

Амосова И.В.<sup>1</sup>, Тимошичева Т.А.<sup>1</sup>, Сверлова М.В.<sup>1</sup>, Бузицкая Ж.В.<sup>1</sup>, Егорова А.А.<sup>1</sup>, Львов Н.И.<sup>2</sup>

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОКУЛЬТУРАЛЬНОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА И МОДИФИЦИРОВАННОГО МЕТОДА ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ АДЕНОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

<sup>1</sup> ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, 197376, Санкт-Петербург;

<sup>2</sup> ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Министерства обороны России, 194044, Санкт-Петербург

*Особые условия профессиональной деятельности военнослужащих срочной службы определяют широкое распространение респираторных вирусов среди личного состава Вооруженных Сил. Частое перемешивание воинских коллективов обуславливает занос инфекционных агентов, в том числе аденовирусов (АВ). Известно, что до 60% ОРВИ в новых сформированных коллективах имеют АВ-этиологию. Наиболее часто в таких случаях выделяют серотипы 4 и 7 АВ. Изучены диагностические возможности моноклональных иммунологических тестов непрямого иммунофлуоресцентного (НИФЛ) и микрокультурального иммуноферментного анализа (мКИФА) для диагностики АВ-инфекции. Были исследованы 40 клинических образцов от пациентов с диагнозом ОРВИ, находившихся на лечении с апреля по июль 2014 г. в военно-медицинских организациях. Для исследования методами НИФЛ и мКИФА использовали культуру клеток А-549, зараженную материалами от больных. Оценку репродукции АВ в инфицированной культуре клеток при обоих методах осуществляли с использованием в стадии детекции моноклональных антител к гексону АВ. Наличие АВ было подтверждено при использовании ПЦР в 20 образцах, выделения АВ в культуре клеток в 19 образцах: НИФЛ — в 14 образцах, мКИФА — в 14 образцах. Для определения серотипов АВ проведено выделение ДНК и секвенирование 10 из исследованных образцов, положительных на АВ по результатам ПЦР. Результаты филогенетического анализа по участку гена нити показали принадлежность АВ из всех образцов к серотипу 4 (подгруппа Е). Чувствительность мКИФА и НИФЛ при детекции АВ в культуре клеток, зараженной материалами от больных, в сравнении с ПЦР составила 85 и 87% соответственно, специфичность обоих методов достигала 100%.*

**Ключевые слова:** аденовирус; диагностика; секвенирование.

**Для цитирования:** Амосова И.В., Тимошичева Т.А., Сверлова М.В., Бузицкая Ж.В., Егорова А.А., Львов Н.И. Использование микрокультурального иммуноферментного анализа и модифицированного метода иммунофлуоресценции для диагностики аденовирусной инфекции. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62 (4): 230-235. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-4-230-235>

Amosova I.V.<sup>1</sup>, Timoshycheva T.A.<sup>1</sup>, Sverlova M.V.<sup>1</sup>, Buzitskaya J.V.<sup>1</sup>, Egorova A.A.<sup>1</sup>, Lvov N.I.<sup>2</sup>

### THE APPLICATION OF MICRO-CULTURAL ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY OF MODIFIED IMMUNOFLUORESCENCE TECHNIQUE FOR DIAGNOSTIC OF ADENOVIRUS INFECTION

<sup>1</sup>The research institute of influenza of Minzdrav of Russia, 197376 St. Petersburg, Russia

<sup>2</sup>The S.M. Kirov бшдшефкн medical academy of Ministry of Defense of Russia, 194044 St. Petersburg, Russia

*The particular conditions of professional activities of drafty military personnel determine wide-spread of of respiratory viruses in crew of Armed Forces. The frequent mixing of military staff conditions of carrying of infection agents , including adenoviruses. It is known, that up to 60% of acute respiratory viral disease in newly formed staff have adenovirus etiology. In these cases, the most frequently are isolated serotonins 4 and 7 of adenovirus. The diagnostic possibilities of monoclonal immunologic tests of indirect enzyme-linked immunosorbent assay and micro-cultural enzyme-linked immunosorbent assay for diagnostic of adenovirus infection are investigated. The analysis was applied to 40 clinical samples from patients with diagnosis of acute respiratory viral disease residing for treatment in military medical organizations during April-June 2014. The culture of cells A-549 infected with materials from patients was used for analysis. The evaluation of reproduction of adenovirus in infected culture of cells using both techniques was implemented by application of monoclonal antibodies to hexon of adenovirus on stage of detection. The availability of adenovirus was proved applying polymerase chain reaction in 20 samples; isolation of cell culture in 19 samples; indirect enzyme-linked immunosorbent assay - in 14 samples; micro-cultural enzyme-linked immunosorbent assay - in 14 samples. For detection of serotypes of adenovirus isolation of DNA and sequencing of 10 of analyzed samples positive for adenovirus according results of polymerase chain reaction were implemented. The results of phylogenetic analysis on site of gene string demonstrated belonging of adenovirus out of all samples to serotype 4 (subgroup E). The sensitivity of indirect enzyme-linked immunosorbent assay and micro-cultural enzyme-linked immunosorbent assay in detection of adenovirus in cell cultures infected with materials from patients, in comparison with polymerase chain reaction, made up to 85% and 87% correspondingly. The specificity of both techniques reached 100%.*

