2006; 130(1): 39–44.
21. Van den Ouweland, J., Church S. High Total Protein Impairs Appropriate Gel Barrier Formation in BD Vacutainer Blood Collection Tubes. *Clin. Chem.* 2007; 53(2): 364-5.
22. Bowen R. Effect of Blood Collection Tubes on Total Triiodothyronine and Other Laboratory Assays. *Clin. Chem.* 2005; 51(2): 424-33.
23. Spiritus T. (). Iodinated Contrast Media Interfere with Gel Barrier Formation in Plasma and Serum Separator Tubes. *Clin. Chem.* 2003; 49(7): 1187-9.
24. Berk S. False Reduction in Serum Methadone Concentrations by BD Vacutainer(R) Serum Separator Tubes (SSTTM). *Clin. Chem.* 2006; 52(10): 1972-4.
25. Dasgupta A. Yared M., Wells A. Time-Dependent Absorption of Therapeutic Drugs by the Gel of the Greiner Vacuette Blood Collection Tube. *Therapeutic Drug Monitoring.* 2000; 22(4): 427-31.
26. Wilde C. Subject preparation, sample collection, and handling. In book: Wild D. The immunoassay. Handbook. CA: Elsevier; 2005: 443.
27. Bowen R., Hortin G., Csako G., Otañez O., Remaley A. Impact of blood collection devices on clinical chemistry assays. *Clin. Biochem.* 2010; 43(1-2): 4-25.
28. Dubrowny N.E., Harrop A.J. "Collection device", U.S. Patent No US 6,686,204 B2 February; 2004.
29. Wang C., Shiraishi S., Leung A., Baravarian S., Hull L., Goh V. et al. Validation of a testosterone and dihydrotestosterone liquid chromatography tandem mass spectrometry assay: Interference and comparison with established methods. *Steroids.* 2008; 73(13): 1345-52.
30. Jones A., Honour J. Unusual results from immunoassays and the role of the clinical endocrinologist. *Clinical Endocrinology.* 2006; 64(3): 234-44.
31. Rayana M., Burnett R., Covington A., D'Orazio P., Fogh-Andersen N., Jacobs E. et al. Recommendation for measuring and reporting chloride by ISEs in undiluted serum, plasma or blood: International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC): IFCC Scientific Division, Committee on Point of Care Testing and Working Group on Selective Electrodes. *Clinical Chemistry And Laboratory Medicine (CCLM).* 2006; 44(3): 346-52.
32. Lippi G., Avanzini P., Cosmai M., Aloe R., Ernst D. Incomplete filling of lithium heparin tubes affects the activity of creatine kinase and γ -glutamyltransferase. *British Journal Of Biomedical Science.* 2012; 69(2): 67-70.
33. Goodman J., Vincent J., Rosen I. Serum Potassium Changes in Blood Clots. *American Journal of Clinical Pathology.* 1954; 24(1): 111-3.
34. Foucher B, Pina G, Desjeux G, Prevosto JM, Chaulet JF, Cheminel V. Influence of temperature and delayed centrifugation: stability studies of 28 analytes currently analysed. *Ann. Biol.Clin. (Paris).* 2005; 63(1): 93-100.
35. Zwart S., Wolf M., Rogers A., Rodgers S. Gillman P., Hitchcox K. et al. Stability of analytes related to clinical chemistry and bone metabolism in blood specimens after delayed processing. *Clin. Biochem.* 2009; 42(9): 907-10.
36. Evans M., Livesey J., Ellis M., Yandle T. (). Effect of anticoagulants and storage temperatures on stability of plasma and serum hormones. *Clin. Biochem.* 2001; 34(2): 107-12.
37. Ono T., Kitaguchi K., Takehara M., Shiiba M., Hayami K. Serum-constituents analyses: effect of duration and temperature of storage of clotted blood. *Clin. Chem.* 1981; 27(1): 35–8.
38. Imeri F., Herklotz R., Risch L., Arbetsleitner C., Zerlauth M., Risch G., Huber A. Stability of hematological analytes depends on the hematology analyser used: A stability study with Bayer Advia 120, Beckman Coulter LH 750 and Sysmex XE 2100. *Clinica Chimica Acta.* 2008; 397(1-2): 68-71.
39. Parent X., Alenabi F., Brignon P., Souberbielle J.C. Delayed measurement of PTH in patients with CKD: storage of the primary tube in the dialysis unit, which temperature, which kind of tube? *Nephrol Ther.* 2009; 5(1): 34–40.
40. Jane Ellis M., Livesey J., Evans M. Hormone stability in human whole blood. *Clin. Biochem.* 2003; 36(2): 109-12.
41. Boyanton B.L., Blick K.E. Stability studies of twenty-four analytes in human plasma and serum. *Clin. Chem.* 2002; 48(12): 2242–7.
42. Zhang D.J., Elswick R.K., Miller W.G., Bailey J.L. Effect of serum-clot contact time on clinical chemistry laboratory results. *Clin. Chem.* 1998; 44(6):1325–33.
43. Lippi G., Simundic A. Laboratory networking and sample quality: a still relevant issue for patient safety. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.* 2012; 50(10): 1703-5.
44. Klose T., Borchert H., Pruss A., Roth W., Bohnen H., Putzker M. Current concepts for quality assured long-distance transport of temperature-sensitive red blood cell concentrates. *Vox Sanguinis.* 2010; 99(1): 44-53.
45. Pupek A., Matthewson B., Whitman E., Fullarton R., Chen Y. Comparison of pneumatic tube system with manual transport for routine chemistry, hematology, coagulation and blood gas tests. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM),* 2017; 55(10): 1537-44.
46. Amukele T., Sokoll L., Pepper D., Howard D., Street J. Can Unmanned Aerial Systems (Drones) Be Used for the Routine Transport of Chemistry, Hematology, and Coagulation Laboratory Specimens? *PLoS One.* 2015; 10(7).
47. Drone Crash Database.URL: <http://dronewars.net/drone-crash-database/> (Last access: 26. 11. 2019).
48. Cadamuro J., Wiedemann H., Mrazek C., Felder T., Oberkofler H., Fiedler G., Haschke-Becher E. The economic burden of hemolysis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM).* 2015; 53(11): 285-8.
49. Lippi G., Cervellini G., Plebani M. Reporting altered test results in hemolyzed samples: is the cure worse than the disease? *Clin. Chem. Lab. Med.* 2017; 26;55(8): 1112-4.
50. Simundic A., Nikolac N., Ivankovic V., Ferenc-Ruzic D., Magdic B., Kvaternik M., Topic E. Comparison of visual vs. automated detection of lipemic, icteric and hemolyzed specimens: can we rely on a human eye?. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.* 2009; 47(11): 1361-5.
51. Nordic Hemolysis project 2014. URL: <http://doc.noklus.no/handler.ashx?r=nkk&id=Preanalytiske%20EKV-program%202014%20Nordic%20Hemolysis%20project%202014.pdf> (last access: 26.11.2019)
52. Nikolac N. Lipemia: causes, interference mechanisms, detection and management. *Biochimica Medica.* 2014; 15;24(1): 57-67.
53. Garvey W., Kwon S., Zheng D., Shaughnessy S., Wallace P., Hutto A. et al. Effects of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes on Lipoprotein Subclass Particle Size and Concentration Determined by Nuclear Magnetic Resonance. *Diabetes.* 2003; 52(2), 453-62.
54. Schiettecatte J., Anckaert E., Smits J. Interferences in Immunoassays, 2012. URL: <https://www.intechopen.com/books/advances-in-immunoassay-technology/interference-in-immunoassays> (last access: 26.11.2019)
55. Lippiatt C. Endogenous interferences in laboratory tests: icteric, lipaemic and turbid samples. *Annals Of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine.* 2016; 53(4): 519-20.
56. Nikolac N., Simundic A., Miksa M., Lima-Oliveira G., Salvagno G., Caruso B., Guidi G. (). Heterogeneity of manufacturers' declarations for lipemia interference — An urgent call for standardization. *Clinica Chimica Acta.* 2013; 426: 33-40.
57. Dimeski G., McWhinney B., Jones B., Mason R., Carter A. Extent of bilirubin interference with Beckman creatinine methods. *Annals of Clinical Biochemistry.* 2008; 45(1): 91-2.
58. MacIver N., Jacobs S., Wieman H., Wofford J., Coloff J., Rathmell J. Glucose metabolism in lymphocytes is a regulated process with significant effects on immune cell function and survival. *Journal of Leukocyte Biology.* 2008; 84(4): 949-57.
59. Aibibula M., Naseem K., Sturmey R. Glucose metabolism and metabolic flexibility in blood platelets. *Journal Of Thrombosis And Haemostasis.* 2018; 16(11): 2300-14.
60. Kalyani, R., & Egan, J. Diabetes and Altered Glucose Metabolism with Aging. *Endocrinology And Metabolism Clinics of North America.* 2013; 42(2): 333-47.

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Терновой В.А., Лутковский Р.Ю., Пономарева Е.П., Гладышева А.В., Чуб Е.В., Тупота Н.Л., Смирнова А.М., Назаренко А.А., Локтев В.Б., Гаврилова Е.В., Агафонов А.П., Максюттов Р.А.

ОБНАРУЖЕНИЕ РНК SARS-COV-2 В НОСОГЛОТОЧНЫХ МАЗКАХ БОЛЬНЫХ COVID-19 И БЕССИМПТОМНЫХ НОСИТЕЛЕЙ МЕТОДАМИ ЦИФРОВОЙ ПЦР И ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Центр геномных исследований мирового уровня по обеспечению биологической безопасности и технологической независимости в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий, 630559, п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

В настоящей работе была проведена апробация двух разработанных нами наборов реагентов для обнаружения РНК SARS-CoV-2 по фрагменту гена ORF1ab в формате цифровой ПЦР и ПЦР в реальном времени. Были получены данные по выявлению РНК вируса SARS-CoV-2 в носоглоточных мазках больных COVID-19 и бессимптомных носителей. Разработанные наборы реагентов обеспечивали 100% чувствительность и предел детекции в 10^3 ГЭ/мл для qPCR, и не менее 200 копий/мл вирусной РНК при проведении цифрового ПЦР. Выполнена апробация этих методов с помощью панели из 1328 образцов, собранных от пациентов с подозрением на COVID-19 в начале 2020 г. на территории РФ. Показано, что dPCR более чувствителен и может быть использован для анализа образцов с низкой вирусной нагрузкой, в том числе от пациентов без клинических симптомов. dPCR значительно повышает точность лабораторного исследования и существенно снижает число ложноотрицательных результатов при диагностике SARS-CoV-2. Определение концентрации РНК SARS-CoV-2 у пациентов с различным клиническим течением заболевания показало, что концентрация вирусной РНК может резко снижаться в первые дни заболевания. Низкая концентрация вирусной РНК в пробах от пациентов также характерна при бессимптомном течении заболевания. Метод цифровой ПЦР обеспечивает более высокую выявляемость бессимптомных случаев заболевания, которая составляет приблизительно 75 % от числа инфицированных, в отличие от 45% выявляемости методом ПЦР в реальном времени. Полученные результаты по использованию метода цифровой ПЦР для детекции РНК SARS-CoV-2 показали, что этот метод особенно подходит для выявления РНК в случае ее низкой концентрации у контактных, а также для мониторинга изменения вирусной нагрузки у выздоравливающих пациентов.

Ключевые слова: SARS-CoV-2; ПЦР в реальном времени; цифровой ПЦР; COVID-19.

Для цитирования: Терновой В.А., Лутковский Р.Ю., Пономарева Е.П., Гладышева А.В., Чуб Е.В., Тупота Н.Л., Смирнова А.М., Назаренко А.А., Локтев В.Б., Гаврилова Е.В., Агафонов А.П., Максюттов Р.А. Обнаружение РНК SARS-CoV-2 в носоглоточных мазках больных COVID-19 и бессимптомных носителей методами цифровой ПЦР и ПЦР в реальном времени. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (12): 785-792. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-12-785-792>
Ternovoi V.A., Lutkovsky R.Yu., Ponomareva E.P., Gladysheva A.V., Chub E.V., Tupota N.L., Smirnova A.M., Nazarenko A.A., Loktev V.B., Gavrilova E.V., Agafonov A.P., Maksyutov R.A.

