

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 67 ЛАБОРАТОРНАЯ      11 • 2022 ДИАГНОСТИКА

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

НОЯБРЬ

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](mailto: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 20.10.2022.  
Подписано в печать 15.11.2022.  
Формат 60 × 88%.  
Печать офсетная.  
Печ. л. 8,00  
Уч.-изд. л. 8,95.

**E-mail: [oao-meditsina@mail.ru](mailto:oao-meditsina@mail.ru)**  
**WWW страница: [www.medlit.ru](http://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](http://www.aks.ru),  
[www.pressa-rf.ru](http://www.pressa-rf.ru)**  
**Подписка на электронную версию:  
[elibrary.ru](http://elibrary.ru)**

ISSN 0869-2084. Клин. лаб. диагностика.  
2022. № 11. 621–684.

## 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,  
Л.М. СКУИНЬ, А.А. ТОТОЛЯН, Г.Г. ХАРСЕЕВА (ответственный секретарь), И.П. ШАБАЛОВА

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

И.И. АНДРЕЕВА (Ростов-на-Дону), 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. ЕЛЬЧАНИНОВА (Барнаул), А.В. ИНДУТНЫЙ (Омск), А. KALLNER (Швеция, Стокгольм), А.И. КАРПИЩЕНКО (Санкт-Петербург), К.П. КАШКИН (Москва), А.В. КОЗЛОВ (Санкт-Петербург), Г.В. КОРШУНОВ (Саратов), Г.М. КОСТИН (Минск), А.Г. КОЧЕТОВ (Москва), Н.Е. КУШЛИНСКИЙ (Москва), Г.Г. ЛУНЕВА (Киев), В.Н. МАЛАХОВ (Москва), Е.Н. ОВАНЕСОВ (Москва), Ю.В. ПЕРВУШИН (Ставрополь), И.В. ПИКАЛОВ (Новосибирск), Ю.П. РЕЗНИКОВ (Москва), С.Н. СУПЛОТОВ (Тюмень), О.А. ТАРАСЕНКО (Москва), И.С. ТАРТАКОВСКИЙ (Москва), А.Б. УТЕШЕВ (Алматы), С.В. ЦВИРЕНКО (Екатеринбург), А.Н. ШИБАНОВ (Москва), В.Л. ЭМАНУЭЛЬ (Санкт-Петербург), Г.А. ЯРОВАЯ (Москва)



«Издательство "МЕДИЦИНА"»

OAO IZDATEL'STVO  
"MEDITSINA"

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

# D KLINICHESKAYA LABORATORNAYA diagnostika

Volume 67  
11 • 2022

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

NOVEMBER

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](mailto: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](mailto:oao-meditsina@mail.ru)**

**WWW page: [www.medlit.ru](http://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, L.M. SKUIN', A.A. TOTOLYAN, G.G. KHARSEEVA (executive editor), I.P. SHABALOVA

**EDITORIAL COUNCIL:**

I.I. Andreeva (*Rostov-on-Don*), 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. EL-CHANINOVA (*Barnaul*), A.V. INDUTNY (*Omsk*), A. KALLNER (*Sweden, Stockholm*), A.I. KARPITCHENKO (*Sankt-Peterburg*), K.P. KASHKIN (*Moscow*), A.V. KOZLOV (*Sankt-Peterburg*), G.V. KORSHUNOV (*Saratov*), G.M. KOSTIN (*Minsk*), A.G. KOCHETOV (*Moscow*), N.E. KUSHLINSKII (*Moscow*), G.G. LUNEVA (*Kiev*), V.N. MALACHOV (*Moscow*), E.N. OVANESOV (*Moscow*), Yu.V. PERVUCHIN (*Stavropol'*), I.V. PICALOV (*Novosibirsk*), Yu.P. REZNIKOV (*Moscow*), S.N. SUPLOTOV (*Tyumen'*), O.A. TARASENKO (*Moscow*), I.S. TARTAKOVSKYI (*Moscow*), A.B. UTESHEV (*Almati*), S.V. TSVIRENKO (*Ekaterinburg*), A.N. SHIBANOV (*Moscow*), V.L. EMANUEL' (*Sankt-Peterburg*), G.A. YAROVAYA (*Moscow*)



IZDATEL'STVO "MEDITSINA"

## СОДЕРЖАНИЕ

### БИОХИМИЯ

*Жлоба А.А., Субботина Т.Ф.*

Метионин и общий гомоцистеин крови у пациентов с артериальной гипертензией в условиях экскреторной дисфункции почек . . . . . 625

*Титов В.Ю., Ананкина А.А., Осипов А.Н., Шалина Р.И., Иванова Е.А., Попова М.В.*

Возможности диагностики внутриутробного инфицирования по содержанию нитрита и нитрилатных нитрозосоединений в плазме материнской крови . . . . . 633

### ГЕМАТОЛОГИЯ

*Таганович А. Д., Ковганко Н. Н., Мурашко Д. И., Колб А.В., Прохорова В. И., Готько О. В., Державец Л.А.*

Дооперационные биомаркеры в крови пациентов с III стадией аденокарциномы легкого для прогнозирования безрецидивной выживаемости после хирургического лечения . . . . . 640

### ИММУНОЛОГИЯ

*Филиппова Ю.Ю., Девятова Е.В., Алексеева А.С., Бурмистрова А.Л.*

Цитокины и нейротрофические факторы в оценке степени тяжести аутизма у детей . . . . . 647

*Дорофеев А.С., Александрова Е.Н., Новиков А.А., Салиев К.Г., Сандлер Ю.Г., Винницкая Е.В.*

Диагностическое значение скрининговых методов определения антинуклеарных антител с помощью непрямой реакции иммунофлюоресценции на HEp-2 клетках и иммуноферментного анализа при аутоиммунных заболеваниях печени . . . . . 652

### КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

*Марданлы С.С., Марданлы С.Г., Казаков А.А., Демкин В.В., Затевалов А.М., Миронов А.Ю.*

Разработка ПЦР-тест-системы для детекции вируса герпеса человека 7 типа . . . . . 658

*Безродный С.Л. Жигалева О.Н. Марданлы С.Г. Помазанов В.В. Гашенко Т.Ю.*

Разработка набора реагентов для качественного выявления РНК вируса SARS-CoV-2 в назо- и орофарингеальных мазках методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени . . . . . 663

*Штрек С.В., Блох А.И., Самойленко И.Е., Санников А.В., Боброва О.А., Шпынов С.Н., Рудаков Н.В.*

Валидация ПЦР в режиме реального времени для оценки количества риккетсий в исследуемом биологическом материале . . . . . 668

### ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

*Жигалева О.Н., Ермолаев И.И., Марданлы С.Г., Гашенко Т.Ю.*

Анализ отечественного рынка наборов для диагностики COVID-19 методом полимеразной цепной реакции в реальном времени . . . . . 672

*Назарова В.В., Николаев Н.С., Тарасова Т.С., Добровольская Н.Ю., Преображенская Е.В.*

Использование опыта работы в период пандемии COVID-19 для обеспечения качества ПЦР-исследований . . . . . 678

---

## CONTENTS

### BIOCHEMISTRY

*Zhloba A.A., Subbotina T.F.*

Methionine and total homocysteine in hypertensive patients with renal excretory dysfunction. . . . .625

*Titov V.Yu., Osipov A.N., Shalina R.I., Anankina A.A., Ivanova E.A., Popova M.V.*