**Key words:** adenovirus; diagnostic; sequencing

**For citation:** Amosova I.V., Timoshycheva T.A., Sverlova M.V., Buzitskaya J.V., Egorova A.A., Lvov N.I. The application of micro-cultural enzyme-linked immunosorbent assay of modified immunofluorescence technique for diagnostic of adenovirus infection. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2017; 62 (4): 230-235. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-4-230-235>

**For correspondence:** Timoshycheva T.A., junior researcher of the laboratory of biotechnology of diagnostic preparations. e-mail: [tatianatim@mail.ru](mailto:tatianatim@mail.ru)

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

**Acknowledgment.** The study had no sponsor support.

Received 12.10.2016  
Accepted 29.11.2016

Специфическая профилактика гриппозными вакцинами приводит к снижению заболеваемости гриппом. Однако заболеваемость другими острыми респираторными вирусными инфекциями (ОРВИ) сохраняется на прежнем уровне. Вспышки ОРВИ в организованных коллективах новобранцев, проходящих военную службу по призыву, остаются серьезной проблемой гражданского и военного здравоохранения. Во вновь сформированные коллективы военнослужащих, прибывших из разных регионов страны, происходит периодический занос респираторных вирусов. Характер профессиональной деятельности и условия совместной жизнедеятельности военнослужащих определяют особую восприимчивость к респираторным инфекциям и являются дополнительными факторами риска развития вспышек ОРВИ.

Во время эпидемических вспышек гриппа и других острых респираторных заболеваний (ОРЗ) переболевает более 30% военнослужащих, а сезонные подъемы заболеваемости растягиваются на 3—4 мес, что оказывает отрицательное влияние на поддержание боеготовности Вооруженных Сил (ВС). Помимо вирусов гриппа А и В, значительный уровень заболеваемости обусловлен аденовирусами (АВ) (до 50% всех этиологически расшифрованных ОРЗ) [1, 2]. В целом 80% призывников инфицируются АВ, около 20% из которых нуждаются в госпитализации. Показано, что около 90% госпитализированных больных пневмониями приходится на АВ-инфекцию [3]. По данным литературы, большинство этих заболеваний вызваны АВ 4 типов 4 и 7, реже — 3, 14 и 21 [4].

Типичными клиническими проявлениями АВ-инфекции являются лихорадка, проявления общей инфекционной интоксикации, фарингит, ринит, бронхит, тонзиллит, шейная лимфаденопатия, а также склонность к затяжному и рецидивирующему течению [5]. Высокий уровень заболеваемости личного состава ВС, затяжное и рецидивирующее течение болезни, осложнения в виде АВ и АВ-бактериальных пневмоний (до 18% всех верифицированных случаев АВ-инфекции), в том числе тяжелого течения с летальными исходами, определяют актуальность специфической диагностики с целью своевременного назначения средств этиотропной терапии, иммуно- и экстренной профилактики в очагах таких вспышек.

Проведено исследование материалов от больных ОРВИ АВ-этиологии, находившихся на лечении в ВМО Санкт-Петербурга в период с апреля по июль 2014 г. с целью определения этиологии заболевания у военнослужащих, выделения АВ в клеточной культуре, определения их генотипа, а также оценки эффективности непрямого иммунофлуоресцентного (НИФЛ) и микрокультурального иммуноферментного анализа (мКИФА) для диагностики АВ-инфекции.

**Материал и методы.** В работе исследованы 40 клинических образцов (мазки из носа) от пациентов, госпитализированных с диагнозом ОРВИ с апреля по июль 2014 г. Наличие генома АВ в 20 образцах было подтверждено ПЦР в реальном времени. Все материалы были получены из лаборатории молекулярной вирусологии и геномной инженерии ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, где они хранились в транспортной среде при  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение 3 мес.

**Выделение аденовирусов в культуре клеток А-549.** Суспензию клеток А-549 в концентрации 100—150 тыс. кл/мл вносили по 1,5 мл в пробирки и помещали в  $\text{CO}_2$ -инкубатор при  $37^{\circ}\text{C}$  до формирования клеточного монослоя, после чего ростовую среду удаляли, клетки однократно отмывали ФСБ (рН 7,2—7,4) и вносили материалы от больных из расчета по 0,2 мл каждого из материалов в 2—3 пробирки. Инфицированные культуры помещали в термостат на 30—40 мин (для адсорбции вируса), после чего в них вносили по 0,9—1,5 мл среды. В контрольные культуры добавляли по 1,5 мл среды.