DETECTION OF SARS-COV-2 RNA IN NASOPHARYNGEAL SWABS FROM COVID-19 PATIENTS AND ASYMPTOMATIC CASES OF INFECTION BY REAL-TIME AND DIGITAL PCR

State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, World-class Genomic Research Center for Ensuring Biological Safety and Technological Independence within the framework of the Federal Scientific and Technical Program for the Development of Genetic Technologies, 630559, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia

In this work we tested two reagent kits developed by us for detecting SARS-CoV-2 RNA using a fragment of the ORF1ab gene in digital PCR and real-time PCR formats. Data were obtained on the detection of SARS-CoV-2 virus RNA in nasopharyngeal swabs of patients with COVID-19 and asymptomatic carriers. The developed reagent kits provided 100% sensitivity and a detection limit of 10^3 GE / ml for qPCR, and at least 200 copies / ml of viral RNA when performing digital PCR. These methods were tested using a panel of 1,328 samples collected from patients with suspected COVID-19 at the beginning of 2020 in the Russian Federation. It has been shown that dPCR is more sensitive and can be used to analyze samples with low viral load, including those from patients without clinical symptoms. dPCR significantly improves the accuracy of laboratory research and significantly reduces the number of false negative results in the diagnosis of SARS-CoV-2.

Determination of the concentration of SARS-CoV-2 RNA in patients with different clinical course of the disease showed that the concentration of viral RNA can sharply decrease in the first days of the disease. A low concentration of viral RNA in samples from patients is also characteristic of asymptomatic disease. Digital PCR provides a higher detection rate for asymptomatic cases, which is approximately 75% of those infected, as opposed to 45% for real-time PCR. The results obtained on the use of the digital PCR method for detecting SARS-CoV-2 RNA showed that this method is especially suitable for detecting RNA in case of its low concentration in contacts, as well as for monitoring changes in viral load in convalescent patients.

Key words: SARS-CoV-2; real time PCR; digital PCR; COVID-19.

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

For citation: Ternovoi V.A., Lutkovsky R.Yu., Ponomareva E.P., Gladysheva A.V., Chub E.V., Tupota N.L., Smirnova A.M., Nazarenko A.A., Loktev V.B., GavriloVA E.V., Agafonov A.P., Maksyutov R.A. Detection of SARS-CoV-2 RNA in nasopharyngeal swabs from COVID-19 patients and asymptomatic cases of infection by real-time and digital PCR. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65(12): 785-792 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-12-785-792>

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

Information about authors:

Ternovoi V.A., <http://orcid.org/0000-0003-1275-171X>;
Lutkovsky R.Yu., <http://orcid.org/0000-0001-9497-8875>;
Ponomareva E.P., <http://orcid.org/0000-0002-5348-944X>;
Gladysheva A.V., <http://orcid.org/0000-0002-7396-3954>;
Cub E.V., <https://orcid.org/0000-0003-1521-897X>;
Tupota N.L., <http://orcid.org/0000-0001-6150-370X>;
Smirnova A.M., <https://orcid.org/0000-0002-3406>;
Nazarenko A.A., <https://orcid.org/0000-0002-0812-0731>;
Loktev V.B., <http://orcid.org/0000-0002-0229-321X>;
GavriloVA E.V., <https://orcid.org/0000-0002-2014-3397>;
Agafonov A.P., <http://orcid.org/0000-0003-2577-0434>;
Maksyutov R.A., <https://orcid.org/0000-0003-1314-281X>.

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

Financing. This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (agreement # 075-15-2019-1665).

Acknowledgment. The authors express their sincere gratitude to the staff of the FBSI SSC VB "Vector" of Rospotrebnadzor for their assistance in the performance of this work: Sementsova A.O., Kartashov M.Yu., Eremeeva L.I., Bayandin RB, Bondarenko T.Yu., Bodnev S.A., Pyankov O.V., Pokhodnya S.A.

Received 07.08.2020
Accepted 31.08.2020

Введение. Пандемия коронавирусной болезни (COVID-19), вызванная в 2019 г. новым коронавирусом, началась в городе Ухань в Китае, широко распространилась по всему миру. Современные методы секвенирования позволили чрезвычайно быстро расшифровать геном вируса и провести его таксономическую идентификацию [1]. Вирус был классифицирован как новый коронавирус, названный SARS-CoV-2, принадлежащий к семейству *Coronaviridae*, отряду *Nidovirales*. Геном SARS-CoV-2 представлен несегментированной одноцепочечной РНК положительной полярности, размером около 29 890 нуклеотидов [2]. Это стало основой для создания методов генетической диагностики вируса SARS-CoV-2 и заболевания, вызываемого этим вирусом на основе ПЦР технологий [3]. Проведенный в дальнейшем анализ полногеномных последовательностей SARS-CoV-2 показал, что природным резервуаром вируса SARS-CoV-2 и его предшественников могут быть летучие мыши и панголины [4]. Геном коронавируса панголина (*pangolin-CoV*) на 91% идентичен с геномом SARS-CoV-2 и филогенетически очень близко связан с RaTG13 коронавирусом летучих мышей. Ключевой белок S1 *pangolin-CoV*, участвующий во взаимодействии с клеточным рецептором ACE2 человека и предопределяющий развитие заболевания у человека, фактически схож с S1 белком SARS-CoV-2 человека. Пять ключевых аминокислот в рецептор-связывающем домене идентичны у *pangolin-CoV* и SARS-CoV-2. Кроме того, SARS-CoV-2 содержит потенциальный сайт расщепления фуриновой протеазы [5].

Для обнаружения РНК SARS-CoV-2 у пациентов с COVID-19 широко используются различные варианты ПЦР тест-систем в режиме реального времени (qPCR) [6]. Для оценки полученных результатов, как правило, применяются следующие критерии: значение $Ct \leq 40$ со-

ответствует положительному результату, значение $Ct > 40$ отрицательному [7]. Однако, ПЦР тест-системы в режиме реального времени, в диапазоне $35 < Ct < 40$ работают на пределе чувствительности и часто требуют перепроверки. Учитывая неопределенность в трактовке результатов при низкой вирусной нагрузке при диагностике SARS-CoV-2, чрезвычайно важным является разработка более чувствительных методов диагностики COVID-19.

Цифровая ПЦР (dPCR) - это ПЦР технология, которая разделяет реакционную смесь на большое количество меньших реакций, в каждой из которых присутствует только одна молекула нуклеиновой кислоты и, таким образом, можно получить данные по конечной точке, на основе интенсивности флуоресценции для каждой индивидуальной тестируемой молекулы [8-10]. Количественная оценка выполняется путем применения статистики Пуассона при расчете доли отрицательных микроячеек и положительных, которые изначально содержали более одной молекулы-мишени. dPCR обладает большей точностью чем qPCR, и его гораздо проще использовать для подсчета числа копий РНК и количественной оценки из-за бинарной природы, в которой реакционные микроячейки считаются либо положительными или отрицательными [11]. Кроме того, dPCR более устойчив к ингибированию в ПЦР по сравнению с qPCR [12-14].

Инкубационный период у коронавирусной инфекции обычно составляет 5,2 - 5,8 дней [15]. Инфицированные пациенты начинают быть заразными за два - три дня до возникновения первых симптомов заболевания. Примерно через 14-16 ч с момента первого проявления симптомов пациенты максимально опасны. Далее, в течение недели их способность к инфицированию окружающих падает вплоть до полного исчезновения. РНК коронавируса можно обнаружить в крови пациентов в

течение 20 дней и даже несколько дольше. Описаны случаи сохранения РНК в крови до 37 дней после начала заболевания [6-19]. Субклинические (пресимптоматические) и инapparантные формы COVID-19 имеют прогрессивное течение и обычно диагностируются только при обнаружении вирусных маркеров в респираторных мазках и бронхоальвеолярных смывах [20].

Целью данной работы была апробация двух разработанных наборов реагентов для обнаружения РНК SARS-CoV-2 по фрагменту ORF1ab гена в формате qPCR и dPCR в носоглоточных мазках больных COVID-19 и бессимптомных носителей, сравнение возможностей использования qPCR и dPCR технологий для анализа образцов на наличие генетических маркеров SARS-CoV-2 с целью улучшения чувствительности и точности диагностики COVID-19.

Материал и методы. Клинические образцы. Клинические образцы, в виде носоглоточных мазков, были получены из всех регионов Российской Федерации в течение января-апреля 2020 г. от пациентов, госпитализированных с подозрением на COVID-19 и лиц, контактировавших с ними. Всего за февраль-март 2020 г. поступило и было исследовано 1328 образцов носоглоточных смывов, собранных в соответствии с временными рекомендациями Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека РФ от 21 января 2020 г. № 02/706-2020-27 по расследованию вспышек заболевания в период пандемии и освобождённых от институциональной проверки. Все исследования были выполнены, для клинических образцов в виде носоглоточных мазков, без дополнительного привлечения пациентов.

Выделение вирусной РНК. РНК была извлечена из клинических образцов с использованием набора РНК Рибо-ПРЕП (ЦНИИ эпидемиологии, Москва). Для оценки специфичности были использованы РНК вирусов птичьего гриппа А (H1N1, H3N2), вируса гриппа В/Victoria, коронавируса SARS и MERS, РНК сезонных коронавирусов человека (229E, HKU1, NL63 и OC43) и ДНК аденовируса 5 типа из коллекции ФБУН ГИЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Проведение qPCR. Для выявления РНК COVID-19 были использованы разработанные нами и зарегистрированные Росздравнадзором РФ (регистрационное удостоверение № РЗН 2020/9677 от 11.02.2020) наборы реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией («Вектор-ПЦР-2019-nCoV-RG», ТУ 21.20.23-088-05664012-2020). ПЦР в режиме реального времени и регистрацию результатов проводили в приборе CFX 96 (Bio-Rad, США) по каналу FAM. Результаты qPCR интерпретировали на основании значения порогового цикла «Сt».

Проведение dPCR. Последовательности праймеров и зондов для детекции гена-мишени ORF1ab SARS-CoV-2, использованные для этого исследования, были ранее нами разработаны для набора реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией («Вектор-ПЦР-2019-nCoV-RG»). Реакционная смесь содержала ddPCR Supermix(x2) Bio-Rad, праймеры (900 nM), зонд (250 nM) и кДНК анализируемого образца. Каждая реакционная смесь была преобразована в водно-масляную эмульсию с использованием генератора капель (Bio-Rad, США) QX200. Полученную эмульсию перено-

сили на 96-луночный планшет и инкубировали при 95°C в течение 10 мин для формирования микрокапель, затем амплифицировали в термоциклере C1000 Touch (Bio-Rad, США) 40 циклов с параметрами: 94 °C в течение 10 с, 56 °C 15 с, 60 °C в течение 45 секунд и затем 96 °C в течение 10 минут. Планшет переносили в устройство для считывания капель QX200 (Bio-Rad, США) и анализировали с использованием программного обеспечения QuantaSoft (V1.7.4, Bio-Rad, США).

Статистический анализ результатов. Коэффициент вариации для повторяемости результатов для qPCR рассчитывали по формуле: $Cv_p, \% = \frac{Ct(\text{станд. отклонение})}{Ct(\text{ср. значение})} \times 100 \%$ для 5 проб СОП ПКО 2019-nCoV. Коэффициент вариации воспроизводимости для qPCR рассчитывали по формуле: $Cv_p, \% = \frac{Ct(\text{станд. отклонение})}{Ct(\text{ср. значение})} \times 100\%$ для 10 проб. Линейный диапазон dPCR определялся путем оценки среднего числа копий кДНК в микрокапле [11]. Для оценки относительной ошибки использовали критерий Пуассона [12].

Результаты. Характеризация методов цифровой ПЦР и ПЦР в реальном времени для детекции генетического материала SARS-CoV-2. С целью обнаружения генетической информации коронавируса SARS-CoV-2 в экспериментальных и клинических образцах был разработан набор реагентов для выявления РНК (кДНК) коронавируса SARS-CoV-2 методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией. Его конструирование было проведено с использованием последовательностей фрагмента гена ORF1ab SARS-CoV-2 и образцов кДНК вируса SARS-CoV-2 полученных из клинических образцов. Контроль специфичности теста проводили с использованием СОП ПКО 2019-nCoV серия № 02-03.20, представляющий собой раствор рекомбинантной плазмиды pCR 2.1, содержащей вирусоспецифическую вставку SARS-CoV-2 (длина 3,9 kb). Также были использованы экспериментальные пробы, содержащие генетический материал коронавируса SARS-CoV-2, РНК вирусов гриппа типа А (H1N1, H3N2), РНК коронавирусов видов 229E, NL63, OC43, HKU1 [21], коронавирусов SARS и MERS [22], аденовируса 5 типа, вируса денге и респираторно-синцитиального вируса [23]. Специфичность сконструированного теста была оценена на панели сформированной из 109 положительных клинических образцов от пациентов с COVID-19 и панели отрицательных проб из 44 образцов. Специфичность составила 100%.

