

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 616-018.1-055.5/7-076.5

Нетёсова Е.С.¹, Брагин А.Г.¹, Глушков С.А.¹, Прасолова М.А.^{1,2,3}, Дымшиц Г.М.^{2,3,4},
Кандрушин Е.В.¹, Подымова А.С.⁵, Сандырева Т.П.⁵

РАЗРАБОТКА НАБОРА ДЛЯ ГИБРИДИЗАЦИОННОЙ ЭКСТРАКЦИИ ДНК И РНК ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГЕМОТРАНСМИССИВНЫХ ИНФЕКЦИЙ ИЗ СЫВОРОТКИ И ПЛАЗМЫ КРОВИ

¹ЗАО "Вектор-Бест", 630559, АБК, п. Кольцово, Новосибирский район, Новосибирская область; ²Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Новосибирск; ³Новосибирский государственный университет, 630090, Новосибирск; ⁴Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск; ⁵ГБУЗ "Свердловский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями", 620102, Екатеринбург

Для уменьшения зависимости эффективности выделения нуклеиновых кислот от состава и количества используемого образца был разработан набор для гибридной экстракции ДНК ВГВ, РНК ВГС и РНК ВИЧ из сыворотки/плазмы крови (в двух форматах — с использованием до 250 мкл и до 1 мл образца). В комплексе с наборами для детекции методом ПЦР в реальном времени он формирует тест, характеризующийся высокой аналитической чувствительностью: ВГВ 50 копий/мл, ВГС 37,5 копий/мл, ВИЧ 13 копий/мл. Разработанный набор для экстракции целевых нуклеиновых кислот позволяет избавиться от тотальной ДНК и ингибирующего влияния гепарина, а также может быть адаптирован для использования с автоматическими станциями пробоподготовки.

Ключевые слова: ДНК ВГВ; РНК ВГС; РНК ВИЧ; магнитные частицы; медиаторные олигонуклеотиды; гибридная экстракция; ПЦР.

*E.S. Netesova¹, A.G. Bragin¹, S.A. Glushkov¹, M.A. Prasolova^{1,2,3}, G.M. Dymshits^{2,3,4},
Kandryshin E.V.¹, Podymova A.S.⁵, Sandyreva T.P.⁵*

THE DEVELOPMENT OF KIT FOR HYBRIDIZATION EXTRACTION OF DNA AND RNA OF AGENTS OF HEMOTRANSMISSIVE INFECTIONS FROM SERUM AND BLOOD PLASMA

To decrease dependence of effectiveness of isolation of nucleic acids of composition and amount of applied sample a kit was developed for hybridization extraction of DNA HBV RNA HCV and RNA HIV from blood serum in two formats — using up to 250 mkl and up to 1 ml of sample. This kit, in complex with kits for detection using polymerase chain reaction technique in real-time, forms a test characterized by high analytical sensitivity i.e. HBV50 copies per ml, HCV 37.5 copies per ml, HIV 13 copies per ml. The developed kit for extraction of target nucleic acids permits to get rid of total DNA and inhibited effect of heparin. It can be adapted for application with factors B and automated stations of sample preparation.

Key words: DNA HBV; RNA HCV; RNA HIV; magnetic particle; mediator oligonucleotides; hybridization; polymerase chain reaction

Введение. Ежегодно от доноров получают около 92 млн доз крови, которые в 39 странах до сих пор не проходят процедуру скрининга на предмет выявления маркеров гемотрансмиссивных инфекций, включая ВИЧ, сифилис, гепатиты В и С, а около 47% донаций в странах с низким уровнем жизни проходят клинические тесты без должного контроля качества [1]. Успешно внедренный в конце XX века дополнительный метод скрининга [2] — NAT (детекция нуклеиновой кислоты (НК), в частности с помощью ПЦР в реальном времени — РВ) — позволил сократить период от заражения до возможности детекции вирусного возбудителя в крови пациента по сравнению с ИФА с 59 до 20—30 дней для ВГВ, с 66 до 10—12 дней для ВГС и с 22 до 11 дней для ВИЧ [3—5].

В России в 2008 г. приказом Минздравсоцразвития России введен обязательный анализ образцов плазмы с отрицательными результатами ИФА-тестов на предмет наличия НК ВГВ, ВГС и ВИЧ [6]. Для увеличения числа анализируемых образцов и уменьшения затрат на анализ каждого образца при подготовке плазмы для фракционирования используется

процедура пулирования [7]. При формировании пулов каждый инфекционный образец разбавляется в количество раз, равное коэффициенту пулирования, и количество детектируемой НК может оказаться ниже предела чувствительности используемого диагностического набора, поэтому при выделении НК должен использоваться максимальный объем образца. Также при формировании пулов происходит смешивание образцов от разных пациентов, что может приводить к образованию осадков и ингибированию анализа при использовании наборов, не учитывающих такие особенности. При формировании и анализе пулов необходима тщательная фиксация всех данных, что еще больше удлиняет процесс. Автоматизация анализа методом ПЦР, в том числе включающая автоматизацию пулирования, а также позволяющая проводить экстракцию НК из большого объема образца, дает ряд преимуществ: снижаются трудовые и временные затраты, минимизируется влияние человеческого фактора на результаты анализа, увеличивается пропускная способность диагностической лаборатории.