The possibility of diagnosing intrauterine infection by the content of nitrite and non-thiolate nitroso compounds in maternal blood plasma . . . . .633

### HEMATOLOGY

*Tahanovich A.D., Kauhanka N.N., Murashka D.I., Kolb A.V., Prokhorova V.I., Got'ko O.V., Derzhavets L.A.*

Preoperative blood markers for prediction of recurrence-free survival after surgical treatment of patients with stage iii lung adenocarcinoma . . . . . 640

### IMMUNOLOGY

*Filippova Yu.Yu., Devyatova E.V., Alekseeva A.S., Burmistrova A.L.*

Cytokines and neurotrophic factors in the severity assessment of children autism . . . . .647

*Dorofeev A.S., Aleksandrova E.N., Novikov A.A., Saliev K.G., Sandler Yu.G., Vinnitskaya E.V.*

Diagnostic value of screening methods for the determination of antinuclear antibodies using indirect immunofluorescence on HEp-2 cells and enzyme immunoassay in autoimmune liver diseases . . . . .652

### CLINICAL MOLECULAR STUDIES

*Mardanly S.S., Mardanly S.G., Kazakov A.A., Demkin V.V., Zatevalov A.M., Mironov A.Yu.*

Development of a PCR assay for the detection of human herpes virus type 7 . . . . .658

*Bezrodny S.L., Zhigaleva O.N., Mardanly S.G., Pomazanov V.V., Gashenko T.Yu.*

Development of a reagent kit for the qualitative detection of SARS-CoV-2 virus RNA in naso- and oropharyngeal swabs by real-time RT-PCR . . . . .663

*Shtrek S.V., Blokh A.I., Samoilenko I.E., Sannikov A.V., Bobrova O.A., Shpynov S.N., Rudakov N.V.*

Real-time PCR validation to estimate the number of rickettsias in the biological material under study . . . . .668

### ORGANIZATION LABORATORY SERVICE

*Zhigaleva O.N., Ermolaev I.I., Mardanly S.G., Gashenko T.Yu.*

Analysis of the domestic market for COVID-19 diagnostic kits by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction . . . . .672

*Nazarova V.V., Nikolaev N.S., Tarasova T.S., Dobrovol'skaya N.Yu., Preobrazhenskaya E.V.*

Using experience during the COVID-19 pandemic to ensure the quality of PCR studies . . . . .678

## БИОХИМИЯ

© ЖЛОБА А.А., СУББОТИНА Т.Ф., 2022

Жлоба А.А., Субботина Т.Ф.

### МЕТИОНИН И ОБЩИЙ ГОМОЦИСТЕИН КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ В УСЛОВИЯХ ЭКСКРЕТОРНОЙ ДИСФУНКЦИИ ПОЧЕК

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

*Роль почек в метаболизме и гомеостазе серосодержащих аминокислот велика, поэтому показатели метионина (Мет), общего гомоцистеина (оГци) и их соотношения могут иметь диагностическое значение при хронических заболеваниях почек, в том числе, в условиях артериальной гипертензии (АГ). Цель исследования – изучение соотношения Мет/оГци у пациентов с АГ в сочетании с хронической болезнью почек (ХБП). Использовали плазму крови 76 пациентов возрастом 40-75 лет с АГ и дисфункцией экскреторной функции почек, подгрупп: 1- с протеинурией (n=37); 2- без протеинурии со скоростью клубочковой фильтрации (СКФ) < 90 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup> (n=39) и группу сравнения 3 – пациенты с АГ без экскреторной дисфункции почек (n=28). Значительно пониженный уровень Мет был в подгруппе 1. Уровни оГци были выше в подгруппах 1 и 2, чем в группе 3. Отношение Мет/оГци выявило различия подгрупп 1 – 2 с группой 3. Различий в уровнях Arg и Lys не обнаружено. Выявлены положительные корреляции соотношения Мет/оГци с количеством эритроцитов, но не с уровнем гемоглобина. При ROC-анализе точки отсечения для соотношения Мет/оГци в сопоставлении с группой 3 составили для подгруппы 1 – 3,08, а 2 – 3,36. При прогрессировании ХБП наблюдается повышение уровней оГци в крови и снижение содержания Мет. Снижение СКФ, в особенности при протеинурии, сопровождается понижением уровня Мет. Соотношение Мет/оГци выше 3,36 можно рассматривать в качестве минимально необходимого баланса между этими серосодержащими аминокислотами крови при ХБП и АГ.*

**Ключевые слова:** метионин; гомоцистеин; артериальная гипертензия; протеинурия.

**Для цитирования:** Жлоба А.А., Субботина Т.Ф. Метионин и общий гомоцистеин крови у пациентов с артериальной гипертензией в условиях экскреторной дисфункции почек. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (11): 625-632. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-11-625-632>

**Для корреспонденции:** Жлоба Александр Анатольевич, д-р мед. наук, проф., рук. отдела биохимии научно-образовательного института биомедицины; e-mail: zhlobaaa@1spbгmu.ru

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

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

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

Поступила 09.06.2022

Принята к печати 25.08.2022

Опубликовано 14.11.2022

Zhloba A.A., Subbotina T.F.

#### METHIONINE AND TOTAL HOMOCYSTEINE IN HYPERTENSIVE PATIENTS WITH RENAL EXCRETORY DYSFUNCTION

Pavlov First Saint Petersburg State Medical University of Minzdrav of Russia, 197022, Saint- Petersburg, Russia

*The role of the kidneys in the metabolism and homeostasis of sulfur-containing amino acids is great, so the levels of methionine (Met), total homocysteine (tHcy) and their ratios can be of diagnostic value in chronic kidney disease (CKD), in a course of the arterial hypertension (AH). The aim of the study was to evaluate the Met/tHcy ratio in hypertensive patients with CKD.*

*We used blood plasma of 76 patients aged 40-75 years with AH and the excretory dysfunction of the kidneys; subgroups: 1 – with proteinuria (n=37); 2 – without proteinuria with glomerular filtration rate (GFR) < 90 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> (n=39) and comparison group 3 – patients with AH without renal excretory dysfunction (n=28). Significantly lower Met levels were in subgroup 1. tHcy levels were higher in subgroups 1 and 2 than in group 3. The Met/tHcy ratio revealed differences in subgroups 1 and 2 vs group 3. No differences were found in Arg and Lys levels. Positive correlations of the Met/tHcy ratio with the number of erythrocytes, but not with the level of hemoglobin, were revealed. In the ROC analysis, the cut-off points for the Met/tHcy ratio compared to group 3 were 3.08 for subgroup 1 and 3.36 for subgroup 2. With the progression of CKD, there is an increase in the levels of tHcy in the blood, and a decrease in the content of Met. A decrease in GFR, especially in a case with proteinuria, is accompanied by a decrease in the level of Met. The Met/tHcy ratio above 3.36 can be considered as the minimum of the balance between these sulfur-containing amino acids contents in a blood necessary for hypertensive patients with CKD.*

**Key words:** methionine; homocysteine; arterial hypertension; proteinuria.

**For citation:** Zhloba A.A., Subbotina T.F. Methionine and total homocysteine in hypertensive patients with renal excretory dysfunction. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (11): 625-632 (in Russ.) DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-11-625-632>

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

**Information about authors:**

Zhloba A.A., <https://orcid.org/0000-0003-0605-7617>;  
Subbotina T.F., <https://orcid.org/0000-0002-2278-8391>.