Верхний предел обнаружения РНК SARS-CoV-2 (LoV) для разработанного метода qPCR, в соответствии с рекомендациями CLSI EP17-A [10], составил 2800 копий/мкл при Ct 14. Для определения нижнего предела аналитической чувствительности набора реагентов «Вектор-ПЦР_{РВ}-2019-nCoV-RG» делали последовательные десятикратные разведения СОП ПКО 2019-nCoV, серии № 02-03.20, от концентрации 10⁷ до 10² копий/мл (рис.1).

Коэффициент вариации повторяемости для qPCR не превышал 3 %, а коэффициент вариации не превышал 6 %. Серийные 10-кратные разведения СОП ПКО коронавируса SARS-CoV-2 использовали для построения графика линейной интерполяции между количеством копий генетического материала в миллилитре для dPCR и Ct в qPCR. Полученные результаты соответствовали ожидаемым значениям в каждом тестируемом интервале. Хорошую линейность ($R^2 \geq 0,9936$) наблюдали в диапазоне

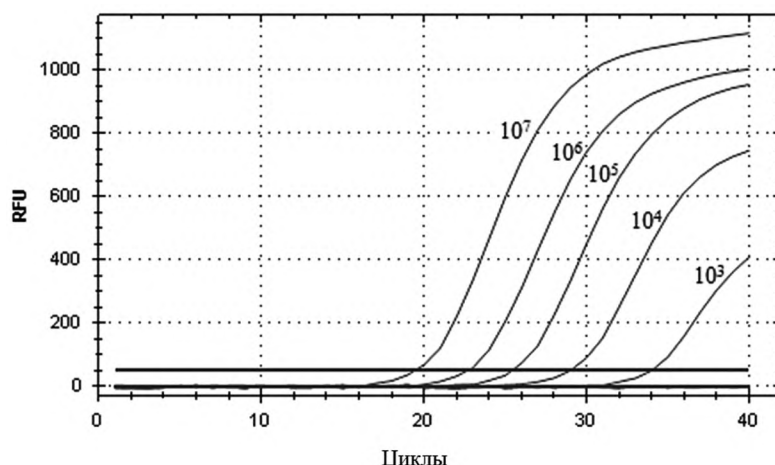


Рис. 1. Кривая интенсивности флуоресценции (RFU) для продуктов ПЦР в режиме реального времени по каналу FAM. Оценка аналитической чувствительности с 10-кратными разведениями СОП ПКО 2019-nCoV (10⁷ МЕ/мл) коронавируса SARS-CoV-2.

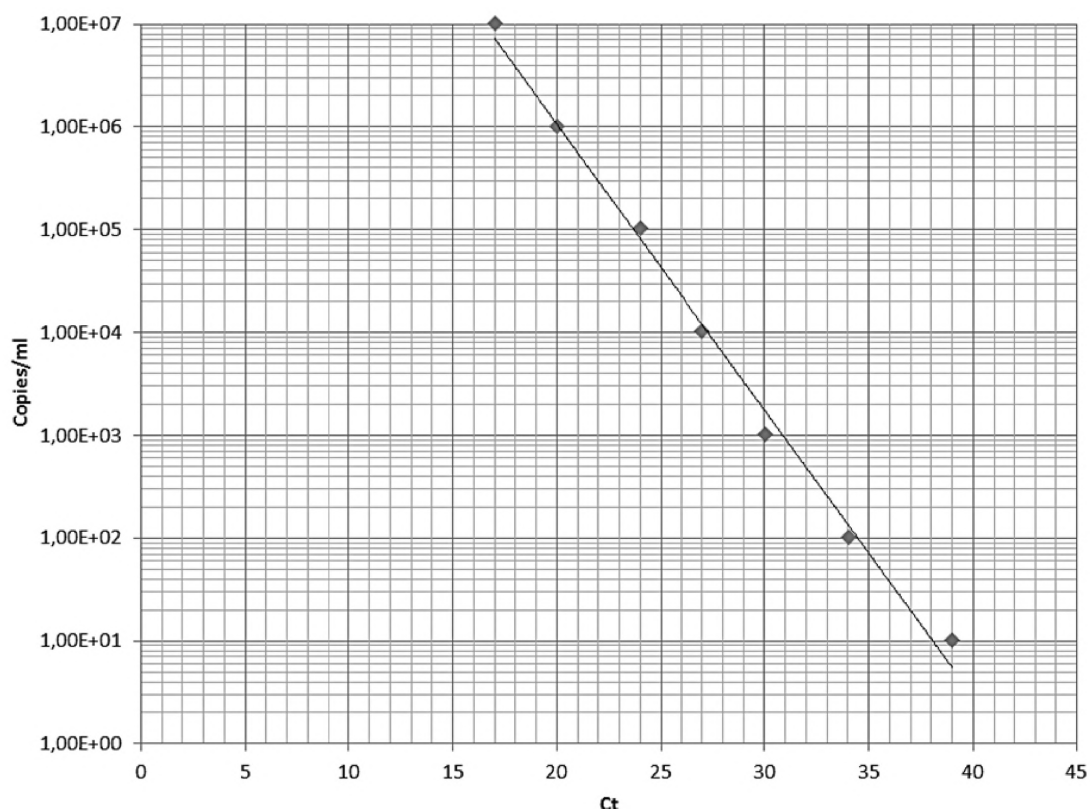


Рис. 2. График линейной интерполяции между параметрами «копий/мл» в dPCR и Ct в qPCR, для серийных 10-кратных разведений РНК SARS-CoV-2.

не от приблизительно 10⁷ до 10 копий/в реакции (рис. 2). LoB для данного метода, выраженное в геномных эквивалентах (ГЭ), составило 10³ ГЭ/мл (Ct 37).

Апробация методов ПЦР диагностики. За февраль-март 2020 г. при помощи ПЦР в реальном времени было исследовано 1328 образцов, поступивших из различных регионов Российской Федерации. Из них 32% образцов имели российское происхождение, 68% образцов были связаны с завозными на территорию РФ случаями COVID-19 (рис. 3). Завозные случаи были ассоциированы с более чем 20 странами мира. В начальный период

развития пандемии COVID-19 на территории РФ доминировали завозные случаи из Италии, Испании и Швейцарии, которые вместе составили 37% завозных случаев COVID-19 в РФ.

В 65% исследованных образцах была обнаружена РНК коронавируса SARS-CoV-2, из которых приблизительно 20% образцов были сомнительными и были отнесены к положительным образцам на основании проведения повторного qPCR анализа. По данным клинических наблюдений, у 40% пациентов с лабораторно подтвержденным диагнозом COVID-19 заболевание

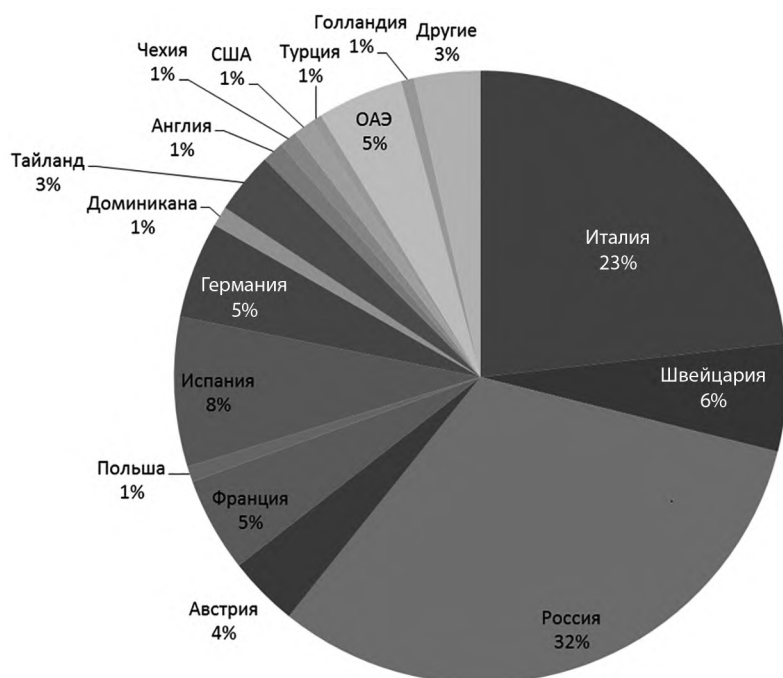


Рис. 3. Диаграмма процентного отношения количества образцов, поступивших в феврале-марте 2020 г. из различных регионов Российской Федерации, так и завозных случаев на территорию РФ, исследованные методом qPCR (всего 1328 образцов).

протекало без симптомов. У 22% болезнь протекала в форме внебольничных пневмоний, а у 25% — в форме ОРВИ.

Для сравнения эффективности диагностики коронавирусной инфекции методами qPCR и dPCR нами была сформирована панель из 171 образцов от пациентов с подозрением на COVID-19 и выполнены параллельные сравнительные исследования эффективности наборов «Вектор-ПЦРРВ-2019-nCoV-RG» и лабораторной системы для выявления вирусной РНК SARS-CoV-2 методом dPCR (см. таблицу).

При проведении qPCR было выявлено 109 положительных, 44 отрицательных и 18 сомнительных по наличию РНК SARS-CoV-2 образцов. Повторный анализ сомнительных образцов позволил отнести их к положительным. Таким образом, по данным qPCR было выявлено 127 положительных на SARS-CoV-2 образцов. Параллельно проводилась оценка образцов в dPCR. Результат считался положительным, если выявлялось $\geq 2,5$ копий/реакция. В 62 негативных и сомнительных образцах, по данным qPCR, с помощью dPCR были дополнительно выявлены 6 положительных образцов и 32 сомнительных. В 6 образцах не было обнаружено РНК копий SARS-CoV-2, либо из-за отсутствия вируса, либо из-за очень низкой вирусной нагрузки в этих образцах.

Таким образом, 44 отрицательных образца по данным qPCR 19 были протестированы с помощью dPCR, при этом, 6 были идентифицированы как положительные и 32 как сомнительные. Все сомнительные образцы были повторно анализированы на присутствие вирусной РНК в qPCR. Поскольку результаты были воспроизводимы, 32 образца были также отнесены к положительным образцам. Таким образом, из 171 у 165 пациентов, чьи образцы прошли положительный тест на SARS-CoV-2, был диагностирован COVID-19. Детекция РНК SARS-CoV-2 в образцах с применением dPCR была значительно более эффективной, и составила 96,5% против 74,3% для qPCR. При этом результаты, полученные методом qPCR, в целом, совпали с результатами dPCR (рис.4). Учитывая данные, полученные нами в сравнительном исследовании qPCR и dPCR, есть основание высказать предположение о том, что приблизительно 20% случаев qPCR не позволяет выявить положительные по SARS-CoV-2 образцы.

Оценка вирусной нагрузки проб от пациентов с COVID-19. Основные проблемы эффективного обнаружения маркеров коронавирусной инфекции связаны с наличием большого количества образцов с низкой вирусной нагрузкой, от 200 до 500 копий/мл. Как правило, это связано с наличием проб от пациентов в инкубаци-

Сравнительная оценка эффективности qPCR и dPCR при тестировании панели образцов (171 образец) от пациентов на наличие РНК SARS-CoV-2

Метод	Результат	Количество образцов	Критерии оценки образцов для qPCR и dPCR (Ct и копий РНК/мл, соответственно)
qPCR	отрицательные	44	$Ct \geq 41$
	сомнительные	18	$Ct 36-40$
	положительные	109	$Ct \leq 35$
dPCR	отрицательные	6	<200 копий/мл
	сомнительные	50	200-500 копий/мл
	положительные	115	>500 копий/мл

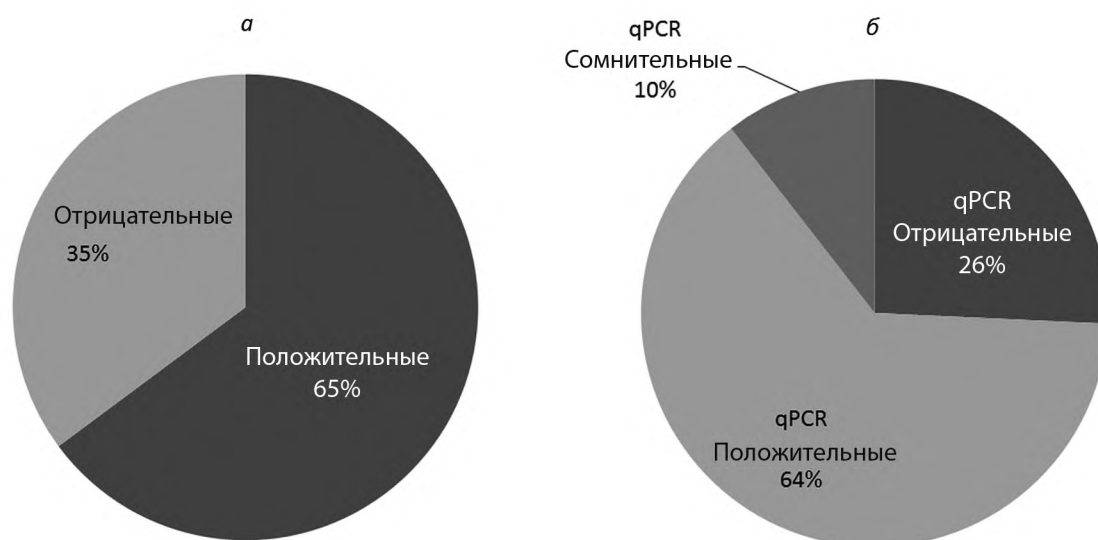


Рис. 4. Данные, полученные методом qPCR для 1328 образцов (за февраль-март 2020 г.) (а) и (б) для выборки образцов (171 образец), взятых параллельно для исследования методом dPCR.