Цель настоящего исследования — разработка высокоэффективного набора для выделения НК ВГВ, ВГС и ВИЧ, который обеспечивал бы уменьшение зависимости эффективности выделения НК от состава и количества используемой сыворотки или плазмы крови, характеризовался высо-

Для корреспонденции:

Нетёсова Екатерина Сергеевна, науч. сотр.
Адрес: 630128, Новосибирск, ул. Песчаная, 3
E-mail: netesovae@vector-best.ru

кой аналитической чувствительностью и позволял проводить анализ в автоматическом режиме.

Материалы и методы. Компоненты, обуславливающие специфичность выделения. Магнитные частицы были изготовлены из частиц магнетита, покрытых силикагелем, с последующей иммобилизацией полинуклеотидов длиной около 300 мономеров (поли(дА)), состоящих из дезоксиаденозинов, на поверхности частиц. Медиаторные олигонуклеотиды (М-олигонуклеотиды) имели длину около 40 мономеров и состояли из двух частей — специфической (20—25 нуклеотидов, последовательность которых комплементарна участку вирусной НК) и гомополимерной (мономером являлся тимидин). Частицы и М-олигонуклеотиды были изготовлены в лаборатории химического синтеза ЗАО "Вектор-Бест". При выборе последовательностей вирусных НК, которым комплементарны специфические части М-олигонуклеотидов, использовали консервативные участки геномов вирусов: для ВГВ — гена S, для ВГС — 5'-нетранслируемой области (с учетом необходимости детекции генотипов 1, 2 и 3), для ВИЧ — гена pol.

Гибридизационное выделение специфических нуклеиновых кислот. Образцы сыворотки/плазмы крови обрабаты-

ли раствором для лизиса (4 М мочевины, 3% ДТТ, 1% тритон X-100, 45 мМ Трис-НСl pH 6,4, 20 мМ ЭДТА) в соотношении 1:3 с добавлением смеси магнитных частиц и медиаторных олигонуклеотидов при периодическом перемешивании в течение 30 мин и прогревании до 60°C, затем перемешивали 15 мин без прогревания. После супернатант удаляли, удерживая магнитные частицы на стенке пробирки с помощью магнитного штатива, и проводили три промывки — дважды промывочным раствором 1 (500 мМ NaCl, 0,05% Tween 20, 10 мМ EDTA) и однократно промывочным раствором 2 (300 мМ NaCl, 10 мМ Трис-НСl pH 6,4). После добавляли к осадку частиц буфер 50 мМ Трис-НСl, pH 8,9 и элюировали ДНК и РНК с магнитных частиц при температуре 90°C с перемешиванием.

Образцы. В качестве образцов для оптимизации теста использовались: геномная ДНК или РНК, выделенная набором "РеалБест Экстракция 100" из стандартных образцов предприятия производства ЗАО "Вектор-Бест"; стандартные образцы предприятия (СОП), изготовленные из инактивированных сывороток крови, содержащих ДНК ВГВ, РНК ВГС и РНК ВИЧ, и разведенных в пуле донорских сывороток, не содержащих маркеров ВГС, ВГВ и ВИЧ. Концентрации ДНК и РНК в них определены относительно стандартов ВОЗ [8—