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

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

Received 09.06.2022

Accepted 25.08.2022

Published 14.11.2022

**Введение.** При хронической болезни почек (ХБП) большое диагностическое значение имеют лабораторные технологии определения отклонений в экскреторной, эндокринной и метаболической функциях почек [1-4]. Поскольку роль почек в метаболизме серосодержащих аминокислот велика, то при нарушении их метаболических и экскреторных функций, как правило, возникает гипергомоцистеинемия [5]. Для гомеостаза серосодержащих аминокислот большое значение имеют пути утилизации гомоцистеина (Гци), возникающего из аминокислоты метионина (Мет) в результате реакций трансметилирования в различных тканях. Так как большая часть Гци преимущественно в печени подвергается реметилированию, остающиеся количества Гци доступны ферментативному превращению в другие серосодержащие метаболиты в цистатиониновом пути, локализованном преимущественно в тканях почек, печени, мозга и поджелудочной железы [6-7]. Оценка общего гомоцистеина (оГци) при ХБП даёт некоторое представление о нарушении метаболической функции почек [8]. В связи с тем, что Гци возникает из Мет и уровень оГци зависит от метаболизма Мет, возникает вопрос о диагностическом значении определения уровня Мет в крови. Средний уровень Мет в норме превышает уровень оГци в плазме крови примерно в 5-6 раз [9]. Как показали модельные опыты на клеточных культурах при концентрациях Мет менее 25 мкМ клетки начинают переходить к апоптозу [10]. При пониженном содержании Мет в среде наблюдается гипометилирование жизненно важных метаболитов, включая нуклеиновые кислоты и гистоны. Помимо участия в этих эпигенетических реакциях, Мет используется при синтезе креатина, фосфатидилхолина, нейромедиаторов и других метаболитов и гормонов [9, 11-12].

В лабораторной практике определение уровня Мет проводят крайне редко, несмотря на очевидную роль этой аминокислоты в метаболизме и в регуляции эпигенетических процессов. Снижение скорости метилирования в тканях зависит не только от ингибирующего влияния возрастания уровня оГци, но и от понижения уровня Мет ниже 25 мкМ во внеклеточной среде [10, 13]. В отдельных исследованиях показано, что у пациентов в период острой стадии инсульта уровень Мет возрастает [14-15], в период же восстановления функционального состояния возникает значительное понижение уровня Мет в крови из-за его интенсивного использования в реакциях синтеза азотистых оснований, фосфолипидов при построении клеточных мембран, а также в эпигенетических

реакциях. [16]. Синтез фосфатидилхолина из фосфоэтаноламина, вероятно, является самым мощным потребителем метильных групп Мет у взрослых млекопитающих и, следовательно, крупнейшим источником S-аденозилгомоцистеина – сильного ингибитора метилтрансфераз. Опасным результатом торможения активности метилтрансфераз является нарастание демиелинизации в нервной системе, усиливающейся в условиях нарастания уровня оГци, соответственно. Роль метаболической функции почек в поддержании оптимального соотношения Мет и оГци и диагностические параметры лабораторных показателей этих аминокислот до настоящего времени недостаточно изучены.

Цель исследования: оценка соотношения Мет/оГци у пациентов с ХБП, выявление диагностического значения и целесообразности одновременного определения Мет и оГци.

**Материал и методы.** Сбор клинического материала осуществляли на базе клиник ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России. В исследование включены образцы крови от 76 пациентов в возрасте 40-75 лет с артериальной гипертензией (АГ), находившихся на стационарном лечении в клиниках терапевтического профиля. Критерием включения в исследование было наличие АГ (МКБ 10 I10/ I11/ I12/ I13/ I15). Критериями исключения были: наличие заболеваний печени, онкогематологических и других онкопролиферативных заболеваний, острых нарушений кровообращения и воспалительных процессов, а также состояние беременности. Пациенты были разделены на две подгруппы. Подгруппа 1 – 37 пациентов с протеинурией свыше 150 мг/сут; подгруппа 2 – 39 пациентов, у которых протеинурия не была выявлена, а расчетная скорость клубочковой фильтрации (рСКФ) была незначительно снижена и составляла 60-89 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>. Группу сравнения составили 28 пациентов такого же возраста с АГ без признаков поражения почек (рСКФ > 90 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>, отсутствие протеинурии). Дополнительными критериями исключения для группы сравнения были сахарный диабет (нарушение толерантности к глюкозе допускалось) и дефицит фолиевой кислоты в плазме (менее 7 нМ). Демографические данные, факторы риска и основные общелабораторные показатели представлены в табл. 1.

Материал исследования – плазма крови, взятой утром натощак из кубитальной вены в вакутейнеры с гепарином. Отделение форменных элементов крови путем центрифугирования (580 g, 15 мин) проводили в течение 1 ч после взятия крови. Образцы плазмы до

анализа хранили при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ . Протокол исследования в соответствии с принципами Хельсинкской декларации был одобрен Этическим комитетом ПСПбГМУ им. И.П. Павлова.

Основные биохимические показатели определяли в клинико-диагностической лаборатории ПСПбГМУ им. И.П. Павлова с помощью стандартных наборов фирмы Roche для биохимического анализатора Cobas Integra 400 Plus (Германия). Расчет СКФ проводили по уровню креатинина крови с использованием формулы СКД-ЕРІ, а суточную протеинурию оценивали фотометрическим методом. Определение концентрации общего холестерина проводили с использованием наборов реактивов фирмы «Abbott Clinical Chemistry» (США). Концентрацию фолиевой кислоты определяли методом конкурентного иммунохемилюминесцентного анализа с использованием наборов реагентов, согласно инструкции производителя (Beckman Coulter Inc., США) и иммуноанализатора Access 2 Immunoassay System той же фирмы.

Концентрацию оГци в плазме осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), как описано нами ранее [17,18]. Концентрацию аминокислот Мет, Арг и Лиз определяли методом ВЭЖХ [19].

Статистический анализ выполняли с использованием пакета программ Statistica 10. Соответствие распределения данных нормальному закону оценивали с помощью критериев Шапиро-Уилка и Колмогорова-Смирнова. Распределение большинства переменных отличалось от нормального, поэтому данные в таблицах и в тексте представлены в виде медианы и межквартильного размаха (Ме(Q1-Q3)). Для оценки межгрупповых различий в трех независимых выборках (подгруппы пациентов 1 и 2 и группа сравнения 3) использован непараметрический критерий Краскела-Уоллиса (количественные данные) и точный критерий Фишера (категориальные данные). При необходимости попарного сравнения использован тест Манна-Уитни с поправкой Бонферрони при оценке уровня значимости. Оценка корреляционной связи между показателями проводилась с применением рангового коэффициента Спирмена. Критический уровень достоверности нулевой статистической гипотезы принимали равным 0,05.