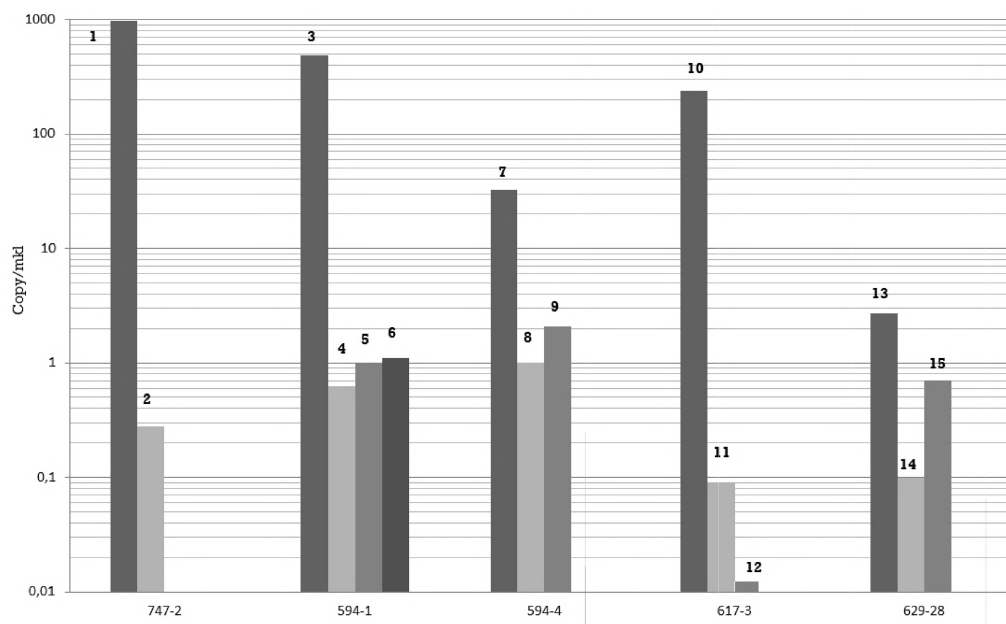


Рис. 5. Содержание РНК SARS-CoV-2 в образцах у больных COVID-19 (копий РНК/мкл.). Даты забора материала: пациент 747-2 (1) 20.03.2020 и (2) 01.04.2020; пациент 594-1 (3) 06.03.2020, (4) 08.03.2020, (5) 11.03.2020 и (6) 13.03.2020; пациент 594-4 (7) 06.03.2020, (8) 08.03.2020 и (9) 16.03.2020; пациент 617-3 (10) 09.03.2020, (11) 11.03.2020 и (12) 13.03.2020, пациент 629-28 (13) 11.03.2020, (14) 14.03.2020 и (15) 16.03.2020.

онном периоде и инapparантными формами COVID-19. Попытки оценить реальное количество таких людей ранее предпринимались в Сингапуре, Тяньцзине и Германии и оно примерно составляло от 44% до 62% исследованных проб [25]. Использование dPCR для тестирования пациентов с COVID-19 показало, что dPCR более чувствителен и может применяться для анализа образцов с низкой вирусной нагрузкой, особенно для пациентов без клинических симптомов [24, 26].

Для определения вирусной нагрузки были использованы носоглоточные мазки от пациентов с COVID-19 на разных стадиях заболевания. Содержание РНК SARS-CoV-2 в образце оценивали по количеству копий РНК в одном микролитре образца (рис. 5). Так, у пациентов

594-1 и 617-3 количество РНК SARS-CoV-2 в носоглоточных мазках уменьшилось более чем в 1000 раз в первые двое суток после выявления COVID-19, и далее сохранялось на протяжении недели на уровне ≥ 1 копии/мкл. У пациентов 594-4 и 629-28, сразу после регистрации COVID-19, количество РНК SARS-CoV-2 в носоглоточных мазках определялось >30 копии / мкл, а затем, в течение двух суток снизилась в 10 раз. У пациента 747-2 через 10 сут после постановки диагноза COVID-19, количество РНК SARS-CoV-2 в носоглоточных мазках определялось $>0,5$ копии/мкл.

Обсуждение. Полученные результаты показали, что в носоглоточных мазках у пациентов с COVID-19 в период проявления клинических симптомов заболевания

наблюдается высокая концентрация РНК SARS-CoV-2, которая составляет более 100 копий/мкл. По мере развития заболевания и в период реконвалесценции вирусная нагрузка резко уменьшалась до >1 копии/мкл. В пробах от пациентов с COVID-19 с бессимптомным течением заболевания также была обнаружена низкая концентрация РНК SARS-CoV-2, которая составляла около 1 копии/мкл.

Низкая вирусная нагрузка у этих групп пациентов может иметь большое значение для проведения лечения и карантинных мероприятий, хотя при этом вероятность инфицирования окружающих, по-видимому, сохраняется [29]. Принято считать, что qPCR, как стандартный метод обнаружения РНК SARS-CoV-2, играет важную роль в раннем выявлении COVID-19 у пациентов [24]. Обнаруженная недостаточная чувствительность метода может быть связана с рядом факторов: особенностями сбора образцов, их транспортировки и хранения, а также технические погрешности постановки ПЦР [27]. Это может быть причиной высокого уровня ложно-отрицательных результатов и для уточнения полученных результатов будет необходимо проведение повторных тестирований. Для его проведения требуется наличие высокочувствительных и точных подтверждающих тестов, что принципиально важно для своевременной и эффективной диагностики COVID-19.

В настоящее время, кроме qPCR, существуют и другие методы, такие как секвенирование следующего поколения (NGS) и обнаружение иммунологических маркеров. Выявление антивирусных IgM и IgG может также быть использовано в качестве подтверждающего метода диагностики COVID-19, вызванного SARS-CoV-2. Применение нескольких методов диагностики позволяет уменьшить количество ложноотрицательных результатов.

Однако диагностика, основанная на выявлении вирусных нуклеиновых кислот, до сих пор считается золотым стандартом. Метод цифровой ПЦР может быть важным подтверждающим тестом, который может значительно улучшить показатель выявляемости пациентов с COVID-19. Полученные результаты по использованию dPCR для детекции РНК SARS-CoV-2 показали, что этот метод особенно подходит для выявления РНК в случае ее низкой концентрации у контактных, а также для мониторинга изменения вирусной нагрузки у выздоравливающих пациентов [30]. Дополнительное преимущество количественного определения РНК SARS-CoV-2 заключается в том, что он позволяет количественно сравнивать результаты, полученные в разные сроки заболевания и в различных лабораториях. Количественная оценка мишеней с помощью dPCR обеспечивает высокое соответствие между различными постановками ПЦР различными операторами [28]. Таким образом, dPCR является методом выбора для оптимального определения вирусной нагрузки у бессимптомных и выздоравливающих пациентов.

Выводы

Разработаны наборы для проведения цифровой ПЦР и ПЦР в реальном времени для детекции генетического материала SARS-CoV-2 в пробах от пациентов, наборы обеспечивают 100% чувствительность и обеспечивают предел детекции в 10^3 ГЭ/мл для qPCR и не менее 200 копий вирусной РНК при проведении цифрового ПЦР.

Выполнена апробация этих методов с помощью панели из 1328 образцов, собранных от пациентов с подтверждением на COVID-19 в начале 2020 г. на территории

РФ. Показано, что dPCR более чувствителен и может быть использован для анализа образцов с низкой вирусной нагрузкой, в том числе от пациентов без клинических симптомов. dPCR значительно повышает точность лабораторного исследования и существенно снижает число ложноотрицательных результатов при диагностике SARS-CoV-2.

Определение концентрации РНК SARS-CoV-2 у пациентов с различным клиническим течением заболевания показало, что концентрация вирусной РНК может резко снижаться в первые дни заболевания. Низкая концентрация вирусной РНК в пробах от пациентов также характерна при бессимптомном течении заболевания. Метод цифровой ПЦР обеспечивает более высокую выявляемость бессимптомных случаев заболевания, которая составляет приблизительно 75% от числа инфицированных, в отличие от 45% выявляемости методом ПЦР в реальном времени.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование было выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2019-1665).

Благодарность. Авторы выражают искреннюю благодарность сотрудникам ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора за оказанную помощь при выполнении данной работы: Семенцову А.О., Карташову М.Ю., Еремееву Л.И., Баяндину Р.Б., Бондаренко Т.Ю., Бодневу С.А., Пьянкову О.В., Походня С.А.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-12, 14-17, 20-30
см. REFERENCES)

13. Сергеева Е.И., Терновой В.А., Агафонов А.П., Сергеев А.Н. Набор олигодезоксирибонуклеотидных праймеров и флуоресцентно меченых зондов для идентификации РНК коронавирусов видов 229E, NL63, OC43, HKU1 методом гибридационной-флуоресцентной обратнo-транскриптазной полимеразной цепной реакции. Патент РФ № 2473702; 2011.
18. Сергеева Е.И., Терновой В.А., Агафонов А.П., Сергеев А.Н. Набор олигодезоксирибонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченого зонда для идентификации РНК коронавируса человека, ассоциированного с тяжелым острым респираторным синдромом. Патент РФ № 2504585; 2012.
19. Сергеева Е.И., Терновой В.А., Демина О.К., Демина А.В., Корнеев Д.В. и др. Разработка и испытание мультиплексной пцр в режиме реального времени для идентификации вирусов, вызывающих острые респираторные инфекции человека. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2013; 4 : 32-7.

REFERENCES

1. Zhu N., Zhang D., Wang W. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382:727-33.
2. Walls A.C., Park Y.J., Tortorici M.A., Wall A., McGuire A.T., Veesler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*. 2020; 181(2):281-92.e6. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.058. Epub 2020 Mar 9.
3. Qiu F., Wang H., Zhang Z., Cao L., Wang C., Wu J., Du Q. Laboratory testing techniques for SARS-CoV-2. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2020; 40(2):164-7. doi: 10.12122/j.issn.1673-4254.2020.02.04.
4. Tao Zhang, Qunfu Wu, Zhigang Zhang. Probable Pangolin Origin of SARS-CoV-2 Associated With the COVID-19 Outbreak. *Curr. Biol.* 2020;30 (7): 1346-51.
5. Hoffmann M., Kleine-Weber H., Pöhlmann S. A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells. *Molecular Cell*. 2020; DOI: 10.1016/j.molcel.2020.04.022.