Инфицированные и контрольные культуры инкубировали при  $37^{\circ}\text{C}$ . Состояние монослоя ежедневно контролировали с целью обнаружения признаков цитопатогенного действия (ЦПД) вируса. Для накопления вируса проводили 1—2 пассажа на культуре клеток А-549. Вирусосодержащую культуральную жидкость (ВКЖ) хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Выделение ДНК АВ из клинических материалов осуществлялось с использованием коммерческого набора RNeasy Mini Kit («Qiagen») согласно инструкции производителя.

ПЦР выполняли с применением праймеров на участок гена нити по методу Kcsy [6]. Амплификацию проводили в термоциклере MJ Mini («BioRad»).

Анализ продуктов амплификации фрагментов генома АВ выполняли посредством гель-электрофореза в 1,7% агарозном геле.

Секвенирование проводили методом Сенгера с помощью коммерческого набора BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit («Applied Biosystems»). Для секвенирования использовали те же праймеры, что и для ПЦР. Реакцию секвенирования выполняли в термоциклере BioRad CFX96 Real-Time System C100 Thermal Cycler («BioRad»). Нуклеотидные последовательности определяли с помощью 4-канальной автоматизированной системы капиллярного электрофореза и флуоресцентной детекции ДНК-фрагментов с помощью ABI 3130 Genetic Analyzer («Applied Biosystems»). Капиллярный электрофорез проводили в полимере ABI 3130 POP-7.

**Выравнивание последовательностей и филогенетический анализ.** Сборку, хранение и обработку секвенированных нуклеотидных последовательностей осуществляли в программе Vector NTI 10 Advance («Invitrogen»). Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы Vector NTI 10 Advance с использованием алгоритма CLUSTAL W [7]. Филогенетические деревья строили с помощью программ MEGA 6.

**Выявление АВ-антигенов в клинических образцах методом мКИФА.** Суспензию клеток А-549 в концентрации 100—150 тыс. кл/мл вносили по 150 мкл в лунки культурального планшета Nunc и помещали в  $\text{CO}_2$ -инкубатор при  $37^{\circ}\text{C}$  до формирования клеточного монослоя, после чего ростовую среду удаляли, клетки однократно отмывали по 200 мкл ФСБ (рН 7,2—7,4) и вносили по 150 мкл исследуемых образцов, предварительно разведенных в 10 и 100 раз поддерживающей средой.

Через 24—48 ч инкубации в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе при  $37^{\circ}\text{C}$  зараженные клеточные культуры исследовали под световым микроскопом. В случае обнаружения слабого ЦПД, выражающегося в виде появления круглых клеток и незначительного разрежения монослоя, из планшета удаляли среду и фиксировали клетки в течение 10 мин 80% охлажденным ацетоном. Наличие АВ-антигенов определяли в реакции с пероксидазным конъюгатом моноклональных антител (МКА) к гексону аденовирусов (ПХК-МКА-АВ, получен в лаборатории биотехнологии диагностических препаратов ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России). ПХК-МКА-АВ инкубировали с инфицированными клетками в течение 45 мин при  $37^{\circ}\text{C}$ . Пероксидазную реакцию проявляли добавлением субстратной смеси. После остановки реакции с помощью 2н  $\text{H}_2\text{SO}_4$  измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм. Отрицательным контролем служила незараженная культура клеток А-549, положительным — культура, зараженная АВ типа 6, штамм Tonsill-99 (получен из музея ОРВИ ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России). Положительными по содержанию АВ-антигена были признаны пробы, ОП450 которых превышала в 2 и более раз ОП450 отрицательного контроля.

**Выявление АВ-антигенов в клинических образцах методом НИФЛ.** В качестве тест-объектов (ТО) использовали клеточные культуры А-549, выращенные на поверхности

Таблица 1

**Коды доступа для полногеномных нуклеотидных последовательностей АВ человека различных типов**

Human adenovirus A	9	AJ854486	39	JN226760	
12	AC_000005	10	JN226746	42	JN226761
18	GU191019	13	JN226747	43	JN226761
31	AM749299	15	AB562586	44	JN226763
Human adenovirus B	17	AC_000006	45	JN226764	
3	NC_011203	19	EF121005	46	AY875648
7	AC_000018	20	JN226749	47	JN226757
16	AY601636	22	FJ404771	48	EF153473
21	AY601633	23	JN226750	49	DQ393829
11	AY163756	24	JN226751	51	JN226765
14	AY803294	25	JN226752	53	FJ169625
34	AY737797	26	EF153474	54	AB333801
35	AY128640	27	JN226753		Human adenovirus E
50	AY737798	28	FJ824826	4	AY487947
Human adenovirus C	29	AB562587			Human adenovirus F
1	AF534906	30	JN226755	40	L19443
2	ADRCG	32	JN226756	41	DQ315364
5	AC_000008	33	JN226758		Human adenovirus G
6	FJ349096	36	GQ384080	52	DQ923122
Human adenovirus D	37	DQ900900			Вак-цинный штамм аденовируса серотипа 7
8	AB448767	38	JN226759		AY594256