**Результаты.** Данные табл. 1 показывают отсутствие значимых различий между обследуемыми группами по возрасту, гендерному составу, частоте курения и уровню артериального давления. В подгруппе 1 значительно чаще встречается сахарный диабет,

Таблица 1

Клинико-лабораторная характеристика обследованных пациентов

Показатель (референсный интервал)	Группа пациентов в целом (n=76)	Подгруппа 1 (n=37)	Подгруппа 2 (n=39)	Группа сравнения (n=28)	p*
Возраст, годы	56 (48-66)	56 (45-65)	56 (52-68)	60 (52-64)	0,37
Мужчины / Женщины	29 / 47	14 / 23	15 / 24	17 / 11	0,065
Курение: да / нет	27 / 49	16 / 21	11 / 28	16 / 12	0,054
САД, мм рт. ст.	140 (130-150)	138 (130-143)	140 (130-150)	130 (120-140)	0,20
ДАД, мм рт. ст.	80 (80-90)	85 (80-90)	80 (80-90)	80 (80-90)	0,35
Сахарный диабет или НТГ, n	28	20	8	5	0,0019
Глюкоза, мМ (3,9 – 6,1)	5,3 (4,9-6,0)	5,3 (4,9-6,1)	5,3 (4,9-5,7)	5,2 (5,0-5,6)	0,87
Общий холестерин, мМ (3,1 – 5,2)	5,1 (4,2-5,8)	4,8 (3,9-5,6)	5,4 (4,5-5,9)	4,6 (3,9-5,4)	0,11
Гемоглобин, г/л (132-164)	127 (111-138)	114 (102-130)	133 (125-148)	134 (120-141)	0,000047
Эритроциты, $\cdot 10^{12}/\text{л}$ (4,1–5,1)	4,4 (3,9-4,8)	4,1 (3,7-4,4)	4,6 (4,3-5,0)	4,4 (4,2-4,9)	0,00076
Среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг (24–33)	29,7 (26,7-31,0)	28,7 (26,2-30,9)	30,1 (28,5-31,0)	29,5 (27,7-30,9)	0,19
Креатинин, мкМ (53–115)	82 (71-100)	93 (65-120)	80 (72-93)	67 (61-73)	0,00014
рСКФ, мл/мин/1,73 м <sup>2</sup> (>90)	75,3 (68,6-86,4)	72,8 (48,8-89,4)	76,7 (71,8-86,3)	97 (91-104)	< 0,000001
Мочевина, мМ (2,5 – 7,3)	5,7 (4,4-8,5)	7,1 (4,6-10,2)	5,1 (4,1-5,9)	3,5 (3,2-4,5)	0,0037
Суточная протеинурия, г/сут	0,32 (0,13-2,08)	0,32 (0,13-2,08)	Нет	Нет	-
Общий белок, г/л (65-85)	71,0 (66,5-74,0)	69,0 (64,0-73,0)	72,0 (68,0-77,5)	72,0 (67,5-73,8)	0,046
Общий билирубин, мкМ (3,4-20,5)	11,7 (8,1-15,5)	9,8 (7,5-13,1)	13,9 (9,2-17,6)	12,2 (7,8-13,7)	0,065
АСТ, Е/л (10-40)	18 (15-22)	18 (14-21)	18 (16-22)	18 (15-24)	0,82
АЛТ, Е/л (10-42)	15 (12-19)	15 (12-21)	15 (12-17)	16 (12-24)	0,77

Примечание. \* – Данные представлены в виде медианы и квартилей. Достоверность различий между подгруппами пациентов и группой сравнения оценивали с помощью теста Краскела-Уоллиса (количественные данные) и точного критерия Фишера (категориальные данные). Результаты попарного сравнения (тест Манна-Уитни с поправкой Бонферрони) отражены в тексте. НТГ – нарушение толерантности к глюкозе; САД – систолическое артериальное давление; ДАД – диастолическое артериальное давление; ИМТ – индекс массы тела; рСКФ – расчетная скорость клубочковой фильтрации; АСТ – аспаргатаминотрансфераза; АЛТ – аланинаминотрансфераза.

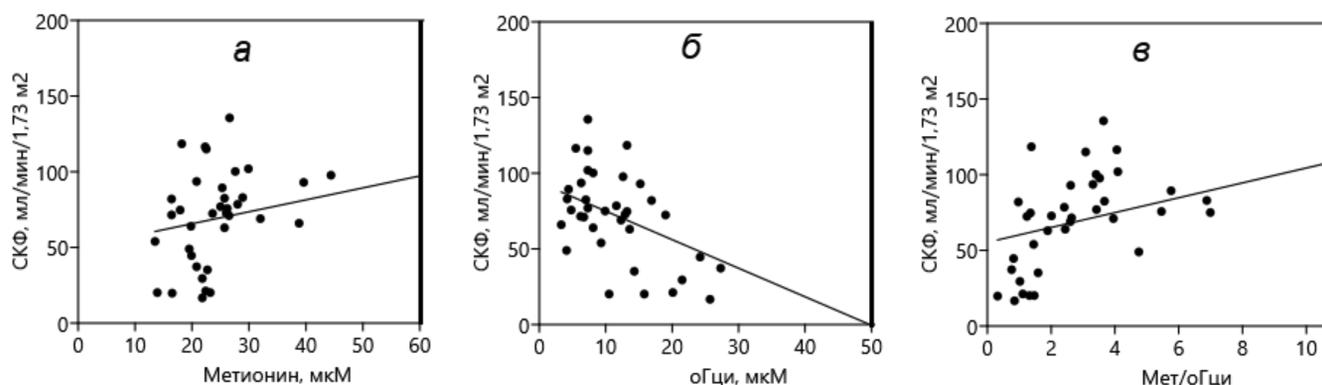


Рис. 1. Корреляции рСКФ и уровней Мет (а),  $R_s = 0,39$ ;  $p=0,015$ ; оГци (б),  $R_s = -0,49$ ;  $p=0,0021$  и их соотношения Мет/оГци (в),  $R_s = 0,56$ ;  $p=0,00026$  в подгруппе 1.

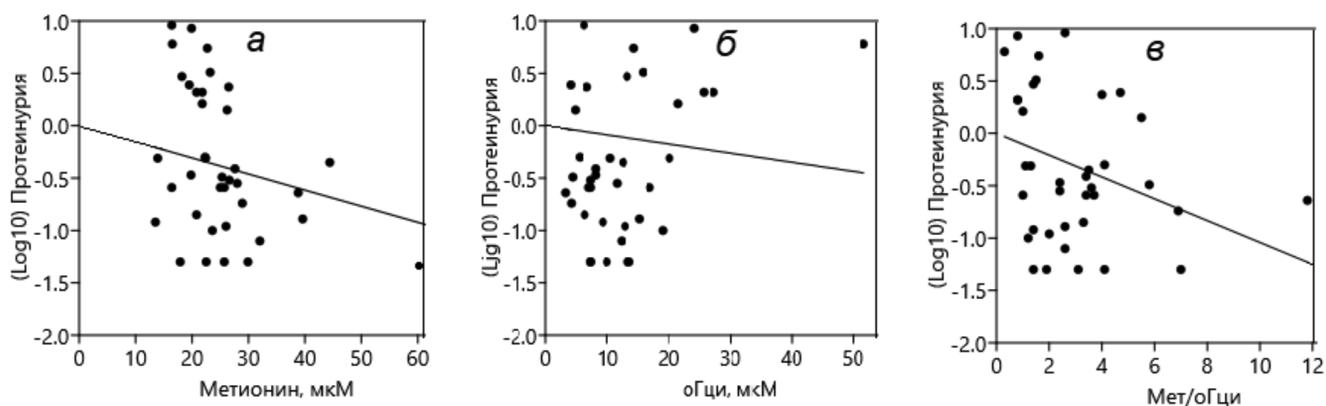


Рис. 2. Корреляции log-преобразованного уровня суточной протеинурии с уровнями Мет (а),  $R_s = -0,40$ ;  $p=0,013$ ; оГци (б),  $R_s = 0,17$ ;  $p=0,30$  и их соотношения Мет/оГци (в),  $R_s = -0,36$ ;  $p=0,028$  в подгруппе 1.