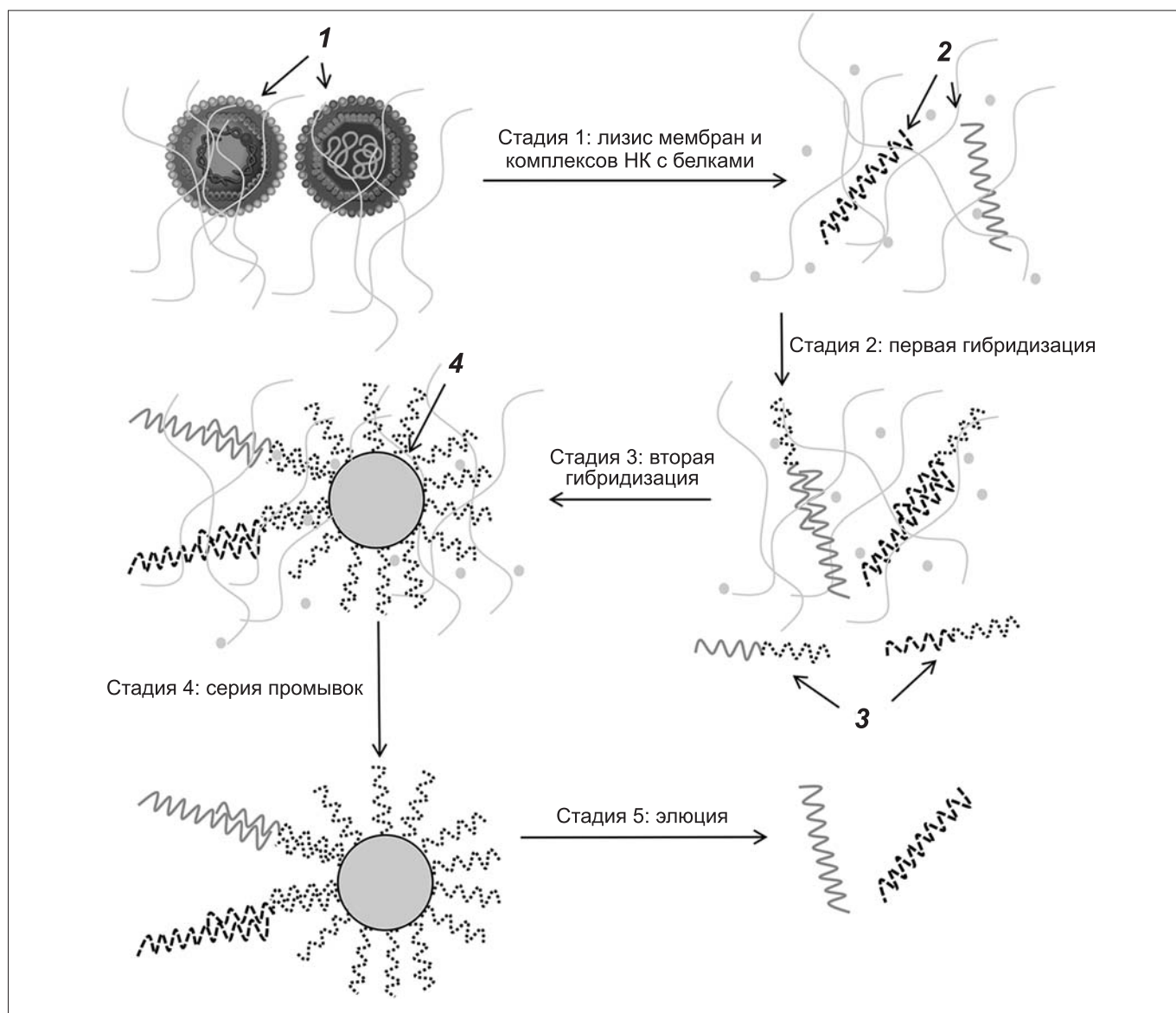


Рис. 1. Последовательность стадий выделения НК с помощью разработанной методики.

1 — вирусные частицы; 2 — вирусная ДНК или РНК; 3 — медиаторные олигонуклеотиды; 4 — магнитная частица с иммобилизованной гомополимерной ДНК.

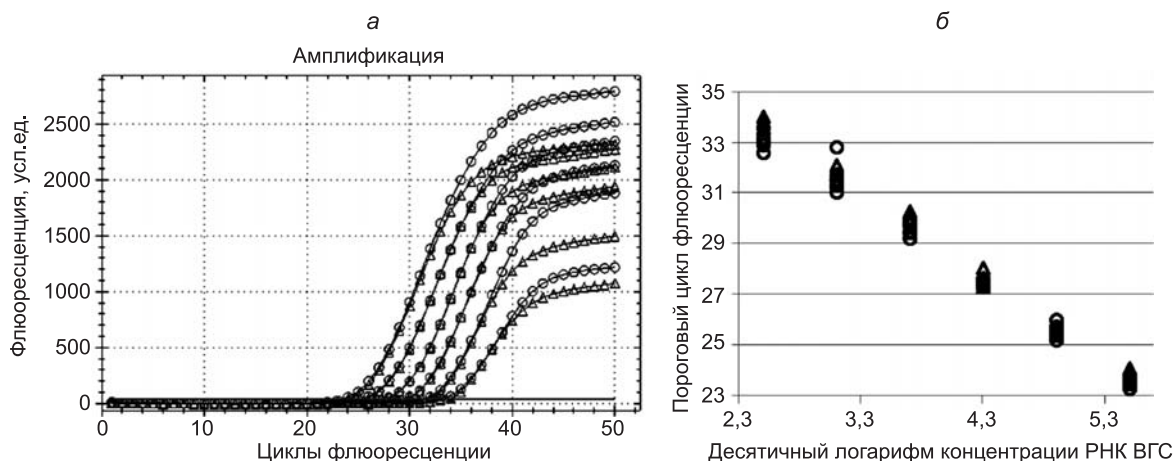


Рис. 2. Графики накопления флюоресценции (а), полученные в результате ОТ-ПЦР РВ, и зависимость пороговых циклов флюоресценции от десятичного логарифма концентрации РНК ВГС (б) (Δ — серии разведений РНК ВГС без проведения этапа пробоподготовки, \circ — с использованием набора "ДельтаМаг"). Максимальное значение концентрации соответствует $8,02 \cdot 10^5$ геном-эквивалент/мл ВГС.

10]. Для сравнения разных тестов использовались: пробы сыворотки и плазмы крови ВГВ-, ВГС- и ВИЧ-положительных пациентов, любезно предоставленные Новосибирским центром по профилактике и борьбе со СПИД и Московским НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, а также пробы плазмы крови ВИЧ-положительных пациентов, любезно предоставленные ГБУЗ СО "Свердловский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями".