покровных стекол в пробирках и зараженные ВКЖ положительных по результатам выделения на культуре клеток клинических образцов. Через 24—48 ч инкубации при 37°C зараженные клеточные культуры исследовали под световым микроскопом, в случае обнаружения слабого ЦПД полоски покровных стекол извлекали из пробирок, высушивали при комнатной температуре и фиксировали в 80% охлажденном ацетоне. Далее ТО инкубировали с МКА к гексону АВ (получены в лаборатории биотехнологии диагностических препаратов ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России) в течение 30 мин во влажной камере при комнатной температуре, дважды промывали ФСБ по 10 мин, споласкивали дистил-

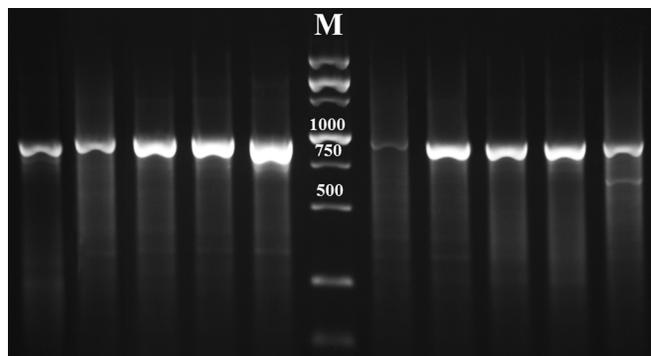


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР по Ксу [6]. Размер продукта 960 пар нуклеотидов соответствует АВ подгруппы E. М — маркеры.

лированной водой и высушивали. Связавшиеся антитела выявляли с помощью ФИТЦ-конъюгата антимышиных антител («Sigma»). После повторной инкубации в течение 30 мин при тех же условиях ТО анализировали под люминесцентным микроскопом Axiovert («Karl Zeiss»).

**Результаты.** Методом ПЦР в реальном времени было исследовано 40 клинических образцов (мазки из носа) на всю группу наиболее значимых возбудителей респираторных инфекций: вирусы гриппа типов А и В, парагриппа типов 1, 2 и 3, АВ, риновирус и бокавирус. Для дальнейших исследований были отобраны 20 образцов, положительных на АВ в 7—15 циклах. При выделении в культуре клеток А-549 АВ были обнаружены в 19 образцах.

Из образцов, положительных по результатам ПЦР в реальном времени и выделения вируса в культуре клеток, были отобраны 10 образцов для выделения ДНК и секвенирования. С целью определения серотипов полученных образцов были амплифицированы фрагменты гена нити. Продукты амплификации детектировали посредством электрофореза в агарозном геле (рис. 1).

Оценив размеры продуктов ПЦР, можно предположить, что все исследованные образцы содержали АВ типа E, т. е. генотип 4 АВ. Для подтверждения этого вирусная ДНК была выделена и секвенирована с прямого и обратного праймеров. Секвенированные последовательности были обработаны и выровнены с последовательностями участков фибриллы референс-штаммов, депонированных из базы данных GenBank (коды доступа указаны в табл. 1).

Филогенетическое дерево было построено с использованием двухпараметрической модели Кимуры [8] методом ближайших соседей (Neighbor-Joining) [9]. Результаты филогенетического анализа по участку гена нити подтвердили принадлежность АВ из всех образцов к подгруппе E, и их серотип определен как 4. Филогенетическое дерево по фрагменту гена нити представлено на рис. 2.

Выделенные образцы секвенированы в лаборатории молекулярной вирусологии и геномной инженерии ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России в ходе исследования, остальные последовательности получены из базы данных GenBank.

При исследовании клинических образцов методом мКИФА клеточная культура А-549 была заражена материалами от больных, взятыми в разведениях  $10^{-1}$  и  $10^{-2}$ . Детекцию АВ антигена осуществляли с помощью ПХК-МКА-АВ.

По результатам анализа положительными на АВ-антиген были признаны 14 материалов, ОП 450 которых отличалась от контрольной пробы более чем в 2 раза. При этом положительные пробы можно разделить на 3 группы: к первой группе относились 7 образцов, положительных по результатам мКИФА в обоих разведениях. Ко второй группе отнесены 4 материала, давшие положительный сигнал в разведении  $10^{-1}$ , но оказавшиеся отрицательными в разведении  $10^{-2}$ , что может быть объяснено недостаточным количеством возбудителя в клиническом образце, которым инфицировали клеточную культуру. К третьей группе отнесли 3 материала, которые были отрицательными при разведении  $10^{-1}$ , но положительными в разведении  $10^{-2}$ . В этих образцах наблюдалось ярко выраженное ЦПД (что, вероятно, можно объяснить значительным количеством возбудителя в исходном материале), которое привело к элиминации антигена во время удаления ростовой среды из планшета.