однако он у большинства пациентов носит компенсированный характер, поскольку различий между группами по уровню тощачевой глюкозы не выявлено. Обнаруживаются ожидаемые различия по показателям, характеризующим функцию почек, тогда как различия по показателям функции печени отсутствуют.

В табл. 2 представлены результаты определения аминокислот плазмы в исследуемых группах лиц. В значительном числе случаев (около 50% пациентов и 25% лиц сравнительной группы) уровень Мет был ниже 25 мкМ, что, согласно современным данным, может приводить к существенному торможению трансметилирования, включая эпигенетические реакции. Отмечен достоверно пониженный уровень Мет в подгруппе 1 (пациенты ХБП с протеинурией) относительно группы сравнения 3 ( $p=0,0063$ ). Уровни оГци были выше в обеих подгруппах пациентов, чем в группе сравнения (см. табл. 2). Отношение Мет/оГци выявило достоверные различия между подгруппами пациентов и группой сравнения ( $p=0,0040$  и  $p=0,0083$  для подгрупп 1 и 2, соответственно). Межгрупповых различий в уровнях аргинина (Арг) и лизина (Лиз) не обнаружено.

Выявлены связи уровней аминокислот с важнейшими характеристиками функции почек – рСКФ (рис. 1) и уровнем суточной протеинурии (рис. 2). Эти связи оказались достоверными только у пациентов с ХБП и протеинурией (подгруппа 1). Следует

обратить внимание на то, что корреляция рСКФ с соотношением Мет/оГци выражена более значимо, чем с этими аминокислотами по отдельности. В отличие от серосодержащих аминокислот, уровни Лиз и Арг в подгруппе 1 не коррелировали с показателями функции почек.

Из данных табл. 1 следует, что более чем у 50% пациентов подгруппы 1 отмечались признаки нормохромной анемии. Уровень гемоглобина и количество эритроцитов в этой подгруппе были достоверно ниже, чем в подгруппах 2 и 3, тогда как показатель насыщения эритроцита гемоглобином не различался между подгруппами и укладывался в референсный диапазон. При рассмотрении связей уровней Мет и оГци с показателями состояния гемопоеза обращает на себя внимание их достоверные корреляции с количеством эритроцитов, но не с уровнем гемоглобина. Следует отметить, что наиболее достоверную ранговую корреляцию показало именно соотношение Мет/оГци и только в подгруппе 1 (рис. 3).

Таким образом, показатели экскреторной функции почек и количества эритроцитов могут коррелировать как отдельно с Мет и оГци, так и с их соотношением. Известно, что в норме соотношение Мет/оГци составляет у здоровых лиц около 5 – 6 [9]. Для группы сравнения с рСКФ > 90 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup> соотношение Мет/оГци составило 3,47 (2,82-5,94), а в подгруппе

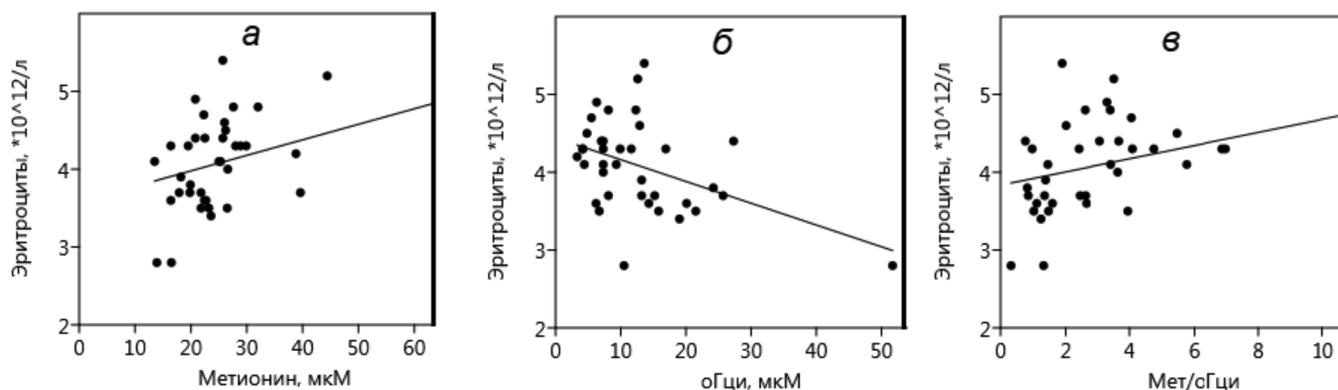


Рис. 3. Корреляции количества эритроцитов и уровней Мет (а),  $R_s = 0,40$ ;  $p = 0,014$ ; оГци (б),  $R_s = -0,35$ ;  $p = 0,032$  и их соотношения Мет/оГци (в),  $R_s = 0,43$ ;  $p = 0,0075$  в подгруппе 1.

Таблица 2

Уровни аминокислот в плазме обследованных пациентов

Показатель (референсный интервал)	Группа пациентов в целом (n=76)	Подгруппа 1 (n=37)	Подгруппа 2 (n=39)	Группа сравнения (3) (n=28)	p*
Общий гомоцистеин, мкМ (<10,9)	10,3 (7,0-14,9)	10,5 (7,0-15,2)	10,2 (6,9-14,3)	8,0 (5,4-10,8)	0,059
Метионин, мкМ (6-40)	24,9 (21,1-28,0)	23,2 (19,9-26,6)	25,6 (22,1-28,1)	27,9 (25,0-33,1)	0,013
Мет /оГци	2,62 (1,60-3,54)	2,60 (1,35-3,67)	2,82 (1,87-3,31)	3,47 (2,82-5,94)	0,0081
Аргинин, мкМ (32-138)	67,0 (58,0-81,5)	66,6 (58,1-78,1)	67,3 (58,8-82,2)	78,0 (60,7-93,0)	0,44
Лизин, мкМ (83-255)	208 (167-234)	193 (161-217)	219 (182-248)	182 (147-227)	0,048

Примечание. \* – Данные представлены в виде медианы и квартилей. Достоверность различий между подгруппами пациентов и группой сравнения оценивали с помощью теста Краскела-Уоллиса. Результаты попарного сравнения (тест Манна-Уитни с поправкой Бонферрони) отражены в тексте.

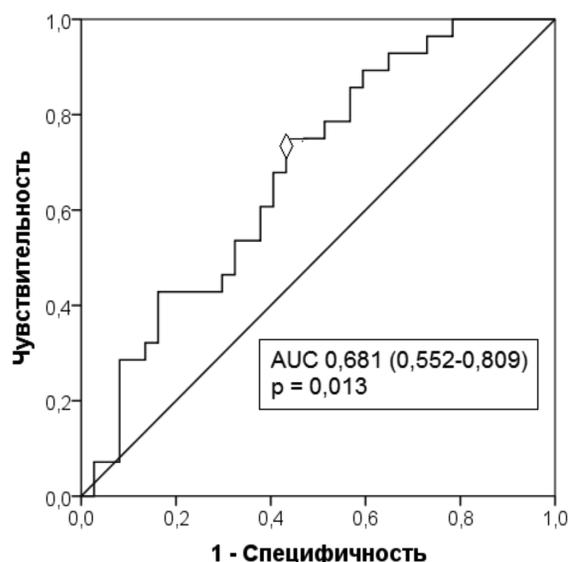


Рис. 4. ROC-кривая диагностической способности показателя Мет/оГци в модели «здоровый (группа 3) – больной ХБП (подгруппа 1)». Отмеченная на графике точка J определяет значение «Cut off» Мет/оГци, соответствующее 3,08.