Референсные наборы. Для сравнения использовались зарегистрированные в РФ наборы "РеалБест Экстракция 100" и "РеалБест Экстракция 1000" (ЗАО "Вектор-Бест", Новосибирск), а также набор для выделения и количественного определения РНК ВИЧ "Abbott RealTime HIV-1 assay" (Abbott, США).

ПЦР в реальном времени. Для ПЦР и ОТ-ПЦР РВ использовались наборы "РеалБест ВГВ ПЦР", "РеалБест ВГС ПЦР" и "РеалБест ВИЧ ПЦР" (ЗАО "Вектор-Бест", Новосибирск). 50 мкл элюата с НК вносили в пробирку с лиофилизированной готовой реакционной смесью для ПЦР или ОТ-ПЦР. Для детекции использовались амплификаторы с флюоресцентной детекцией в РВ "iQ5 iCycler" и "CFX96" ("Bio-Rad", США), для обработки результатов использовали сервисную

программу "РеалБест Диагностика" ("Вектор-Бест", Новосибирск).

Результаты и обсуждение. На рис. 1 приведена последовательность стадий выделения НК с помощью разработанной методики.

Стадия 1 — лизис в присутствии хаотропного денатурирующего агента (мочевины), неионного детергента (тритон X-100), солей, стабилизирующих этап последующей гибридизации, и ингибитора РНКаз (ДТТ) [11].

Стадия 2 — гибридизация участков вирусных НК со специфической частью М-олигонуклеотидов.

Стадия 3 — гибридизация с поли(дА)-трактом на магнитных частицах с помощью гомополимерной части М-олигонуклеотидов.

Стадия 4 — промывки растворами, которые стабилизируют связь между целевой НК и магнитными частицами и позволяют эффективно отмывать сорбент, удаляя неспецифически сорбировавшиеся компоненты образца и остатки растворов с предыдущих стадий.

Стадия 5 — магнитный сорбент с иммобилизованной НК подвергается высокотемпературной инкубации в растворе для элюции, при этом происходит разрушение водородных связей и элюция целевой НК с сорбента.

Таблица 1

Данные об эффективности выделения образцов, содержащих ДНК ВГВ, РНК ВГС или РНК ВИЧ, с и без обработки их с помощью разработанной методики экстракции НК

НК	ВГВ			ВГС			ВИЧ		
	Ct среднее		% выделенной НК	Ct среднее		% выделенной НК	Ct среднее		% выделенной НК
	эксперимент	контроль		эксперимент	контроль		эксперимент	контроль	
Концентрация 1	21,3	19,8	37,6	23,6	23,8	118,7	21,5	21,7	118,01
Концентрация 2	23,4	22	41,3	25,56	25,5	95,8	23,6	24	129,34
Концентрация 3	25,8	24,8	52,2	27,6	27,6	102,5	25,9	26,1	109,6
Концентрация 4	28,2	26	29,5	29,6	30	133	27,7	27,7	96,64
Концентрация 5	30,4	28,7	34	31,7	31,7	101,5	30,6	30,7	105,77
Среднее			37,2			110,3			111,87
Стандартное отклонение			8,8			15,3			12,42
Эффективность амплификации, %	90,8	94,6		105,3	98,6		99,3	101	

Примечание. Ct — пороговый цикл флюоресценции (сокр. от англ. cycle threshold).

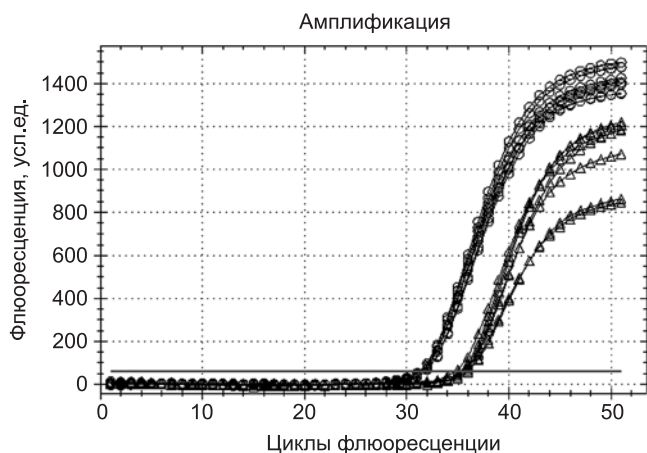


Рис. 3. Графики накопления флуоресценции, полученные в результате ОТ-ПЦР РВ после выделения образцов, содержащих РНК ВГС.

○ — с добавлением М-олигонуклеотидов; △ — без добавления М-олигонуклеотидов.