Для исследования методом нИФЛ клеточные культуры А-549, выращенные на поверхности покровных стекол в пробирках, были заражены 19 ПЦР-положительными и 20 отрицательными материалами (ВКЖ, полученная после 2 пассажей в культуре клеток). Через 48 ч инкубации при 37°C ТО извлекали из пробирок, высушивали при комнатной температуре и фиксировали 80% охлажденным ацетонем.

Таблица 2

**Результаты исследования клинических образцов с использованием различных методов диагностики**

Количество проб	ПЦР в реальном времени	Выделение АВ в культуре клеток	мКИФА	НИФЛ
Положительных по результатам теста	20	19	14	14
Отрицательных по результатам теста	20	20	26	26

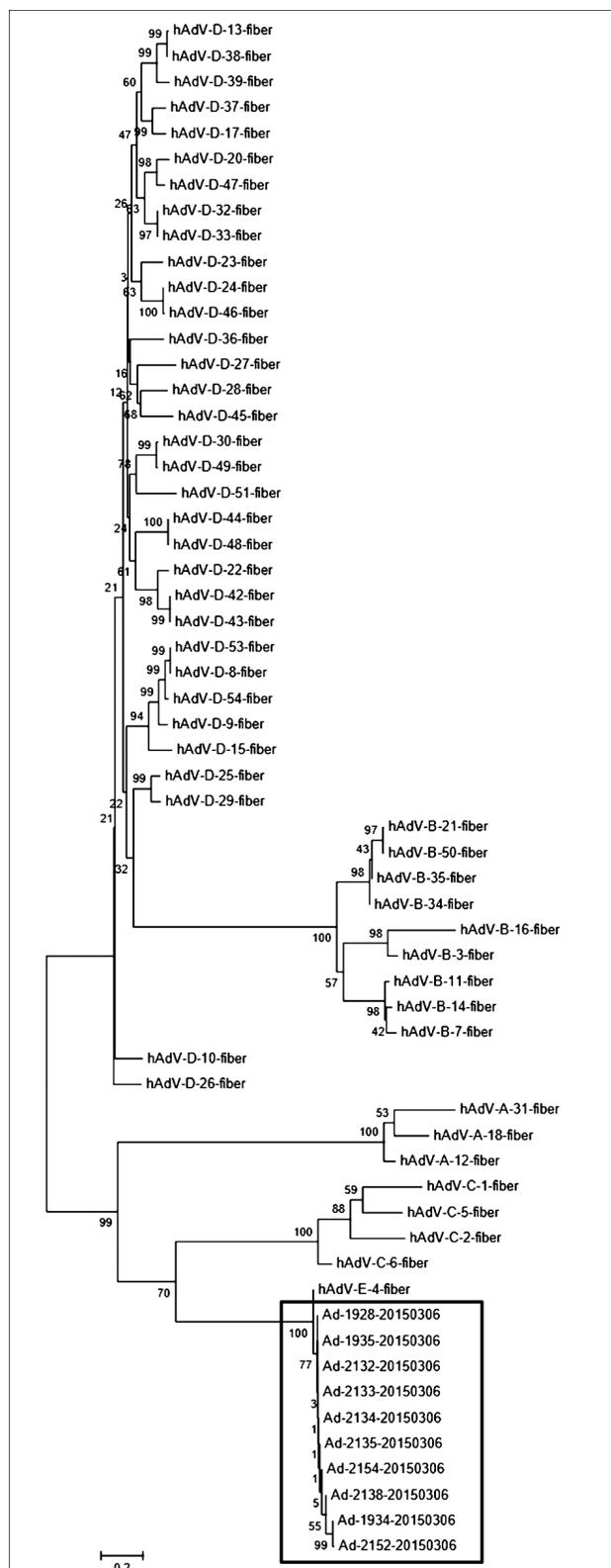


Рис. 2. Филогенетическое дерево АД, построенное на основании нуклеотидных последовательностей области гена, кодирующего нить.

Выделенные образцы секвенированы в лаборатории молекулярной вирусологии и геной инженерии ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России в ходе исследования, остальные последовательности получены из базы данных GenBank.

В первой стадии анализа исследуемые образцы инкубировали со специфическими МКА к гексону АВ, во второй осуществляли детекцию связавшихся с антигеном МКА при помощи ФИТЦ-конъюгата антивидовых антител («Sigma»). Окрашенные ТО анализировали под люминесцентным микроскопом и оценивали специфичность и яркость флуоресценции. В результате исследования положительными на АВ-антиген были признаны 14 из 19 ПЦР-положительных образцов, яркость и интенсивность флуоресценции при этом была достаточно отчетливой и варьировала в зависимости от степени поражения клеток АВ, в отрицательных образцах флуоресценция не наблюдалась (рис. 3).