1 с протеинурией оно оказалось достоверно ниже – 2,60 (1,35-3,67;  $p = 0,040$ ) (табл. 2). При ROC-анализе определено значение точки отсечения для рассма-

триваемого соотношения Мет/оГци равное 3,08 (чувствительность 68%, специфичность 60%) (рис. 4).

Все значения соотношения Мет/оГци ниже 3,08 на основании полученных данных следует рассматривать с точки зрения патологических изменений метаболизма этих аминокислот. Использование уровней Мет и оГци по отдельности не позволяют построить достоверную диагностическую модель. Модель же с использованием подгруппы пациентов 2 вместо подгруппы 1 является достоверной (AUC = 0,716;  $p = 0,003$ ) и дает значение точки отсечения Мет/оГци равное 3,36 (чувствительность 61%, специфичность 77%).

**Обсуждение.** Общеизвестным являются значительные нарушения обмена серосодержащих аминокислот при ХБП. Они проявляются повышением уровня оГци, который весьма токсичен в отношении эндотелиоцитов и других клеток [7]. Незаменимая аминокислота Мет также оказывает значительное воздействие на состояние тканей. В одном из проспективных исследований 4156 пациентов обнаружено, что пониженные уровни Мет в плазме связаны с риском развития инфаркта миокарда [20]. Это согласуется с результатами исследований на клеточных моделях, в которых показано, что клетки в культуре тканей переходят к апоптозу, если содержание Мет во внеклеточной среде падает ниже 25 мкМ [10]. В этом случае возникает эффект гипометилирования, веду-

щий к дестабилизации генома. Содержание Мет в плазме или сыворотке крови по данным ведущих руководств по клинической лабораторной диагностике может колебаться в очень широких пределах от 6 до 40 мкМ [21]. При рассмотрении же однородных групп пациентов или динамики Мет у отдельных пациентов уровень этого показателя в плазме крови, взятой натощак, группируется в узком диапазоне концентраций [22-25]. В свете современных данных, в случае содержания Мет во внеклеточных средах ниже 25 мкМ, следует ожидать неблагоприятные условия для проявления активности трансметилаз.

Ткани почек оказывают значительное влияние на уровень оГци в плазме крови, так как путь утилизации этого метаболита путем транссульфирования в организме ограничен тканями почек, печени, мозга и поджелудочной железы [26]. Этот метаболический путь, по-видимому, нарушается параллельно снижению СКФ, в особенности, если наблюдается протеинурия (см. табл. 2, рис. 1). Следует отметить, что возрастание уровня оГци при ХБП, не может быть компенсировано в достаточной мере за счет реметилирования Гци в Мет в реакциях, катализируемых метилентетрагидрофолатредуктазой (МТГФР) [27], что наблюдается при прогрессировании ХБП [28]. Отчасти это можно объяснить тем, что при ХБП нарушается образование почечного фактора стимуляции реабсорбции и всасывания фолиевой кислоты в кишечнике [29]. Реметилирование Гци с образованием Мет представлено, прежде всего, в ткани печени. Как показывают многочисленные исследования, несмотря на сохранение метаболической функции печени, при нарушении функций почек реакций реметилирования часто недостаточно для нормализации уровня оГци. В нашем исследовании показано, что при ХБП наблюдается коррелирующее с СКФ понижение уровня Мет в системном кровотоке. За счет этого у лиц с одновременным повышением уровня оГци и снижением содержания Мет может наблюдаться системное полиорганное торможение реакций метилирования. Данное исследование показало, что у пациентов с АГ и рСКФ > 90 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup> соотношение Мет/оГци составило 3,47 (2,82-5,94), а уровень Мет у них колебался в пределах 27,9 (25,0-33,1) мкМ, тогда как у пациентов в подгруппе 1 с ХБП и протеинурией уровни Мет были достоверно ниже, а соотношение Мет/оГци составило в среднем 2,62 (1,60-3,54). Согласно ROC-анализу, у пациентов с ХБП и протеинурией наблюдается уровень Мет/оГци ниже 3,08 (рис. 4), а в группе пациентов без протеинурии, но с СКФ < 90 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup> наблюдается соотношение Мет/оГци менее 3,36. Таким образом, при прогрессировании ХБП наблюдается не только повышение уровней оГци в крови, но и снижение содержания Мет. Эти лабораторные показатели характеризуют роль почек в обеспечении условий гомеостаза серосодержащих аминокислот.

Развитие нарушений метаболических функций почек с понижением соотношения Мет/оГци в конечном итоге вызовет торможение метилирования различных субстратов. Мы показали, что снижение СКФ, в осо-

бенности при протеинурии сопровождается понижением уровня Мет, при этом соотношение Мет/оГци снижается с очень высокой статистической значимостью. Наибольшее влияние снижение указанного соотношения может оказать на ткани нервной системы, в которых использование метильных групп особенно велико. В частности, метилирование является критическим этапом при биосинтезе миелина [14]. Известно, что не только гипометилирование вследствие снижения уровня Мет и повышения уровня Гци, но и гиперметилирование приводят к патогенетическим последствиям при сердечно-сосудистых заболеваниях вследствие нарушений эпигенетических реакций метилирования ДНК и белков [9, 20, 30, 31].

Одновременное определение уровней Мет и оГци не часто используют в лабораторной медицине. Несмотря на очевидную метаболическую взаимосвязь этих серосодержащих аминокислот, их совместное определение и анализ связей с другими метаболическими изменениями проводятся редко. В данной работе показана связь этих показателей с функциональным состоянием тканей почек. Данные литературы свидетельствуют о том, что, в отличие от серосодержащих аминокислот, нарушение гомеостаза других аминокислот при прогрессировании АГ с развитием экскреторной дисфункции почек, связано, как правило, с ухудшением трансмембранного переноса, а не внутриклеточного метаболизма [13, 32, 33]. В данном исследовании показано, что сдвиг в содержании Мет и оГци в крови выражен в большей мере, чем – Арг или Лиз. На уровень серосодержащих аминокислот наряду с трансмембранным транспортом оказывает влияние также и метаболическая функция почек. Как показано в настоящей работе, по мере снижения СКФ и прогрессирования протеинурии поддержание баланса Мет/оГци в крови выше 3,08 затрудняется. Для практического определения нарушения метаболической функции почек можно использовать показатель Мет/оГци, отражающий состояние метаболических путей метилирования и реметилирования в организме. Диагностическое значение Мет и оГци и их соотношения в крови при патологических состояниях, сопровождающихся гиперметилированием, ещё предстоит изучить. Так как коррекцию заторможенного пути метилирования Гци в Мет проводят, дозируя приём фолиевой кислоты и бетаинов, лабораторный критерий достижения соотношения Мет/оГци выше 3,36 при содержании метионина выше 25 мкМ можно считать целевой характеристикой для ведения пациентов с нарушением баланса серосодержащих аминокислот. Таким образом, в настоящей работе приведены количественные характеристики метаболической функции почек в отношении Мет и оГци при ХБП.