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

6. Zhai P., Ding Y., Wu X., Long J., Zhong Y., Li Y. The epidemiology, diagnosis and treatment of COVID-19. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2020 May;55(5):105955. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105955. Epub 2020 Mar 28. PMID: 32234468.
7. https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2765837?guestAccessKey=61b73a23-25e1-46bd-96c5-cf0ec847df25&utm_source=twitter&utm_medium=social_jama&utm_term=3324078795&utm_campaign=article_alert&linkId=88064719.
8. Quan P.-L., Sauzade M., Brouzes E. dPCR: A Technology Review Sensors (Basel). 2018 Apr; 18(4): 1271. Published online 2018 Apr 20. doi: 10.3390/s18041271.
9. Hindson B.J., Ness K.D., Masquelier D.A., Belgrader P., Heredia N.J., Makarewicz A.J. et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal. Chem*. 2011;83: 8604-10.
10. Hindson C.M., Chevillet J.R., Briggs H.A., Gallichotte E.N., Ruf I.K., Hindson B.J. et al. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nature methods*. 2013;10:1003-5.
11. Vogelstein B., Kinzler K.W. Digital pcr. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 1999; 96:9236-41.
12. Dingle T.C., Sedlak R.H., Cook L., Jerome K.R. Tolerance of droplet-digital PCR VS real-time quantitative PCR to inhibitory substances. *Clinical chemistry*. 2013;59:1668-70.
13. Sergeeva E.I., Ternovoi V.A., Agafonov A.P., Sergeev A.N. A set of oligodeoxyribonucleotide primers and fluorescently labeled probes for the identification of RNA of coronaviruses 229E, NL63, OC43, HKU1 by hybridization-fluorescent reverse transcriptase polymerase chain reaction. Patent RF № 2473702; 2011. (in Russian)
14. Li Y.C., Bai W.Z., Hashikawa T. The neuroinvasive potential of SARS-CoV2 may play a role in the respiratory failure of COVID-19 patients. *J. Med. Virol*. 2020 Jun; 92(6):552-5. doi: 10.1002/jmv.25728. Epub 2020 Mar 11.
15. Madabhavi I., Sarkar M., Kadakol N. COVID-19: a review. *Monaldi Arch. Chest. Dis*. 2020 May 14; 90(2). doi: 10.4081/monaldi.2020.1298. PMID: 32498503.
16. Singhal T. A Review of Coronavirus Disease-2019 (COVID-19). *Indian J. Pediatr*. 2020 Apr;87(4):281-6. doi: 10.1007/s12098-020-03263-6. Epub 2020 Mar 13. PMID: 32166607.
17. Tian S., Hu W., Niu L., Liu H., Xu H., Xiao S.Y. Pulmonary Pathology of Early-Phase 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) Pneumonia in Two Patients With Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol*. 2020 May;15(5):700-4. doi: 10.1016/j.jtho.2020.02.010. Epub 2020 Feb 28. PMID: 32114094.
18. Sergeeva E.I., Ternovoy V.A., Agafonov A.P., Sergeev A.N. A set of oligodeoxyribonucleotide primers and a fluorescent-labeled probe for the identification of RNA of human coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. Patent RF № 2504585; 2012. (in Russian)
19. Sergeeva E.I., Ternovoy V.A., Demina O.K., Demina A.V., Korneev D.V. et al. Development and verification of real-time PCR assay for identification of viral agents causing acute respiratory infections in human beings. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2013 October; 28(4): 32-7. DOI: 10.3103/S0891416813040083. (in Russian)
20. Wu Y., Strain M.C., Lada S.M., Luong T., Rought S.E., Gianella S., et al. Highly precise measurement of HIV DNA by droplet digital PCR. *PLoS ONE*. 2013; 8:e55943.
21. Daniel W.T., Kristian L. M.D., Marina K., David A.A., Patricia E.G., Robert L.J. et al. Protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline. CLSI EP17-A; 24(34).
22. Huggett J.F., Foy C.A., Benes V., Emslie K, Garson J.A., Haynes R. et al. The digital MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments. *Clinical Chemistry*. 2013;59:892-902.
23. Weaver S., Dube S., Mir A., Qin J., Sun G., Ramakrishnan R. Taking qPCR to a higher level: Analysis of CNV reveals the power of high throughput qPCR to enhance quantitative resolution. *Methods*. 2010;50:271-6.
24. He X., Lau E.H.Y., Wu P., Deng X., Wang J., Hao X., et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat. Med.* (2020). <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0869-5>
25. Yang Y., Yang M., Shen C., Wang F., Yuan J., Li J. et al. Evaluating the accuracy of different respiratory specimens in the laboratory diagnosis and monitoring the viral shedding of 2019-nCoV infections. *MedRxiv* 2020.02.11.20021493. <https://doi.org/10.1101/2020.02.11.20021493>.
26. Rothe C., Schunk M., Sothmann P., Bretzel G., Froeschl G., Wallrauch C., et al. Transmission of 2019-nCoV Infection 245 from an Asymptomatic Contact in Germany. *N. Engl. J. Med*. 2020. DOI: 10.1056/NEJMc2001468.
27. Lianhua Dong, Junbo Zhou, Chunyan Niu, Quanyi Wang, Yang Pan, Xia Wang et al. Highly accurate and sensitive diagnostic detection of SARS-CoV-2 by digital PCR. *medRxiv* 2020.03.14.20036129; DOI: 10.1101/2020.03.14.20036129.
28. Ai T., Yang Z., Hou H., Zhan C., Chen C., Lv W. et al. Correlation of chest Ct and RT-PCR testing in coronavirus disease 2019 (COVID-19) in China: A report of 1014 cases. *Radiology*. 2020:200642.
29. Whale A.S., Jones G.M., Jernej P., Dreo T., Redshaw N., Akyürek S. et al. Assessment of digital PCR as a primary reference measurement procedure to support advances in precision medicine. *Clinical Chemistry*. 2018;64:1296-307.
30. Lauer S.A., Grantz K.H., Bi Q., Jones F.K., Zheng Q., Meredith H.R. et al. The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application. *Ann. Intern. Med*. 2020 May 5;172(9): 577-82. doi: 10.7326/M20-0504. Epub 2020 Mar 10.

Поступила 07.08.20

Принята к печати 31.08.20

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Тороповский А.Н.¹, Павлова О.Н.¹, Викторов Д.А.¹, Никитин А.Г.¹, Масляков В.В.²

РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЯ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ТЕСТ-KRAS-ТКАНЬ *IN VITRO* ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОКАЗАНИЙ К ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ У ПАЦИЕНТОВ С ДИАГНОЗОМ КОЛОРЕКТАЛЬНЫЙ РАК

¹ООО «ТестГен», 432072, г. Ульяновск, Россия;

²Частное УОО ВО «Саратовский медицинский университет» «Реавиз», 410012, Саратов, Россия

Целью работы является проверка функциональных свойств и эффективности набора реагентов для определения статуса мутаций гена KRAS методом ПЦР-РВ в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани (Тест-KRAS-ткань) по ТУ 21.20.23-006-97638376-2016 для внедрения его в клиничко-лабораторную практику с целью определения показаний к таргетной терапии препаратами на основе анти-EGFR моноклональных антител у пациентов с диагнозом «колоректальный рак» с диким типом гена KRAS.

На базе ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА» с 18 июля по 21 августа 2018 г. были проведены испытания медицинского изделия для диагностики *in vitro* «Набор реагентов для определения статуса мутаций гена KRAS методом ПЦР-РВ в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани (Тест-KRAS-ткань) по ТУ 21.20.23-006-97638376-2016» производства ООО «ТестГен».

В качестве субъектов клинического испытания было использовано 44 образца фиксированной в парафине ткани от пациентов с диагнозом «колоректальный рак». В ходе проведения клинических испытаний было проанализировано 44 образца фиксированной в парафине ткани в двух сериях экспериментов, то есть проведено 88 клиничко-лабораторных опытов, из которых 48 опытов с образцами геномной ДНК с установленным отрицательным статусом наличия мутаций гена KRAS и 40 опытов с образцами геномной ДНК с установленным положительным статусом наличия мутаций гена KRAS. Анализ и оценка результатов проведенных клиничко-лабораторных испытаний медицинского изделия «Набор реагентов для определения статуса мутаций гена KRAS методом ПЦР-РВ в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани (Тест-KRAS-ткань) по ТУ 21.20.23-006-97638376-2016» подтвердили, что оно позволяет проводить качественное определение статуса шести мутаций двенадцатого кодона (Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Arg, Gly12Val, Gly12Ser, Gly12Cys) и одной мутации тринадцатого кодона (Gly13Asp) гена KRAS методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани, с высокими показателями диагностической чувствительности 90,9% и диагностической специфичности 95,0% с достоверной вероятностью 90%. Воспроизводимость результатов 100%, что подтверждает высокую надежность набора.

Ключевые слова: колоректальный рак; ген KRAS; метод ПЦР-РВ, EGFR.

Для цитирования: Тороповский А.Н., Павлова О.Н., Викторов Д.А., Никитин А.Г., Масляков В.В. Результаты испытания набора реагентов тест-KRAS-ткань *in vitro* для определения показаний к таргетной терапии у пациентов с диагнозом колоректальный рак. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65(12): 793-800. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-793-800>

Toropovskiy A.N.¹, Pavlova O.N.¹, Viktorov D.A.¹, Nikitin A.G.¹, Maslyakov V.V.²

RESULTS OF *IN VITRO* TEST-KRAS-TISSUE REAGENT KIT TEST TO DETERMINE INDICATIONS FOR TARGET THERAPY OF PATIENTS DIAGNOSED WITH COLORECTAL CANCER

¹ООО «ТестГен», 432072, Ulyanovsk, 432072, Russia;

²Private institution educational organization of higher education «Saratov Medical University» «Reaviz», 410012, Saratov, Russia

As subjects of the clinical trial, 44 samples of paraffin-fixed tissue were used from patients diagnosed with "colorectal cancer." In the course of clinical trials, 44 samples of paraffin-fixed tissue were analyzed in two series of experiments, that is, 88 clinical-laboratory experiments were carried out, of which 48 experiments with genomic DNA samples with the established negative status of the presence of KRAS gene mutations and 40 experiments with genomic DNA samples with the established positive status of the presence of KRAS gene mutations.

Analysis and evaluation of the results of clinical laboratory tests of the medical product "Kit of Reagents for Determination of the Status of KRAS Gene Mutations by PCR-RV Method in a Sample of Human Genomic DNA from Samples of Paraffin-Fixed Tissue (Test-KRAS-tissue) according to TU 21.20.23-006-97638376-2016" confirmed that it allows to carry out qualitative determination of the status of six mutations of the twelfth codon (Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Arg, Gly12Val, Gly12Ser, Gly12Cys) and one mutation of the thirteenth codon (Gly13Asp) the KRAS gene by real-time allele-specific PCR in human genomic DNA sample from paraffin-fixed tissue samples, with high diagnostic sensitivity rates of 90.9% and diagnostic specificity of 95.0% with a confidence probability of 90%. Reproducibility of results is 100%, which confirms the high reliability of the set.

Key words: colorectal cancer; KRAS gene; PCR-RV method; EGFR.

For citation: Toropovskiy A.N., Pavlova O.N., Viktorov D.A., Nikitin A.G., Maslyakov V.V. Results of *in vitro* test-KRAS-tissue reagent kit test to determine indications for target therapy of patients diagnosed with colorectal cancer. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65(12): 793-800. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-12-793-800>

For correspondence: Pavlova Olga Nikolaevna, doctor of biological sciences, assistant professor, research associate, e-mail: casiopeya13@mail.ru

Information about authors:

Toropovskiy A.N., ORCID: <https://0000-0001-9779-5708>;
Pavlova O.N., ORCID: <https://0000-0002-8055-1958>;
Viktorov D.A., ORCID: <https://0000-0002-4012-875X>;
Nikitin A.G., ORCID: <https://0000-0001-9762-3383>;
Maslyakov V.V., ORCID: <https://0000-0002-0052-9401>.

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

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

Received 16.03.2020
Accepted 15.05.2020

Колоректальный рак (КРР) является одним из самых распространенных злокачественных новообразований у человека и занимает 3-е место по заболеваемости как у мужчин, так и у женщин. Среди вариантов колоректального рака наиболее встречаемым и смертоносным является рак толстой кишки (РТК), так как это заболевание может значительное время протекать бессимптомно и, как следствие, у каждого третьего больного на момент установления диагноза отмечается генерализация опухолевого процесса. Высокая смертность при РТК объясняется частым метастазированием опухоли, в основном в печень и легкие, нередко даже на первых стадиях заболевания [1].

Проведенный анализ литературы показывает, что пусковым механизмом онкогенеза большинства новообразований толстой кишки являются нарушения генетического аппарата клетки. Рак толстой кишки (РТК) представляет собой гетерогенную группу опухолей, отличающихся как механизмами канцерогенеза и, следовательно, молекулярными изменениями, так и прогнозом течения болезни, и особенностями терапии. Уже сейчас для выбора тактики лечения необходимо учитывать не только клинические факторы, такие как распространение опухоли, функциональный статус пациента, но и молекулярный профиль заболевания.