Магнитные частицы с иммобилизованной НК удерживаются на стенке пробирки с помощью магнитного штатива. Многокомпонентный раствор обеспечивает эффективный лизис вирусных частиц, стабильность РНК и ДНК (в том числе за счет инактивации ферментов нуклеинового обмена), эффективную гибридизацию НК с М-олигонуклеотидами и М-олигонуклеотидов с иммобилизованной на сорбенте поли(ДА). Соотношение объемов образца и раствора для лизиса позволяет провести экстракцию НК из объема до 1 мл, что является актуальным для анализа донорских пулов, поскольку в этом приложении диагностики максимальная чувствительность имеет первостепенное значение.

На основе описанного протокола был разработан набор для выделения ДНК ВГВ, РНК ВГС и РНВ ВИЧ — "РеалБест ДельтаМаг ВГВ/ВГС/ВИЧ". Магнитные частицы, М-олигонуклеотиды (для трех возбудителей и внутреннего контрольного образца) и внутренний контрольный образец были смешаны и лиофилизированы. Для проведения полного анализа используются смеси для амплификации и детекции ДНК ВГВ, РНК ВГС и РНК ВИЧ методом ПЦР РВ производства ЗАО "Вектор-Бест".

Эффективность выделения НК (экстрагированное количество относительно исходно добавленного) с использованием разработанного теста была оценена с помощью пятикратных серийных разведений образцов вирусных ДНК и РНК. Исходные разведения и препараты выделенной НК анализировали, применяя диагностические наборы "РеалБест ВГВ ПЦР", "РеалБест ВГС ПЦР", "РеалБест ВИЧ ПЦР". Полученные данные позволили рассчитать значения эффективности амплификации и оценить эффективность выделения НК (на рис. 2 в качестве примера приведены полученные кривые флуоресценции для РНК ВГС). При этом усредненное значение эффективности выделения с помощью разработанного набора для РНК ВГС составило $110,3 \pm 15,3\%$, для ДНК ВГВ $37,2 \pm 7\%$, для РНК ВИЧ — $111,9 \pm 12,42\%$ (доверительная вероятность 95%; табл. 1). Меньшая эффективность выделения ДНК ВГВ объясняется тем, что М-олигонуклеотиды используются для захвата лишь одной цепи, поэтому происходит экстракция не более 50% ДНК, что соответствует полученным данным по оценке эффективности.

Без использования в наборе

М-олигонуклеотидов процесс выделения будет происходить исключительно за счет неспецифической сорбции. На рис. 3 (для РНК ВГС) видно, что эффективность экстракции в отсутствие М-олигонуклеотидов крайне низка (отставание от контроля составляет 4—5 пороговых циклов, таким образом, выделяется лишь 3—6% РНК).

Данный метод выделения позволяет избавиться как от ингибиторов, так и от так называемой "обременяющей", или тотальной ДНК, присутствующей в биологическом материале и в результате оказывающейся в смеси для ПЦР [12]. Таким образом, даже при наличии небольшого количества вируса в образце вероятность получения целевого продукта после ПЦР РВ увеличивается, что повышает чувствительность анализа.

С целью проверки сопоставимости результатов определения вирусной нагрузки с помощью разработанного теста и его аналога "РеалБест Экстракция 1000", а также наборов для детекции НК ВГВ, ВГС и ВИЧ производства ЗАО "Вектор-Бест" было проведено параллельное сравнение 20 образцов сывороток и плазм крови ВГВ-инфицированных лиц, 20 сывороток и плазм крови ВГС-инфицированных лиц, 20 плазм крови ВИЧ-инфицированных лиц; приводятся результаты для ВГС-содержащих сывороток и плазм (рис. 4). Все выборки были случайными, от лиц с различными сроками установления диагноза. Результаты количественного определения всех образцов (100%), содержащих ДНК ВГВ, РНК ВГС или РНК ВИЧ с использованием наборов "РеалБест ДельтаМаг ВГВ/ВГС/ВИЧ" и "РеалБест ДНК ВГВ", "РеалБест РНК ВГС" и "РеалБест РНК ВИЧ" различались менее чем на 0,5 lg, что считается допустимым для применения в клинической практике [13].

Корреляционный анализ данных определения вирусных НК, полученных с применением разработанного теста и набора сравнения "РеалБест Экстракция 1000", показал хорошую сходимость результатов: коэффициенты корреляции составили: 0,87 для ВГС-содержащих образцов, 0,98 для ВГВ-содержащих образцов, 0,96 для ВИЧ-содержащих образцов.

Для определения аналитической чувствительности разработанного теста в комплексе с наборами для детекции НК ВГВ, ВГС и ВИЧ производства ЗАО "Вектор-Бест" использовали серию проб, полученных в двукратных разведениях стандартных образцов предприятия смесью сыворотки крови здоровых доноров (см. "Материалы и методы"). Пробы содержали ДНК ВГВ в концентрации от 1 до 40 МЕ/мл, РНК ВГС — от 2 до 100 МЕ/мл, РНК ВИЧ — от 3 до 120 МЕ/мл. Каждую пробу анализировали в шести повторах и шести независимых постановках. По результатам опыта рассчитывали зависимость вероятности обнаружения вируса от содержания целевой НК в исследуемом образце. Минимальные кон-