**Выводы.** При прогрессировании ХБП наблюдается как повышение уровня оГци, так и снижение уровня Мет. Снижение соотношения Мет/оГци ниже 3,08 характерно для пациентов с ХБП и протеинурией, а для пациентов со снижением СКФ ниже 90 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup> это соотношение в большинстве случаев ожидается ниже 3,36. Одновременное повышение оГци и снижение уровня Мет в крови выражено в большей степе-

ни у пациентов с протеинурией и коррелирует с ней. Нарушение метаболической функции почек при ХБП сопровождается значительным влиянием на соотношение Мет/оГци, что предопределяет нарушение условий трансметилирования в различных тканях.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 5, 6, 9-16, 18, 20-24, 26-32  
см. REFERENCES)

1. Гуссаова С.С., Бобкова И.Н., Яшков Ю.И., Бордан Н.С., Ставровская, Е.В., Бекузаров Д.К. и др. Изменение метаболических показателей и скорости клубочковой фильтрации у больных морбидным ожирением после бариатрических операций. *Терапевтический архив*. 2020; 92 (6): 53–9. DOI: 10.26442/00403660.2020.06.000674.
2. Михайлова Н.А. Значение малобелковой диеты и препаратов кетоаналогов незаменимых аминокислот в контроле над карбамилрованием белков и токсическими эффектами мочевины при хронической болезни почек. *Терапевтический архив*. 2021; 93 (6): 729–35. DOI: 10.26442/00403660.2021.06.200915;
3. Шоломова В.И., Самоходская Л.М., Балацкий А.В., Бровко М.Ю., Краснова Т.Н., Сагинова Е.А. и др. Формирование метаболических нарушений, артериальной гипертензии и хронической болезни почек у пациентов с избыточной массой тела: вклад полиморфизма генов ангиотензина, NO-синтазы, интерлейкинов-1β и -6. *Технологии живых систем*. 2018; 15(1): 20–8.
4. Бобкова И.Н., Камышова Е.С., Чеботарева Н.В. Проба Реберга-Тарева в оценке скорости клубочковой фильтрации. *Терапевтический архив*. 2021; 93(10): 1246–8. DOI: 10.26442/00403660.2021.10.201119.
7. Бурденный А.М., Логинов В.И., Заварыкина Т.М., Брага Э.А., Кубатиев А.А. Молекулярно-генетические нарушения генов фолатного и гомоцистеинового обмена в патогенезе ряда многофакторных заболеваний. *Генетика*. 2017; 53(5): 526–40.
8. Худякова Н. В., Пчелин И. Ю., Шишкин А. Н., Смирнов В. В., Иванов Н. В., Макаренко М. В. И др. Гипергомоцистеинемия у мужчин с метаболическим синдромом и ранними стадиями хронической болезни почек. *Артериальная гипертензия*. 2017; 23(2): 141–9. DOI:10.18705/1607-419X-2017-23-2-141-149.
17. Жлоба А.А. Лабораторная диагностика при гипергомоцистеинемии. *Клинико-лабораторный консилиум*. 2009; 26(1): 49–60.
19. Жлоба А.А., Субботина Т.Ф., Шипаева К.А. Способ определения содержания гомоаргинина в плазме крови и других биологических жидкостях человека. Патент РФ № 2609873; 2017.
25. Субботина Т.Ф., Жлоба А.А., Алексеевская Е.С., Бируля И.В. Интерпретация аминокислотного профиля плазмы крови с использованием полимаркерного подхода. *Ученые записки СПбГМУ*. 2015; 22(4): 76–80.
33. Полушин Ю. С., Субботина Т. Ф., Молчан Н. С., Жлоба А. А. Влияние общей анестезии на метаболизм метионина в период искусственного кровообращения. *Вестник анестезиологии и реаниматологии*. 2020; 17(4): 59–68. DOI: 10.21292/2078-5658-2020-17-4-59-68.

REFERENCES

1. Gussaova S.S., Bobkova I.N., Yashkov Yu.I., Bordan N.S., Stavrovskaya, E.V., Bekuzarov D.K. et al. Changes in metabolic parameters and glomerular filtration rate in patients with morbid obesity after bariatric surgery. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2020; 92 (6): 53–9. DOI: 10.26442/00403660.2020.06.000674. (in Russian)
2. Mikhaylova N.A. The value of a low-protein diet and ketoanalogues of essential amino acids in the control of protein carbamylation and toxic effects of urea in chronic kidney disease. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2021; 93 (6): 729–35. DOI: 10.26442/00403660.2021.06.200915. (in Russian)
3. Sholomova V.I., Samokhodskaya L.M., Balatskiy A.V., Brovko M.Yu., Krasnova T.N., Saginova E.A. et al. Progression of meta-

- bolic disorders, arterial hypertension and chronic kidney disease in patients with excessive body weight: the contribution of polymorphism of the genes of angiotensin, NO-synthase, interleukins-1β and -6. *Tekhnologii zhivyykh sistem*. 2018; 15(1): 20–8. (in Russian)
4. Bobkova I.N., Kamyshova E.S., Chebotareva N.V. The Rehberg-Tareev test in assessing the glomerular filtration rate. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2021; 93(10): 1246–8. DOI: 10.26442/00403660.2021.10.201119. (in Russian)
5. Wang Y.N., Xia H., Song Z.R., Zhou X.J., Zhang H. (2022) Plasma homocysteine as a potential marker of early renal function decline in IgA nephropathy. *Front. Med.* 2022; 9: 812552. DOI: 10.3389/fmed.2022.812552.
6. Zuhra K., Augsburg F., Majtan T, Szabo C. Cystathionine-β-synthase: molecular regulation and pharmacological inhibition. *Biomolecules*. 2020; 10(5): 697. DOI:10.3390/biom10050697.
7. Burdeny A.M., Loginov V.I., Braga E.A., Kubatiev A.A., Zavar'ykina T.M. The role of molecular genetic alterations in genes involved in folate and homocysteine metabolism in multifactorial diseases pathogenesis. *Genetika*. 2017; 53 (5): 528–41. (in Russian)
8. Khudyakova N.V., Pchelin I.Yu., Shishkin A.N., Smirnov V.V., Ivanov N.V., Makarenko M.V. et al. Hyperhomocysteinemia in men with metabolic syndrome and early stages of chronic kidney disease. *Arterial'naya gipertenziya*. 2017; 23(2): 141–9. DOI:10.18705/1607-419X-2017-23-2-141-149. (in Russian)
9. Yi P., Melnyk S., Pogribna M., Pogribny I.P., Hine R.J., James S.J. Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. *J. Biol. Chem.* 2000; 275(38): 29318–23. DOI: 10.1074/jbc.M002725200.
10. Shiraki N., Shiraki Y., Tsuyama T., Obata F., Miura M., Nagae G. et al. Methionine metabolism regulates maintenance and differentiation of human pluripotent stem cells. *Cell Metab.* 2014; 19(5): 780–94. DOI: 10.1016/j.cmet.2014.03.017.
11. Yu D., Yang S.E., Miller B.R., Wisinski J.A., Sherman D.S., Brinkman J.A. et al. Short-term methionine deprivation improves metabolic health via sexually dimorphic, mTORC1-independent mechanisms. *FASEB J*. 2018; 32(6): 3471–82. DOI: 10.1096/fj.201701211R.
12. Yamamoto J., Inubushi S., Han Q., Tashiro Y., Sugisawa N., Hamada K. et al. Linkage of methionine addiction, histone lysine hypermethylation, and malignancy. *iScience*. 2022; 25(4): 104162. DOI: 10.1016/j.isci.2022.104162.
13. Mahbub M.H., Yamaguchi N., Takahashi H., Hase R., Yamamoto H., Kikuchi S. et al. Relationship of reduced glomerular filtration rate with alterations in plasma free amino acids and uric acid evaluated in healthy control and hypertensive subjects. *Sci Rep*. 2019; 9(1): 10252. DOI: 10.1038/s41598-019-46598-7.
14. Goulart V.A.M., Sena M.M., Mendes T.O., Menezes H.C., Cardeal Z.L., Paiva M.J.N. et al. Amino acid biosignature in plasma among ischemic stroke subtypes. *Biomed. Res. Int.* 2019; 2019: 8480468. DOI: 10.1155/2019/8480468.
15. Szpetnar M., Hordyjewska A., Malinowska I., Golab P., Kurzepa J. The fluctuation of free amino acids in serum during acute ischemic stroke. *Curr. Issues Pharm. Med. Sci.* 2016; 29(4): 151–4.
16. Vinknes K.J., Refsum H., Turner C., Khaw K.T., Wareham N.J., Forouhi N.G. et al. Plasma sulfur amino acids and risk of cerebrovascular diseases: a nested case-control study in the EPIC-norfolk cohort. *Stroke*. 2021; 52(1): 172–80. DOI: 10.1161/STROKEAHA.120.029177.
17. Zhloba A.A. Laboratory diagnosis of hyperhomocysteinemia. *Kliniko-laboratornyi konsilium*. 2009; 26(1): 49–60. (in Russian)
18. Zhloba A.A., Subbotina T.F. Homocysteinylolation score of high molecular weight plasma proteins. *Amino Acids*. 2014; 46(4): 893–9.
19. Zhloba A.A., Subbotina T.F., Shipaeva K.A. The way for determining the content of homoarginine in blood plasma and other biological fluids of human. Патент РФ N 2609873; 2017. (in Russian)
20. Dhar I., Lysne V., Seifert R., Svingen G.F.T., Ueland P.M., Nygård O.K. Plasma methionine and risk of acute myocardial infarction: Effect modification by established risk factors. *Atherosclerosis*. 2018; 272: 175–81. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.03.038.
21. Laposata's Laboratory Medicine: Diagnosis of Disease in the Clinical Laboratory. 3<sup>rd</sup> ed. Laposata M., ed.; 2019, McGraw Hill.