Процессы жизнедеятельности раковых клеток во многом зависят от продукции ростовых факторов и их рецепторов. Одним из таковых является эпидермальный фактор роста (EGFR), представляющий собой тирозинкиназный рецептор мембран клеток. В норме связывание лигандов EGFR и трансформирующего фактора роста альфа (TGF α) индуцирует активацию рецепторов, что запускает ERK и PI3K сигнальные пути, контролируемые клеточную пролиферацию, миграцию, инвазию и множество других процессов. Установлено, что в 80% случаев колоректальный рак возникает в результате гиперэкспрессии EGFR, которая приводит к усиленному росту и делению клеток опухоли вследствие гиперактивации RAS-RAF-МЕК-ERK сигнального каскада. Этот каскад является путем, который регулирует клеточную пролиферацию, клеточный цикл и миграцию клетки. При развитии рака у человека мутации семейства RAS/RAF наиболее часто являются причиной нарушения регуляции трансдукции сигнала через этот путь

KRAS является геном, кодирующим один из белков, играющих важную роль в сигнальной системе рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), а также регулирует белки, находящиеся далее в сигнальной системе EGFR, которые связаны с выживаемостью опухоли, ангиогенезом, пролиферацией и метастазированием [2].

При метастатическом колоректальном раке почти 60% пациентов имеют нормальную сигнальную систему EGFR и дикий тип гена KRAS; остальные 40 % имеют мутантный тип гена [3].

Мутации в гене KRAS в опухолях толстой кишки встречаются в 30-60% случаев. Наиболее часто мутации KRAS определяются в экзоне 2, кодонах 12 и 13 [4].

Хирургическое лечение КРР играет главную роль в излечении больных, однако пациенты с III стадией рака нуждаются в адъювантной химиотерапии (АХТ). Таргетная терапия, по сравнению с конвенциональной химиотерапией, имеет ряд преимуществ: индивидуализация назначения, более низкая токсичность, таблетированные формы большинства препаратов исключают необходимость госпитализации и позволяют больным радикально не менять образ жизни.

В качестве основных мишеней целенаправленной терапии могут выступать многочисленные элементы сигнальных путей, связанные с регуляцией клеточного цикла и апоптоза, нарушение которых ассоциировано со злокачественным ростом. Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), или HER1, – трансмембранный гликопротеин с молекулярной массой 170 kD, обладающий тирозинкиназной активностью, является наиболее хорошо изученной мишенью.

Основные механизмы активации EGFR-зависимых сигнальных путей в опухолевых клетках обеспечиваются: мутацией тирозинкиназного домена гена EGFR и, как следствие этого, его аутоактивацией при отсутствии факторов роста, приводящей к неконтролируемой пролиферации; гиперэкспрессией EGFR; избыточной продукцией факторов роста – лигандов EGFR (TGF- α , EGF) [4].

Существует несколько вариантов блокирования онкогенного эффекта, реализуемого через активированный EGFR: 1) использование низкомолекулярных ингибиторов, способных воздействовать на внутриклеточный, несущий мутацию домен EGFR, и прерывать процесс тирозинкиназного фосфорилирования; 2) применение рекомбинантных пептидных лигандов EGF и/или TGF- α , конъюгированных с проникающими внутрь клетки цитотоксинами; 3) использование моноклональных антител, связывающих экстрацеллюлярный участок рецептора или образующих неактивный комплекс с его лигандами EGF и TGF- α . В настоящее время к клиническому применению разрешены 9 ингибиторов передачи сигнала в клетки (иматиниб, сунитиниб, сорафениб, лапатиниб, гефитиниб, эрлотиниб, дазатиниб, нилотиниб, пазопаниб) и 5 моноклональных антител (трастузумаб, ритуксимаб, бевацизумаб, цетуксимаб, панитумумаб) [5].

Связывание антител с EGFR приводит к угнетению инвазии опухолевых клеток в нормальные ткани, препятствуя распространению опухоли в другие органы. У пациентов с диким типом гена KRAS определяют агрессивное поведение опухоли: КРР развивается в кратчайшие сроки, быстро метастазирует и плохо поддается химиотерапии. В случае мутации белок KRAS постоянно передает сигналы к делению, причем его состояние уже

не зависит от статуса белков-регуляторов, в частности EGFR. Соответственно, скорость деления подобных опухолей остается неизменной даже при терапевтической инактивации EGFR, поэтому эта разновидность карцином толстой кишки оказывается практически нечувствительной к анти-EGFR антителам. Именно поэтому все регистрационные документы по использованию таких препаратов, как цетуксимаб и панитумумаб требуют обязательного определения мутационного статуса KRAS; антитела к EGFR не могут назначаться пациентам с наличием мутации или неизвестным статусом KRAS.

Таким образом, рекомендуется обязательно определять мутации в гене KRAS у всех больных метастатическим КРР для решения вопроса об анти-EGFR терапии.

В настоящее время для обнаружения мутаций в опухолях толстой кишки применяется ПЦР-амплификация анализируемого участка с последующей детекцией аномалий различными методами: секвенирование, анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ), анализ одноцепочечного конформационного полиморфизма (SSCP, Single-strand conformation polymorphism analysis), гибридизация с аллельспецифическими олигонуклеотидами, плавление высокого разрешения (HRM), аллель-специфическая ПЦР в режиме реального времени (ас-рв-ПЦР) и другие. У каждого из этих методов существуют как преимущества, так и недостатки. Так, преимуществом методов секвенирования является их способность выявлять все возможные точечные мутации и невысокая стоимость. Ограничение секвенирования заключается в недостаточной чувствительности: 5-10% мутантных аллелей KRAS на фоне последовательностей ДНК дикого типа для пиросеквенирования и от 10 до 30 % мутантных аллелей – для секвенирования по Сэнгеру. Преимуществом ас-рв-ПЦР является наличие закрытой системы, предохраняющей от контаминации, и высокая чувствительность, выявляющая до 1 % мутантных аллелей на фоне ДНК дикого типа. Недостатками ас-рв-ПЦР являются трудоемкость оптимизации аллель-специфических реакций и способность обнаруживать только выбранные мутации.

Компанией «ТестГен» разработан «Набор реагентов для определения статуса мутаций гена KRAS методом ПЦР-РВ в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани (Тест-KRAS-ткань) по ТУ 21.20.23-006-97638376-2016», предназначенный для профессионального применения в медицинских организациях и клинико-диагностических лабораториях онкологического профиля, для определения показаний к таргетной терапии препаратами на основе анти-EGFR моноклональных антител у пациентов с диагнозом «колоректальный рак» с диким типом гена KRAS.

Целевой анализ – ген KRAS, исследуемый при обследовании пациентов с диагнозом «колоректальный рак» для качественного определения статуса шести мутаций двенадцатого кодона (Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Arg, Gly12Val, Gly12Ser, Gly12Cys) и одной мутации тринадцатого кодона (Gly13Asp) исследуемого гена KRAS для определения показаний к таргетной терапии препаратами на основе анти-EGFR моноклональных антител у пациентов с диагнозом «колоректальный рак» с диким типом гена KRAS.

Таким образом, целью работы являлась проверка функциональных свойств и эффективности набора реагентов для определения статуса мутаций гена KRAS

методом ПЦР-РВ в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани (Тест-KRAS-ткань) по ТУ 21.20.23-006-97638376-2016 для внедрения его в клинико-лабораторную практику с целью определения показаний к таргетной терапии препаратами на основе анти-EGFR моноклональных антител у пациентов с диагнозом «колоректальный рак» с диким типом гена KRAS.

Для реализации поставленной цели предстояло решить следующие задачи:

- изучить соответствие набора реагентов своему назначению;
- определить эффективность медицинского изделия для диагностики *in vitro* в соответствии с предназначенным производителем применением медицинского изделия по назначению;
- определить качество набора реагентов, эффективность и безопасность его применения.

Материал и методы. Клинические испытания медицинского изделия для диагностики *in vitro* «Набор реагентов для определения статуса мутаций гена KRAS методом ПЦР-РВ в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани (Тест-KRAS-ткань) по ТУ 21.20.23-006-97638376-2016» производства ООО «ТестГен» проводились с 18.07. по 21.08. 2018 г. на базе ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ ФНКЦ ФМБА России) в соответствии с приказом Минздрава РФ от 09.01.2014 г. № 2н.

Набор реагентов «Тест-KRAS-ткань» предназначен для профессионального применения в медицинских учреждениях и клинико-диагностических лабораториях онкологического профиля для качественного определения статуса шести мутаций двенадцатого кодона (Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Arg, Gly12Val, Gly12Ser, Gly12Cys) и одной мутации тринадцатого кодона (Gly13Asp) гена KRAS методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани для определения показаний к таргетной терапии препаратами на основе анти-EGFR моноклональных антител у пациентов с диагнозом «колоректальный рак» с диким типом гена KRAS.

Специфичность анализа данным набором реагентов определяется олигонуклеотидными затравками (прайм-мерами), подобранными к гомологичным участкам генов, а также специфичными флуоресцентными олигонуклеотидными зондами для гибридизации с комплементарными участками ампликонов (специфических продуктов ампликации), что исключает перекрестные реакции. Общее время проведения анализа составляет 2-2,5 часа.

Аналитические характеристики набора приведены в табл. 1.

Список определяемых мутаций с указанием ID мутации представлен в табл. 2.

В качестве субъектов клинического испытания было использовано 44 образца фиксированной в парафине ткани от пациентов с диагнозом «колоректальный рак». Образцы фиксированной в парафине ткани (FFPE-блоки) были получены из банка остаточных аликвот фиксированных в парафине тканей, сформированного в процессе рутинной лечебно-диагностической практики ФГБУ ФНКЦ ФМБА России.

Аналитические характеристики набора реагентов «Тест-KRAS-ткань»

Аналитическая специфичность	Специфичен по отношению к шести мутациям двенадцатого кодона (Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Arg, Gly12Val, Gly12Ser, Gly12Cys) и одной мутации тринадцатого кодона (Gly13Asp) гена <i>KRAS</i>
Аналитическая чувствительность	10 копий гена <i>KRAS</i> в 1 мкл раствора ДНК

Таблица 2

Список определяемых мутаций с указанием ID мутации

Набор мутаций, определяемых с помощью «Тест-KRAS-ткань»	Изменения в нуклеотидах	Изменения в аминокислотах	COSMIC ID*
Gly12Asp	c.35G>A	p.G12D	521
Gly12Ala	c.35G>C	p.G12A	522
Gly12Arg	c.34G>C	p.G12R	518
Gly12Val	c.35G>T	p.G12V	520
Gly12Ser	c.34G>A	p.G12S	517
Gly12Cys	c.34G>T	p.G12C	516
Gly13Asp	c.38G>A	p.G13D	532

Примечание. * – идентификационный номер мутации согласно международной базе соматических мутаций при раковых заболеваниях COSMIC (Catalog of Somatic Mutations in Cancer).

Для данных пациентов статус мутаций гена *KRAS* был известен и установлен на образцах фиксированных в парафине тканей до проведения клинических испытаний регистрируемого медицинского изделия в ходе лечебно-диагностического процесса с помощью зарегистрированного Набора реагентов для определения соматических мутаций в гене *KRAS* «KRAS RGQ PCR Kit (24)» на 24 образца, производства «Киagen Манчестер Лимитед» (Великобритания), регистрационное удостоверение № ФСЗ 2012/12826 от 05.09.2012.

В 24 предоставленных образцах у пациентов мутантная ДНК гена *KRAS* не обнаружена набором реагентов «KRAS RGQ PCR Kit (24)» и в 20 образцах – обнаружена.

Из каждого образца ткани, из банка остаточных аликвот, пациентов с установленным статусом мутаций гена *KRAS* было проведено 2 процедуры выделения геномной ДНК, которые были проанализированы с помощью набора реагентов «Тест-KRAS-ткань» в двух сериях экспериментов:

1. В образцах ткани под номерами 1-24 статус мутаций гена *KRAS* был установлен с помощью набора реагентов «Тест-KRAS-ткань» LOT: 201806-95 и LOT: 201806-97;

2. В образцах под номерами 25-44 с помощью набора реагентов «Тест-KRAS-ткань» LOT: 201806-96 и LOT: 201806-98.

Выделение геномной ДНК человека из образцов ткани было проведено с помощью набора реагентов для экстракции ДНК из биологического материала и определения фрагментации ДНК (IsoFrag-DNA-FFPE) по ТУ 9398-001-7706721254-2011 (ЗАО «Протеинсинтез», Россия, регистрационное удостоверение № ФСЗ 2011/12189 от 13.11.2017).

Полученная ДНК должна храниться при температуре от 2°C до 8°C и использоваться для анализа в течение 24 часов. Для хранения более 24 ч раствор ДНК рекомендуется хранить при температуре -20°C.

Для определения соматических мутаций в гене *KRAS* с помощью зарегистрированного набора реагентов

«KRAS RGQ PCR Kit (24)» при обследовании пациентов с диагнозом «колоректальный рак» в ходе лечебно-диагностического процесса ФГБУ ФНКЦ ФМБА России был использован прибор для проведения ПЦР в режиме реального времени Rotor-Gene Q серии 5plex HRM.