Таким образом, из 40 материалов, поступивших в лабораторию для исследования, в 20 по результатам ПЦР в реальном времени были обнаружены АВ. Из 19 материалов АВ были выделены в культуре клеток А-549. Результаты ПЦР в реальном времени и выделения АВ в культуре клеток совпали в 97,5% случаев. При исследовании в мКИФА и НИФЛ АВ были обнаружены в 14 материалах. Однако 2 материала были положительными в мКИФА и отрицательными в НИФЛ, 4 материала отрицательными в мКИФА и положительными в НИФЛ, 2 материала отрицательными при использовании обоих методов, 1 положительный в мКИФА материал не представлялся в НИФЛ. Результаты исследования клинических образцов с использованием различных методов диагностики представлены в табл. 2.

Совпадение результатов мКИФА и НИФЛ с ПЦР в реальном времени составило 85 и 87% соответственно, чувствительность и специфичность мКИФА составила 70 и 100%, НИФЛ — 74 и 100% соответственно (табл. 3).

**Обсуждение.** АВ человека принадлежит к числу патогенных возбудителей респираторных заболеваний с поражением не только верхних, но и нижних отделов дыхательного тракта в виде бронхитов, бронхиолитов и пневмоний [5]. В ВС в эпидемический сезон более 30% военнослужащих переболевает ОРВИ, из них на долю аденовирусной инфекции приходится до 50% [1, 2].

Для лабораторной диагностики респираторных вирус-

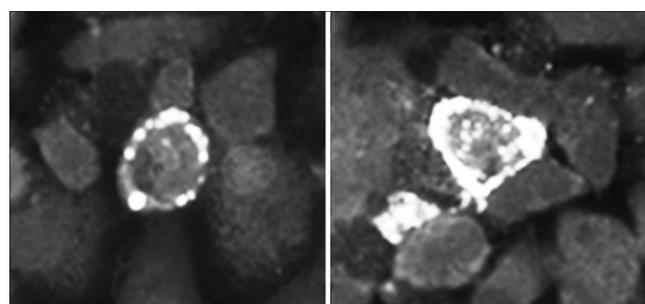


Рис. 3. Специфическое свечение в культуре клеток А-549, зараженной материалами от больных. Окрашено ФИТЦ, ув. 1000.

Таблица 3

Совпадение и расхождение результатов различных тестов в сравнении с ПЦР

Метод исследования	Количество проб	Результат анализа	ПЦР		Чувствительность, %	Специфичность, %	Общее совпадение, %
			+	—			
Выделение вируса	39	+	19	0	100	100	97,5
		—	0	20			
мКИФА	40	+	14	0	70	100	85
		—	6	20			
нИФЛ	39	+	14	0	74	100	87
		—	5	20			

ных инфекций используют следующие методы: непосредственное выявление антигена в клиническом образце (ИФА, ИФЛ, выделение в культуре клеток), молекулярные (ПЦР) и серологические методы. По данным литературы, чувствительность ИФА составляет 50—70%, ИФЛ — 55—75%, культурального исследования — 60—80%, а ПЦР — 90—100%.

Материалы от больных ОРВИ были исследованы на наличие АВ-антигена методами выделения вирусов в культуре клеток, ПЦР в реальном времени, мКИФА и нИФЛ. Выделение вируса в культуре клеток является трудоемким, дорогостоящим процессом, продолжительность анализа может занимать до 2 нед, результаты анализа подвержены влиянию многих факторов (срок взятия материала, содержание в нем вируса, чувствительность клеточных культур, состав сред и другие). Метод ПЦР в реальном времени при высоких показателях чувствительности и специфичности и достаточно коротком времени анализа, не всегда может быть проведен в медицинском учреждении, где находится пациент, материалы требуется доставлять в специализированные лаборатории, что может увеличивать срок получения результатов на несколько дней. Методы ИФА и ИФЛ широко используются в клинико-лабораторной практике, так как имеют показатели чувствительности и специфичности, сопоставимые с молекулярными методами. Использование модификации этих методов (детекция АВ-антигена в культуре клеток, зараженной материалами от больных) позволяет хранить, транспортировать образцы перед исследованием, результаты можно получить через 1—2 дня после заражения культуры клеток, кроме того, существенно облегчается интерпретация результатов нИФЛ. Общее совпадение результатов нашего исследования с данными ПЦР составило для мКИФА и нИФЛ 85 и 87% соответственно. Использование высокоспецифичных МКА позволило добиться высоких показателей специфичности обоих методов (см. табл. 3). С целью определения целесообразности выделения АВ в культуре клеток мКИФА может быть рекомендован для первичного скрининга материалов от больных.