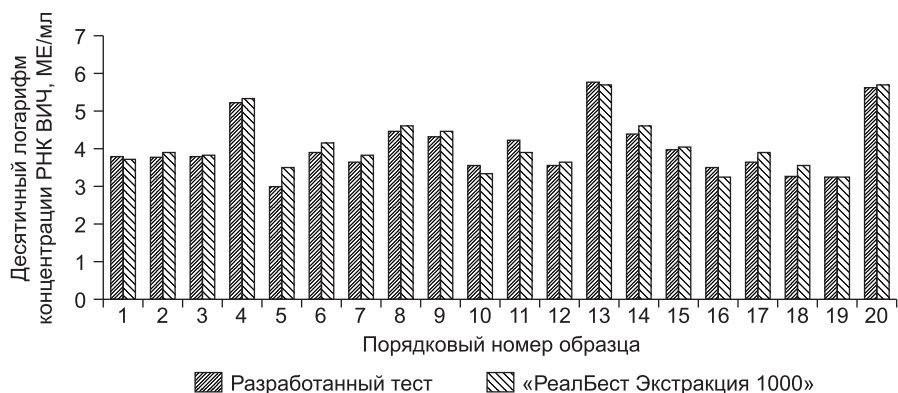


Рис. 4. Результаты сравнения образцов сывороток крови пациентов, содержащих ВГС, с использованием разработанного теста в комплексе с набором для детекции "РеалБест ВГС ПЦР" и набора "РеалБест Экстракция 1000" в комплексе с тем же набором для детекции.

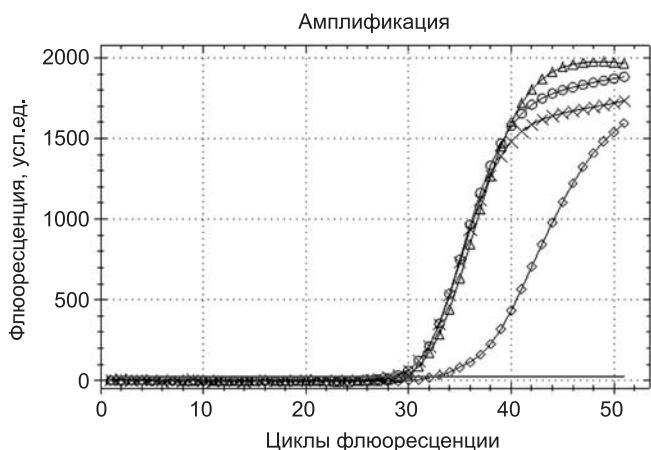


Рис. 5. Графики накопления флюоресценции, полученные в результате ПЦР РВ с ревертированием после пробоподготовки образцов, содержащих ВГС, с и без добавления гепарина в количестве 20 ЕД/мл. Разработанный тест: ○ — без гепарина; × — с гепарином; набор сравнения: △ — без гепарина, □ — с гепарином.

центрации ДНК ВГВ, РНК ВГС и РНК ВИЧ в сыворотке, выявляемые с вероятностью 95%, составили 7,6, 10,3 и 12,8 соответственно. В паспортах к сериям наборов "РеалБест ВГВ ПЦР", "РеалБест ВГС ПЦР", "РеалБест ВИЧ ПЦР" приводится аналитическая чувствительность 10 МЕ/мл (50 копий/мл) ДНК ВГВ, 15 МЕ/мл (37,5 копии/мл) РНК ВГС и 20 МЕ/мл (13 копий/мл) РНК ВИЧ, гарантированная производителем, что сравнимо со значениями этого показателя для аналогичных наборов зарубежных производителей.

Для оценки воспроизводимости результатов анализа, получаемых при использовании разработанного теста и наборов для детекции, проведено многократное тестирование ВГВ-, ВГС- и ВИЧ-положительных образцов сыворотки крови от 15 пациентов с помощью наборов, относящихся к разным сериям. Коэффициент вариации концентраций ДНК ВГВ, РНК ВГС и РНК ВИЧ, определенных с помощью наборов как одной серии, так и разных серий, не превышал 10%, что соответствует аналогичному параметру зарубежных диагностических наборов.

Гепарин, долгое время являвшийся одним из наиболее распространенных антикоагулянтов, в настоящее время применяется для профилактики тромбообразования, поэтому может присутствовать в клинических образцах пациентов, проходящих подобную терапию [14]. Гепарин является ингибитором ПЦР в концентрации от 0,04 ЕД/мл [15]. По данным литературы, концентрация гепарина в крови при введении его пациентам, находящимся на аппарате искусственного кровообращения, не превышает 10 ЕД/мл [16, 17]. На рис. 5 продемонстрирован эффект влияния гепарина в количестве 20 ЕД/мл образца, содержащего ВГС, при анализе его тестируемым набором и набором сравнения. При добавлении гепарина к образцу, содержащему вирусные

частицы, и анализе его с помощью набора, в инструкции к которому запрещено использовать для анализа гепаринизированные образцы, происходит ингибирование ПЦР. При анализе подобного образца с помощью описываемого теста происходит эффективная отмывка от гепарина, поэтому его ингибирующее влияние на ПЦР исчезает.