Таким образом, в ходе проведения клинических испытаний было проанализировано 44 образца фиксированной в парафине ткани (FFPE-блоки) в двух сериях экспериментов, то есть проведено 88 клинико-лабораторных опытов, из которых 48 опытов с образцами геномной ДНК с установленным отрицательным статусом наличия мутаций гена *KRAS* и 40 опытов с образцами геномной ДНК с установленным положительным статусом наличия мутаций гена *KRAS*.

В случае расхождения данных наборов «Тест-KRAS-ткань» и «KRAS RGQ PCR Kit (24)» образцы повторно тестировали методом секвенирования по Сэнгеру с помощью генетического анализатора (секвенатора) Applied Biosystems 3500 Dx, производства «Life Technologies Corporation» (США) (№ ФСЗ 2011/09862 от 25.01.2017 г.), используя те же праймеры, что и при ПЦР-аплификации.

Свидетельством правильности работы исследуемых медицинских изделий явилось совпадение результатов.

Критерии включения субъектов испытаний:

- образцы фиксированной в парафине ткани от пациентов с диагнозом «колоректальный рак».

Критерии исключения:

- анализируемый материал не подлежит использованию при нарушении условий хранения и транспортировки (температура, продолжительность, многократное замораживание-оттаивание). Анализируемая ДНК должна храниться при температуре от 2°C до 8°C и использоваться для анализа в течение 24 часов. Для хранения более 24 ч раствор ДНК рекомендуется хранить при температуре -20°C.

- чистота анализируемой ДНК, выраженная в отношении оптических плотностей (A260/280nm), необходимая для проведения исследования, должна составлять не менее 1,4.

- концентрация ДНК, достаточная для проведения исследования должна составлять 1-100 нг/мкл.

- не допускается использование образцов, загрязнённых посторонним биологическим материалом.

- для анализа необходимо использовать пробы геномной ДНК, выделенные из ткани опухоли, подтвержденной гистологически.

Количество образцов выбрано исходя из наличия образцов в банке остаточных аликвот ткани в процессе рутинной лечебно-диагностической практики ФГБУ ФНКЦ ФМБА России.

Качественное определение статуса шести мутаций двенадцатого кодона (Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Arg, Gly12Val, Gly12Ser, Gly12Cys) и одной мутации тринадцатого кодона (Gly13Asp) гена *KRAS* методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани включает в себя три этапа:

1) подготовку ПЦР;
2) ПЦР-амплификацию ДНК и гибридизационно-флуоресцентную детекцию продуктов амплификации в режиме «реального времени»;

3) интерпретацию результатов.

С пробами геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани проводятся реакции амплификации участков гена *KRAS* в реакционном буфере при помощи специфичных к этим участкам ДНК праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси для амплификации присутствуют аллель-специфичные флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени и разрушаются Taq-полимеразой, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

По каналу, соответствующему флуорофору HEX, детектируется продукт амплификации ДНК нормального варианта гена *KRAS*, по каналу, соответствующему флуорофору FAM, детектируется продукт амплификации ДНК мутантных вариантов гена *KRAS*.

Для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» использовали амплификатор планшетного типа «ДТпрайм» («ДНК – Технология», Россия)

Далее провели анализ кривых накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам:

– по каналу FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продуктов амплификации ДНК мутантных вариантов гена *KRAS*.

– по каналу HEX регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продуктов амплификации ДНК нормальных вариантов гена *KRAS* (выступает в качестве внутреннего контрольного образца – ВКО).

Результаты интерпретируются на основании наличия или отсутствия пересечения кривой флуоресценции пороговой линии.

Полученные результаты интерпретировали на основании данных об уровне флуоресцентного сигнала относительно фона по соответствующим каналам для контрольных образцов и проб ДНК, выделенных из исследуемых образцов. Интерпретация производилась с помощью программного обеспечения используемого амплификатора «ДТпрайм» («ДНК – Технология», Россия).

После проведения анализа предоставленными образцами набора реагентов «Тест-KRAS-ткань» и интерпретации результатов, полученные данные сравнивались с результатами ПЦР, проведенных в ходе лечебно-диагностического процесса с помощью Набора реагентов для определения соматических мутаций в гене *KRAS* «KRAS RGQ PCR Kit (24)» на 24 образца, производства «Киаген Манчестер Лимитед» (Великобритания), регистрационное удостоверение № ФСЗ 2012/12826 от 05.09.2012, по стандартной методике производителя.

В случае расхождения данных «Тест-KRAS-ткань» и «KRAS RGQ PCR Kit (24)» образцы были повторно протестированы методом секвенирования по Сэнгеру с помощью генетического анализатора (секвенатора) Applied Biosystems 3500 Dx, производства «Life Technologies Corporation» (США) (№ ФСЗ 2011/09862 от

25.01.2017 г.) используя те же праймеры, что и при ПЦР-амплификации.

Для расчёта диагностической чувствительности и диагностической специфичности исследуемого набора использовали формулы, приведенные в п.5.5 ГОСТ Р 53022.3-2008 «Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов»:

Истинноположительные

$$\text{Чувствительность} = \frac{\text{Истинноположительные}}{\text{Истинноположительные} + \text{Ложноотрицательные}} \times 100 \% . (1)$$

Истинноотрицательные

$$\text{Специфичность} = \frac{\text{Истинноотрицательные}}{\text{Истинноотрицательные} + \text{Ложноположительные}} \times 100 \% . (2)$$

Истинноположительные

Оценку результатов исследований проводили согласно Приложению В «Методических рекомендаций по порядку проведения экспертизы качества, эффективности и безопасности медицинских изделий для государственной регистрации», одобренных научно-экспертным советом ФГБУ «ВНИИИМТ» Росздравнадзора 27.07.16 г.

Также была проведена статистическая обработка результатов исследования.

Результаты и обсуждение. При исследовании образцов каждая серия экспериментов сопровождается постановкой амплификации с контрольными образцами. Результат ПЦР-исследования считается достоверным, при прохождении реакций «Gly12Asp», «Gly12Ala», «Gly12Arg», «Gly12Val», «Gly12Ser», «Gly12Cys» и «Gly13Asp» в пробирках с соответствующими положительными контрольными образцами (ПКО) по каналам FAM и HEX не позднее 35 цикла. Правильные результаты для отрицательных контрольных образцов (ОКО) – отсутствие роста сигнала флуоресценции в реакциях «Gly12Asp», «Gly12Ala», «Gly12Arg», «Gly12Val», «Gly12Ser», «Gly12Cys» и «Gly13Asp» с ОКО по каналам FAM и HEX.

Сводные результаты клинических испытаний представленных образцов медицинского изделия в сравнении с результатами ПЦР, проведенных с помощью зарегистрированного медицинского изделия, Набора реагентов для определения соматических мутаций в гене *KRAS* «KRAS RGQ PCR Kit (24)» на 24 образца, производства «Киаген Манчестер Лимитед» (Великобритания), регистрационное удостоверение № ФСЗ 2012/12826 от 05.09.2012 г., приведены в табл. 3.

В ходе проведения клинических испытаний было проанализировано 88 образцов фиксированной в парафине ткани и был выявлен 1 ложноотрицательный результат. Образец №15, мутация в котором не была обнаружена с помощью набора «Тест- KRAS -ткань» (LOT: 201806-95), был повторно протестирован и подтверждено наличие определяемой мутации Gly12Asp методом секвенирования по Сэнгеру с помощью генетического анализатора (секвенатора) Applied Biosystems 3500 Dx, производства «Life Technologies Corporation» (США) (№ ФСЗ 2011/09862 от 25.01.2017 г.) используя те же праймеры, что и при ПЦР-амплификации. Результаты тестирования приведены в табл. 4.

Ложноотрицательный результат, полученный с помощью набора реагентов «Тест-KRAS-ткань» для клинического образца №15, может быть связан с несоответствующим качеством выделенной ДНК.

Ложноположительных результатов в ходе проведения клинических испытаний не выявлено.

По результатам проведенных клинических испытаний в серии из 40 опытов с образцами геномной ДНК

Сводные результаты клинических испытаний наборов реагентов «Тест-KRAS-ткань» и «KRAS RGQ PCR Kit (24)»

Образец	«Тест-KRAS-ткань», LOT: 201806-95	«Тест-KRAS-ткань», LOT: 201806-96	«Тест-KRAS-ткань», LOT: 201806-97	«Тест-KRAS-ткань», LOT: 201806-98	Статус мутаций в гене KRAS, установленный набором «KRAS RGQ PCR Kit (24)»	Совпадение/ не совпадение
1	Gly12Ser		Gly12Ser		Gly12Ser	совпадение
2	-		-		-	совпадение
3	-		-		-	совпадение
4	-		-		-	совпадение
5	Gly12Asp		Gly12Asp		Gly12Asp	совпадение
6	-		-		-	совпадение
7	-		-		-	совпадение
8	Gly13Asp		Gly13Asp		Gly13Asp	совпадение
9	Gly12Val		Gly12Val		Gly12Val	совпадение
10	-		-		-	совпадение
11	-		-		-	совпадение
12	Gly12Ala		Gly12Ala		Gly12Ala	совпадение
13	Gly12Asp		Gly12Asp		Gly12Asp	совпадение
14	-		-		-	совпадение
15	-		Gly12Asp		Gly12Asp	не совпадение
16	Gly12Arg		Gly12Arg		Gly12Arg	совпадение
17	-		-		-	совпадение
18	-		-		-	совпадение
19	Gly13Asp		Gly13Asp		Gly13Asp	совпадение
20	-		-		-	совпадение
21	-		-		-	совпадение
22	Gly12Cys		Gly12Cys		Gly12Cys	совпадение
23	-		-		-	совпадение
24	Gly12Arg		Gly12Arg		Gly12Arg	совпадение
25	-		-		-	совпадение
26		Gly12Val		Gly12Val	Gly12Val	совпадение
27		-		-	-	совпадение
28		-		-	-	совпадение
29		Gly12Cys		Gly12Cys	Gly12Cys	совпадение
30		Gly12Ala		Gly12Ala	Gly12Ala	совпадение
31		-		-	-	совпадение
32		Gly13Asp		Gly13Asp	Gly13Asp	совпадение
33		Gly12Asp		Gly12Asp	Gly12Asp	совпадение
34		-		-	-	совпадение
35		Gly12Arg		Gly12Arg	Gly12Arg	совпадение
36		-		-	-	совпадение
37		-		-	-	совпадение
38		Gly12Ala		Gly12Ala	Gly12Ala	совпадение
39		-		-	-	совпадение
40		-		-	-	совпадение
41		Gly12Cys		Gly12Cys	Gly12Cys	совпадение
42		-		-	-	совпадение
43		-		-	-	совпадение
44		Gly12Asp		Gly12Asp	Gly12Asp	совпадение

Таблица 4

Результаты определения статуса мутаций гена KRAS в образце с ложноотрицательным результатом

№ образца	Методы исследования		
	Набор реагентов «Тест- KRAS -ткань» LOT: 201806-95	«KRAS RGQ PCR Kit (24)»	Секвенирование
15	-	Gly12Asp	Gly12Asp

с установленным положительным статусом наличия мутаций гена KRAS регистрируемое медицинское изделие показало 39 истинноположительных результатов, 1 ложноотрицательный результат. Выявление ложноотри-

цательного результата может быть связано с несоответствующим качеством выделенной ДНК.

По результатам проведенных клинических испытаний в серии из 48 опытов с образцами геномной ДНК с установленным отрицательным статусом наличия мутаций гена KRAS регистрируемое медицинское изделие показало 48 истинноотрицательных результатов. Ложноположительных результатов в ходе проведения клинических испытаний не выявлено.

По результатам статистической обработки полученных характеристик эффективности с доверительной вероятностью 90% диагностическая чувствительность исследуемого медицинского изделия составила 97,5%, диагностическая специфичность – 100%.

Полученные данные сопоставимы с результатами исследования Амосенко Ф.А. и его коллег, в ходе которых было проанализировано 63 образца ДНК, выделенных из замороженных карцином толстой кишки. При этом диагностическая специфичность и чувствительность для набора «KRAS-7M» составила 100% и 96,4%, соответственно [6]. Таким образом, данные, полученные в настоящем исследовании, соответствуют литературным и даже превосходят их.