Систематическое серотипирование АВ, циркулирующих на территории России, в настоящее время не проводится. Однако отдельные исследования посвящены этой проблеме. По данным С.Б. Яцышиной и соавт. [11], в период с 2010 по 2014 г. среди населения в г. Москве циркулировали АВ серотипов 1, 2, 3, 4, 6 и 7. АВ серотипа 7 явился причиной четырех вспышек среди военнослужащих. В США АВ серотипов 4 и 7 также являются основными этиологическими агентами, вызывающими ОРЗ среди военнослужащих [12]. Филогенетический анализ АВ, вызвавших подъем заболеваемости ОРВИ среди военнослужащих гарнизона г. Санкт-Петербурга,

также показал принадлежность этих АВ к подгруппе E, и их серотип определен как 4.

В отличие от других ОРВИ (гриппа, парагриппа, респираторно-синцитиальной инфекции) манифестные формы АВ-инфекции характеризуется полиморфизмом проявлений, что делает ее одной из самых интересных для изучения и в то же время одной из самых сложных для клинической диагностики. Применение быстрых, чувствительных и специфичных тестов, сконструированных на основе МКА, является актуальным для рутинной клинической лабораторной практики.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2, 4, 6—10, 12 см. REFERENCES)

1. Львов Н.И., Писарева М.М., Мальцев О.В., Бузитская Ж.В., Афанасьева В.С., Михайлова М.А. и др. Особенности этиологической структуры ОРВИ в отдельных возрастных и профессиональных группах населения Санкт-Петербурга в эпидемический сезон 2013—2014 гг. *Журнал инфектологии*. 2014; 6(3): 62—70.
3. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Лаврищева В.В. Информация Центра экологии и эпидемиологии гриппа Института вирусологии им. Д.И. Иванковского РАМН об итогах эпидемического сезона 2009—2010 гг. по гриппу и ОРВИ (с 40-й недели 2009 г. по 22 неделю 2010 г.) в мире и в России. *Вопросы вирусологии*. 2011; 56(1): 44—8.
5. Лобзин Ю.В., Жданов К.В., ред. Руководство по инфекционным болезням. В 2-х книгах. Книга 2. 4-е издание. СПб.: ООО «Издательство Фолиант»; 2011: 70—89.
11. Яцышина С.Б., Агеева М.Р., Воробьева Н.С., Валдохина А.В., Елькина М.А., Горелов А.В. и др. Аденовирусы в этиологической структуре острых респираторных вирусных инфекций в Москве в 2004—2014 гг. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2015; (5): 50—7.

REFERENCES

1. L'vov N.I., Pisareva M.M., Mal'tsev O.V., Buzitskaya Zh.V., Afanas'eva V.S., Mikhaylova M.A. et al. The features of ARVD etiological structure in different age and professional population groups in Saint-Petersburg during 2013—2014 epidemic season. *Zhurnal infektologii*. 2014; 6(3): 62—70. (in Russian)
2. Zdanov K.V., Lvov N.I., Maltsev O.V., Peredelsky E.V., Pisareva M.M. Main Aetiological Features of Acute Respiratory Viral Diseases in Young People of Draft Age and Conscripts During the 2013—2014 Epidemic Season. *International Review of the Armed Forces Medical Services*. 2016; 89(2): 58—63.
3. L'vov D.K., Burtseva E.I., Lavrishcheva V.V. Information of the Center for Ecology and Epidemiology of Influenza, D.I. Ivanovsky Research Institute of Virology, Russian Academy of Medical Sciences, on the results of the 2009—2010 influenza and acute respiratory viral infection epidemic season (at week 40 of 2009 to week 22 of 2010) in the world and Russia. *Voprosy virusologii*. 2011; 56(1): 44—8. (in Russian)
4. Lin Y.C., Lu P.L., Lin K.H., Chu P.Y., Wang C.F., Lin J.H. et al. Molecular Epidemiology and Phylogenetic Analysis of Human Adenovirus Caused an Outbreak in Taiwan during 2011. *PLoS One*. 2015; 10(5): e0127377.
5. Lobzin Yu.V., Zhdanov K.V., eds. *Communicable Diseases Manual*. In 2 books. Book 2 [Rukovodstvo po infektsionnym boleznyam. V 2-kh knigakh. Kniga 2]. 4th ed. St.Petersburg: ООО «Izdatel'stvo Foliant»; 2011: 70—89. (in Russian)
6. Xu W., McDonough M.C., Erdman D.D. Species-specific identification of human adenoviruses by a multiplex PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(11): 4114—20.
7. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving

- the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22(22): 4673—80.
8. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 1980; 16(2): 111—20.
  9. Saitou N., Nei M. The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 1987; 4(4): 406—25.
  10. Pavia A.T. Viral infections of the lower respiratory tract: old viruses, new viruses, and the role of diagnosis. *Clin. Infect. Dis.* 2011; 52(4): S284—9.
  11. Yatsyshina S.B., Ageeva M.R., Vorob'eva N.S., Valdokhina A.V., El'kina M.A., Gorelov A.V. et al. Adenoviruses in the etiological structure of acute respiratory viral infections in Moscow in 2004—2014 years. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2015; (5): 50—7. (in Russian)
  12. Kuschner R.A., Russell K.L., Abuja M., Bauer K.M., Faix D.J., Hait H. et al. A phase 3, randomized, double-blind, placebo-controlled study of the safety and efficacy of the live, oral adenovirus type 4 and type 7 vaccine, in U.S. military recruits. *Vaccine.* 2013; 31(28): 2963—71.