В рамках мероприятий по валидации были проведены клинические испытания на базе лаборатории ГБУЗ СО "Свердловский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями". Проведено параллельное тестирование 34 образцов плазмы, подлежащих анализу в плановом порядке, с помощью набора реагентов "РеалБест ДельтаМаг ВГВ/ВГС/ВИЧ", созданного на основе разработанного теста, и "РеалБест ВИЧ ПЦР", а также с помощью зарубежной тест-системы для определения вирусной нагрузки ВИЧ "Abbott RealTime HIV-1 assay".

Анализ результатов, полученных по итогам данного тестирования (табл. 2), показал, что корреляция значений вирусной нагрузки, определенных с использованием наборов двух производителей, составила 0,98. Для 94,1% образцов разница в измеренных значениях вирусной нагрузки составила не более 0,5 lg, а для 5,9% образцов лишь незначительно превысила это пороговое значение.

Таким образом, представленные данные демонстрируют высокий уровень корреляции между результатами, полученными при использовании наборов вышеуказанных производителей, что позволяет, во-первых, использовать отечественную тест-систему для выявления ВИЧ-инфекции с показателями аналитической и диагностической чувствительности аналогичными импортным наборам, во-вторых, осуществлять взаимозаменяемое использование сравниваемых наборов для мониторинга клинического состояния и эффективности лечения ВИЧ-инфицированных лиц при определении вирусной нагрузки без необходимости какого-либо пересчета получаемых результатов.

Заключение. Набор реагентов "РеалБест ДельтаМаг ВГВ/ВГС/ВИЧ", созданный на основе метода гибридной сорбции на магнитных частицах, опосредованной М-олигонуклеотидами, обладает следующими характеристиками: позволяет проводить анализ образцов сыворотки и плазмы крови объемом от нескольких микролитров до 1 мл; не включает этапы центрифугирования; позволяет проводить одну процедуру выделения для выявления маркеров одновременно трех инфекций; обладает чувствительностью, аналогичной таковой зарубежных аналогов; позволяет избавиться от ингибирующего влияния гепарина; адаптируем для использования с автоматическими станциями пробоподготовки. На базе ЗАО "Вектор-Бест" были опробованы следующие станции: Tecan Freedom EVO ("Tecan", Швейцария), KingFisher Flex ("Thermo Electron", Финляндия). Обе станции в данный момент используются в работе с полным комплектом реагентов производства "Вектор-Бест" для пробоподготовки и детекции ДНК ВГВ, РНК ВГС и РНК ВИЧ.

В настоящее время набор реагентов "РеалБест ДельтаМаг ВГВ/ВГС/ВИЧ" серийно выпускается на предприятии ЗАО "Вектор-Бест". Он имеет регистрационное удостоверение № ФСР 2010/07203 и приказом Росздравнадзора № 2561-Пр/10

Таблица 2

Сводные данные по сравнительному анализу значений вирусных нагрузок ВИЧ-содержащих образцов, полученных с использованием двух комплектов реагентов разных производителей

Набор реагентов	Вирусная нагрузка образцов			Доля образцов в % (количество) с отличием в определении РНК ВИЧ	
	0—10 ³ копий	10 ³ —10 ⁴ копий	более 10 ⁴ копий	0,0—0,5 lg	> 0,5 lg
Abbott RealTime HIV-1 assay					
РеалБест ДельтаМаг ВГВ/ВГС/ВИЧ и РеалБест ВИЧ ПЦР	11,8 %	23,5 %	64,7 %	94,1 (32)	5,9 (2)*

Примечание. * — для двух данных образцов разница десятичных логарифмов концентраций составила 0,54 и 0,52 log10.