В ходе обработки данных эксперимента была создана математическая модель для оценки эффективности набора реагентов при ограниченном числе опытов. Если истинная доля признака (под признаком будем понимать положительный результат применения изделия, то есть, совпадение результатов анализа) равна P , то вероятность того, что в повторной серии испытаний, состоящей из N опытов применения изделия к биологической пробе в m случаях будет положительный результат, определяется по формуле Бернулли:

$$P_{M,N} = C_n^m * P^m * (1-P)^{N-m} \quad (3)$$

т.е. распределение повторной выборки описывается биномиальным распределением.

Оценка результатов исследований проводится согласно Приложению В «Методических рекомендаций по порядку проведения экспертизы качества, эффективности и безопасности медицинских изделий для государственной регистрации», одобренных научно-экспертным советом ФГБУ «ВНИИИМТ» Росздравнадзора 27.07.2016 г.

При оценке результатов исследований стоит задача: в серии опытов размером N получено m положительных результатов, вопрос – какая минимальная истинная доля признака $P_{ист}$ (доля положительных результатов) соответствует экспериментально полученной доле m/N с доверительной вероятностью не менее 90%. Или, другими словами, при оценке результатов необходимо определять нижнюю границу интервала, в котором находится истинная доля признака $P_{ист}$ с доверительной вероятностью не менее 90%. В общем случае аналитического решения уравнения не существует, для целей практического применения рекомендуется использовать график на рисунке, приведенный в Приложении В «Методических рекомендаций по порядку проведения экспертизы качества, эффективности и безопасности медицинских изделий для государственной регистрации», одобренных Научно-экспертным советом ФГБУ «ВНИИИМТ» Росздравнадзора 27 июля 2016 года. Для частного случая, когда доля признака, полученная в серии испытаний с числом опытов N , равна единице (все результаты опытов – положительные), уравнение имеет простое аналитическое решение:

$$P_{ист} = 0,1/N. \quad (4)$$

Обрабатываем полученный при клинических испытаниях исследуемого медицинского изделия результат диагностиче-

ской чувствительности. На рисунке по горизонтальной оси выбираем значение 0,975, соответствующее значению диагностической чувствительности 97,5%, полученному при испытаниях в 40 опытах с образцами геномной ДНК с установленным положительным статусом наличия мутаций гена *KRAS*. Находим соответствующую точку на графике с $N=40$ и получаем для этой точки значение $P_{ист}$ на вертикальной оси. В данном случае $P_{ист} = 0,909$ (90,9%) с доверительной вероятностью 90%.

Таким образом, результат диагностической чувствительности 97,5%, полученный в 40 опытах с образцами геномной ДНК с установленным положительным статусом наличия мутаций гена *KRAS*, может рассматриваться как доказательство для показателя эффективности – диагностической чувствительности медицинского изделия – на уровне 0,909 (90,9%) с доверительной вероятностью 90%.

Обрабатываем полученный результат диагностической специфичности. На рисунке по горизонтальной оси выбираем значение 1, соответствующее значению диа-

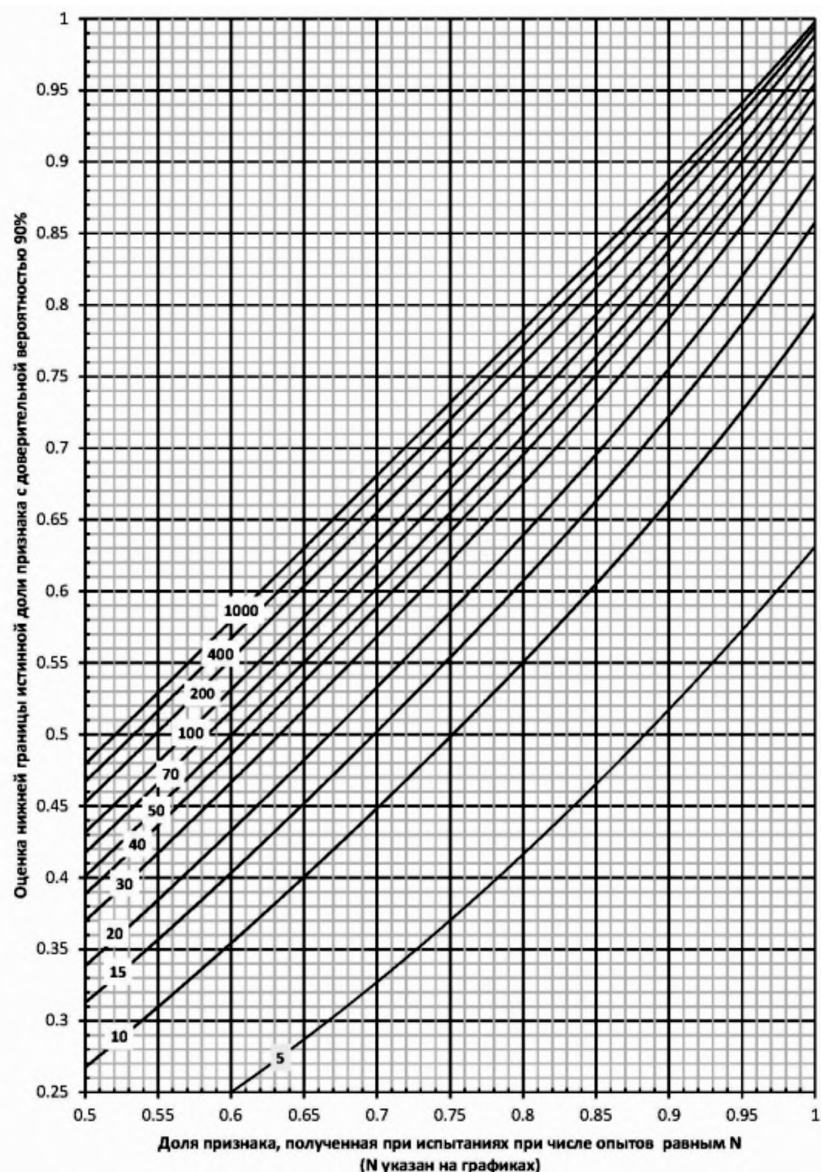


График оценки статистической достоверности результатов испытаний в зависимости от числа независимых опытов N при доверительной вероятности 90%.

гностической специфичности 100%, полученному при испытаниях в 48 опытах с образцами геномной ДНК с установленным отрицательным статусом наличия мутаций гена *KRAS*. Находим соответствующую точку на графике с N=48 и получаем для этой точки значение $P_{ист}$ на вертикальной оси. В данном случае $P_{ист} = 0,950$ (95,0%) с доверительной вероятностью 90%.

Таким образом, результат диагностической специфичности 100 %, полученный в 48 опытах с образцами геномной ДНК с установленным отрицательным статусом наличия мутаций гена *KRAS* может рассматриваться как доказательство для показателя эффективности – диагностической специфичности медицинского изделия – на уровне 0,950 (95,0%) с доверительной вероятностью 90%.

Воспроизводимость результатов 100%. В процессе испытаний наборы продемонстрировали высокую надежность.

По результатам статистической обработки исследуемое медицинское изделие имеет высокие характеристики эффективности – диагностическая чувствительность (90,9%), диагностическая специфичность (95%) с доверительной вероятностью 90%, что подтверждает высокую диагностическую ценность регистрируемого набора реагентов.

Таким образом, анализ и оценка результатов проведенных клинико-лабораторных испытаний медицинского изделия подтвердили качество набора реагентов, эффективность и безопасность его применения.

Выводы. В результате проведенных клинических испытаний в форме клинико-лабораторных испытаний установлено, что набор реагентов для определения статуса мутаций гена *KRAS* методом ПЦР-РВ в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани (Тест-KRAS-ткань) по ТУ 21.20.23-006-97638376-2016 безопасен и клинически эффективен при использовании по назначению, установленному производителем.

1. Результаты проведенных испытаний подтверждают эффективность и безопасность применения медицинского изделия «Набор реагентов для определения статуса мутаций гена *KRAS* методом ПЦР-РВ в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани (Тест-KRAS-ткань) по ТУ 21.20.23-006-97638376-2016» производства ООО «ТестГен».

2. Изделие может применяться в медицинских учреждениях и клинико-диагностических лабораториях онкологического профиля. Область применения набора реагентов – клиническая лабораторная диагностика, онкология, проктология.

3. Отклонения от алгоритма выполнения клинических испытаний отсутствовали.

В ходе клинических испытаний медицинского изделия были выявлены следующие достоинства:

1. При производстве изделия применены современные, безопасные, при использовании в клинических лабораторных условиях и соблюдении требований инструкции по применению, материалы.

2. Удобство при использовании: изделие представляет собой набор реагентов, готовых к использованию.

3. Медицинское изделие позволяет проводить качественное определение статуса шести мутаций двенадцатого кодона (Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Arg, Gly12Val, Gly12Ser, Gly12Cys) и одной мутации тринадцатого кодона (Gly13Asp) гена *KRAS* методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксиро-

ванной в парафине ткани, с высокими показателями диагностической чувствительности 90,9% и диагностической специфичности 95,0 % с доверительной вероятностью 90%.

4. Воспроизводимость результатов 100%, что подтверждает высокую надежность набора.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Поспехова Н.И., Шубин В.П., Цуканов А.С., Фролов С.А., Шелыгин Ю.А. Молекулярно-генетические маркеры в онкоколопроктологии: помощь в диагностике, прогнозе, лечении. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 9: 46-7.
2. Ying H.-Q., Wang F., He B.-S., Pan Y.-Q., Gao T.-Y., Xu Y.-Q. et al. The involvement of Kras gene 3'-UTR polymorphisms in risk of cancer and influence on patient response to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer: a metaanalysis. *Oncotargets Ther.* 2014; 7: 1487–96.
3. Linardou H., Briasoulis E., Dahabreh I.J., Mountzios G., Papadimitriou C., Papadopoulos S. et al. All about KRAS for clinical oncology practice: gene profile, clinical implications and laboratory recommendations for somatic mutational testing in colorectal cancer. *Cancer Treat. Rev.* 2011; 37: 221–33.
4. Гервас П.А., Литвяков Н.В., Попова Н.О. Добродеев А.Ю., Тарасова А.С., Юмов Е.Л. и др. Проблемы и перспективы совершенствования молекулярно-генетической диагностики для назначения таргетных препаратов в онкологии. *Сибирский онкологический журнал*. 2014; 2 (62): 46-55.
5. Проценко С.А. Таргетная терапия при меланоме, гастроинтестинальных стромальных опухолях, дерматофибросаркоме протуберанс. *Практическая онкология*. 2010; 11 (3): 162–70.
6. Амосенко Ф.А., Карпов И.В., Поляков А.В., Коваленко С.П., Шаманин В.А., Любченко Л.Н. Сравнение различных методов молекулярно-генетического анализа соматических мутаций в гене K-ras при колоректальном раке. *Вестник РАМН*. 2012; 2: 35-42.

REFERENCES

1. Pospekhova N.I., Shubin V.P., Tsukanov A.S., Frolov S.A., Shelygin Yu.A. Molecular genetic markers in oncocoloproctology: assistance in diagnosis, prediction, treatment. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2014; 9: 46-7. (in Russian)
2. Ying H.-Q., Wang F., He B.-S., Pan Y.-Q., Gao T.-Y., Xu Y.-Q. et al. The involvement of Kras gene 3'-UTR polymorphisms in risk of cancer and influence on patient response to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer: a metaanalysis. *Oncotargets Ther.* 2014; 7: 1487–96.
3. Linardou H., Briasoulis E., Dahabreh I.J., Mountzios G., Papadimitriou C., Papadopoulos S. et al. All about KRAS for clinical oncology practice: gene profile, clinical implications and laboratory recommendations for somatic mutational testing in colorectal cancer. *Cancer Treat. Rev.* 2011; 37: 221–33.
4. Gervas P.A., Litvyakov N.V., Popova N.O., Dobrodeev A.Yu., Tarasova A.S., Yumov E.L. et al. Problems and prospects for improving molecular genetic diagnostics for the administration of target drugs in oncology. *Sibirskiy onkologicheskij zhurnal*. 2014; 2 (62): 46-55. (in Russian)
5. Protsenko S.A. Target therapy in melanoma, gastrointestinal stromal tumors, dermatofibrosarcoma protuberance. *Prakticheskaya onkologiya*. 2010; 11 (3): 162–70. (in Russian)
6. Amosenko F.A., Karpov I.V., Polyakov A.V., Kovalenko S.P., Shamanin V.A., Lyubchenko L.N. Comparison of different methods of molecular genetic analysis of somatic mutations in the K-ras gene in colorectal cancer. *Vestnik Rossiyskoy Akademii meditsinskikh nauk*. 2012; 2: 35-42. (in Russian)

Поступила 16.03.20

Принята к печати 15.05.20