Поступила 12.10.16  
Принята к печати 29.11.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.155.392.2-036.12-092:612.017.11-078.33

Жевак Т.Н.<sup>1</sup>, Чеснокова Н.П.<sup>2</sup>, Шелехова Т.В.<sup>2</sup>, Иванова С.Н.<sup>2</sup>, Шутова А.С.<sup>1</sup>

## ЗАКОНОМЕРНОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ РОСТСТИМУЛИРУЮЩИХ И РОСТИНГИБИРУЮЩИХ ФАКТОРОВ ПРИ В-КЛЕТОЧНОМ ХРОНИЧЕСКОМ ЛИМФОЛЕЙКОЗЕ И ИХ ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава РФ, 119991, Москва;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава РФ, 410012, Саратов

*В работе оценен баланс ростстимулирующих и ростингибирующих факторов в сыворотке крови у больных с различными стадиями В-клеточного хронического лимфолейкоза, находящихся на обследовании и стационарном лечении в клинике профпатологии и гематологии Саратова с 2007 по 2016 г. Показатели содержания в сыворотке крови VEGF165, PDGF-AB, pRb, p53 и p73 определяли с использованием твердофазного иммуноферментного анализа. Характерной особенностью В-клеточного хронического лимфолейкоза стало стабильно высокое содержание ростстимулирующих цитокинов (VEGF165, PDGF-AB) в динамике развития заболевания, что позволило сделать вывод об их важной роли в механизмах онкогенной трансформации и стимуляции пролиферативной активности неопластических клеток на различных стадиях патологии.*

*В то же время нарушение антипролиферативных сигналов при В-клеточном хроническом лимфолейкозе характеризовалось одномоментным снижением контроля клеточного цикла со стороны нескольких механизмов регуляции перехода G<sub>1</sub>-фазы в S-фазу, обусловленных низким уровнем ингибиторов циклинзависимых киназ (p53, p73) и недостаточной экспрессией регулятора клеточного цикла белка pRb.*

**Ключевые слова:** В-клеточный хронический лимфолейкоз; пролиферация; апоптоз.

**Для цитирования:** Жевак Т.Н., Чеснокова Н.П., Шелехова Т.В., Иванова С.Н., Шутова А.С. Закономерности изменения содержания в сыворотке крови ростстимулирующих и ростингибирующих факторов при В-клеточном хроническом лимфолейкозе и их диагностическое значение. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62 (4): 235-239. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-4-235-239>

Zhevak T.N.<sup>1</sup>, Chesnokova N.P.<sup>2</sup>, Shelekhova T.V.<sup>2</sup>, Ivanova S.N.<sup>2</sup>, Shutova A.S.<sup>1</sup>

## THE PATTERNS OF ALTERATION OF CONTENT OF GROWTH-STIMULATING AND GROWTH-INHIBITING FACTORS IN BLOOD SERUM UNDER B-CELL CHRONIC LYMPHATIC LEUKEMIA AND THEIR DIAGNOSTIC VALUE

<sup>1</sup>The I.M. Sechenov first Moscow state medical university of Minzdrav of Russia, 119992 Moscow, Russia

<sup>2</sup>The V.I. Razumovskii Saratovskii state medical university of Minzdrav of Russia, 410012 Saratov, Russia

*The article evaluates balance of growth-stimulating and growth-inhibiting factors in blood serum of patients with different stages of B-cell chronic lymphatic leukemia residing on examination and hospital treatment in Saratov clinic of occupational pathology and hematology in 2007-2016. The indices of content of VEGF165, PDGF-AB, pRb, p53 and p73 in blood serum was detected using solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay. The specific characteristic of B-cell chronic lymphatic leukemia became stably higher content of growth-stimulating cytokines of development of disease that permitted to conclude about (VEGF165, PDGF-AB) in dynamics of development of disease that permitted to conclude about their important role in mechanisms of oncogene transformation and stimulation of proliferation activity of neoplastic cells at various stages of pathology.*

*At the same time, disturbance of anti-proliferation signals under B-cell chronic lymphatic leukemia was characterized by single-at-once decreasing of controlling cell cycle of several mechanisms of regulation of changing G<sub>1</sub>-phase to S-phase conditioned by low level of inhibitors of cyclin-dependent kinases (p53 and p73) and inadequate expression of regulator of cellular cycle of protein pRb.*

**Key words:** B-cell chronic lymphatic leukemia; proliferation; apoptosis.