от 29 марта 2010 г. разрешен к производству, продаже и применению на территории Российской Федерации.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. WHO Blood safety: key global facts and figures in 2011. Fact sheet № 279. June 2011; 1. Available at: http://www.who.int/worldblood-donorday/media/who_blood_safety_factsheet_2011.pdf
2. Nubling M., Heiden M., Chudy M., Kress J., Seitz R., Keller-Stanislawski B. et al. Experience of mandatory nucleic acid test (NAT) screening across all blood organizations in Germany: NAT yield versus breakthrough transmissions. *Transfusion*. 2009; 49: 1850—8.
3. Busch M.P., Lee L.L., Satten G.A., Henrard D.R., Farzadegan H., Nelson K.E. et al. Time course of detection of viral and serologic markers preceding human immunodeficiency virus type 1 seroconversion: implications for screening of blood and tissue donors. *Transfusion*. 1995; 35: 91—7.
4. Grant P.R., Busch M.P. Nucleic acid amplification technology methods used in blood donor screening. *Transfusion Medicine*. 2002; 12: 229—42.
5. Wilson I.G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 63 (10): 3741—51.
6. Приказ Минздравоохранения России № 261н от 6 июня 2008 г. О внесении изменений в приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 14 сентября 2001 г. № 364 "Об утверждении порядка медицинского обследования донора крови и ее компонентов". Российская газета. 2008; 4702.
7. Annex 4: recommendations for the production, control, and regulation of human plasma for fractionation. WHO Technical Report Series. 2007; 941: 197, 201, 204. Available at: <http://www.who.int/bloodproducts/publications/TRS941Annex4blood.pdf>.
8. Davis C., Heath A., Best S., Hewlett I., Lelie N., Schuurman R. et al. Calibration of HIV-1 working reagents for nucleic acid amplification techniques against the 1st international standard of HIV-1 RNA. *J. Virol. Methods*; 2003; 107: 37—44.
9. Pawlotsky J.-M., Bouvier-Alias M., Hezode C., Darthuy F., Remire J., Dhumeaux D. Standardization of hepatitis C virus RNA quantification. *Hepatology*. 2000; 32 (3): 654—9.
10. Saldanha J., Gerlich W., Lelie N., Dawson P., Heermann K., Heath A.: WHO Collaborative Study Group. An international collaborative study to establish the World Health Organization international standard for Hepatitis B virus DNA nucleic acid amplification techniques. *Vox Sang.* 2001; 80; 63—71.
11. Chen Z., Ling J., Gallie D.R. RNase activity requires formation of disulfide bonds and is regulated by the redox state. *Plant Mol. Biol.* 2004; 55 (1): 83—96.
12. PCR Troubleshooting: the Essential Guide. Wymondham: Caister Academic Press; 2006.
13. Saag M.S., Holodny M., Kuritzkes D.R., O'Brien W.A., Coombs R., Poscher M.E. et al. HIV viral load markers in clinical practice. *Nat. Med.* 1996; 2: 625—9.
14. Hirsh J., Anand S.S., Halperin J.L., Fuster V. Guide to anticoagulant therapy: heparin. A statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation*. 2001; 103: 2994—3018.
15. Yokota M., Tatsumi N., Nathalang O., Yamada T., Tsuda I. Effect of heparin on polymerase chain reaction for blood white cells. *J. Clin. Lab. Anal.* 1999; 13 (3): 133—40.
16. Despotis G.J., Summerfield A.L., Joist J.H., Goodnough L.T., Santoro S.A., Spitznagel E. et al. Comparison of activated coagulation time and whole blood heparin measurements with laboratory plasma anti-Xa heparin concentrations in patients have cardiac operations. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1994; 108: 1076—82.
17. Hardy J.-F., Bélisle S., Robitaille D., Perrault J., Roy M., Gagnon L. Measurement of heparin concentration in whole blood with the Hepcon/HMS device does not agree with laboratory determination of plasma heparin concentration using a chromogenic substrate for activated factor X. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1996; 112; 154—61.

Поступила 10.04.14

Received 10.04.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 616.34-002-022.7-078

Малыш Н.Г.¹, Голубничая В.Н.¹, Чемич Н.Д.¹, Доан С.И.²

НЕКОТОРЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ДОМИНИРУЮЩИХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ

¹Сумский государственный университет, 40007, г. Сумы, Украина; ²ГУ "Институт эпидемиологии и инфекционных болезней им. Л.В. Громашевского НАМН Украины", 03038, г. Киев, Украина

В 2003—2012 гг. темп роста заболеваемости острыми кишечными инфекциями (ОКИ), вызванными условно-патогенными микроорганизмами (УПМ), составил 3,6%. В этиологической структуре преобладали *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* и *Enterobacter cloacae*. Их удельный вес варьировал от 70,5 до 81,6%. УПМ, изолированные из фекалий больных с ОКИ и лиц контрольной группы, характеризовались наличием широкого спектра факторов патогенности. Адгезивные свойства проявляли 50,8±4,4% исследованных культур, выделенных от пациентов с проявлениями диарейной инфекции, и 19,5±3,5% из контрольной группы; антилизоцимную активность — соответственно 86,2±3 и 96,9±1,5% штаммов; антикомплемментарную (АКА) — 70,8±3,9 и 61,7±4,3%, антиинтерфероновую — 100 и 95,3±1,9%. Уровень адгезивной активности в *E. cloacae* (35±7,5%) и АКА и адгезивной активности в *K. pneumoniae* (соответственно 100 и 85±5,6%, выделенных из фекалий больных с ОКИ, достоверно ($p < 0,05$) превышал значение у лиц из контрольной группы.

Ключевые слова: острые кишечные инфекции; условно-патогенные микроорганизмы; факторы патогенности.

N.G. Malyshe¹, V.N. Golubichnaya¹, N.D. Tchermitch¹, S.I. Doan²

THE BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF DOMINATED AGENTS OF ACUTE ENTERIC INFECTIONS

¹The Sumy state university, 40007 Sumy, Ukraine; ²The L.V. Gromashevskiy institute of epidemiology and infectious diseases of the National academy of medical sciences of Ukraine, 03038 Kiev, Ukraine

Для корреспонденции:

Малыш Нина Григорьевна, канд. мед. наук, ассистент

Адрес: 40030, Сумы, ул. Жукова, 6/1-31

E-mail: ninamalysh@mail.ru