BIOCHEMISTRY

- Available at: <https://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2503&sectionid=201361245> (Accessed 27 August 2022).
22. Corso G. Serum amino acid profiles in normal subjects and in patients with or at risk of Alzheimer dementia. *Dement. Geriatr.Cogn. Dis. Extra.* 2017; 7(1): 143–59. Published online 2017 May 4. DOI: 10.1159/000466688.
  23. Geidenstam N., Magnusson M., Danielsson A.P.H., Gerszten R.E., Wang T.J., Reinius L.E. et al. Amino acid signatures to evaluate the beneficial effects of weight loss. *Int. J. Endocrinol.* 2017: 6490473. DOI:10.1155/2017/6490473.
  24. Dhar I., Svingen G.F.T., Ueland P.M., Lysne V., Svenningsson M.M., Tell G.S. et al. Plasma cystathionine and risk of incident stroke in patients with suspected stable angina pectoris. *J. Am. Heart Assoc.* 2018; 7(17): e008824.
  25. Subbotina T.F., Zhloba A.A., Alekseevskaya E.S., Birulya I.V. Interpretation of plasma amino acid profile using multiple marker approach *Uchenye Zapiski SPbGMU.* 2015; 22(4): 76-80. (in Russian)
  26. Hine C., Mitchell J.R. Calorie restriction and methionine restriction in control of endogenous hydrogen sulfide production by the transsulfuration pathway. *Exp. Gerontol.* 2015; 68: 26-32. DOI: 10.1016/j.exger.2014.12.010.
  27. Stipanuk M.H. Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annu. Rev. Nutr.* 2004; 24: 539-77. DOI: 10.1146/annurev.nutr.24.012003.132418.
  28. Krumdieck C.L., Prince C.W. Mechanisms of homocysteine toxicity on connective tissues: implications for the morbidity of aging. *J. Nutr.* 2000; 130(2S Suppl): 365S-368S. DOI: 10.1093/jn/130.2.365S.
  29. Yang C., Wijerathne C.U.B., Tu G.W., Woo C.W.H., Siow Y.L., Madduma Hewage S. et al. Ischemia-reperfusion injury reduces kidney folate transporter expression and plasma folate levels. *Front Immunol.* 2021;12: 678914. DOI: 10.3389/fimmu.2021.678914.
  30. Xiao Y., Su X., Huang W., Zhang J., Peng C., Huang H. et al. Role of S-adenosylhomocysteine in cardiovascular disease and its potential epigenetic mechanism. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2015; 67: 158-66.
  31. Santana Bezerra H., Severo de Assis C., Dos Santos Nunes M.K., Wanderley de Queiroga Evangelista I., Modesto Filho J., Alves Pegado Gomes C.N. et al. The MTHFR promoter hypermethylation pattern associated with the A1298C polymorphism influences lipid parameters and glycemic control in diabetic patients. *Diabetol. Metab. Syndr.* 2019; 11: 4. DOI: 10.1186/s13098-019-0399-9.
  32. Maltais-Payette I., Boulet M.M., Prehn C., Adamski J., Tchernof A. Circulating glutamate concentration as a biomarker of visceral obesity and associated metabolic alterations. *Nutr. Metab. (Lond).* 2018; 15: 78. DOI: 10.1186/s12986-018-0316-5.
  33. Polushin Yu. S., Subbotina T. F., Molchan N. S., Zhloba A. A. The impact of general anesthesia on methionine metabolism during cardiopulmonary bypass. *Vestnik anesteziologii i reanimatologii.* 2020; 17(4): 59-68. DOI: 10.21292/2078-5658-2020-17-4-59-68. (in Russian)

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Титов В. Ю.<sup>1</sup>, Ананкина А. А.<sup>2</sup>, Осипов А. Н.<sup>1</sup>, Шалина Р. И.<sup>2</sup>, Иванова Е. А.<sup>1,2</sup>, Попова М. В.<sup>1,2</sup>

## ВОЗМОЖНОСТИ ДИАГНОСТИКИ ВНУТРИУТРОБНОГО ИНФИЦИРОВАНИЯ ПО СОДЕРЖАНИЮ НИТРИТА И НЕТИОЛАТНЫХ НИТРОЗОСОЕДИНЕНИЙ В ПЛАЗМЕ МАТЕРИНСКОЙ КРОВИ

<sup>1</sup>ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова Минздрава РФ, кафедра общей и медицинской биофизики, 117997, Москва, Россия;

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава РФ, кафедра акушерства и гинекологии педиатрического факультета, 117997, Москва, Россия

*Цель исследования – разработка метода ранней диагностики внутриутробной инфекции (ВУИ). Проведено одномоментное исследование маркеров воспаления в венозной крови 60 пациенток с последующей ретроспективной оценкой исходов беременностей и родов. Из них: 33 пациентки со сроком гестации более 37 нед ( доношенная беременность) и 27 пациенток, у которых исследование проведено в сроке менее 37 нед с угрозой преждевременных родов (ПР), представляющих основную опасность развития ВУИ. У 27 пациенток диагностирован преждевременный разрыв плодных оболочек (ПРПО). Из них 15 – с угрозой ПР. У 8 из них диагностирована ВУИ. У всех пациенток с ПРПО, в том числе с ВУИ, концентрация нитрита и нетиолатных нитрозосоединений ( $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ ) в плазме крови матери составила  $2,3 \pm 1,2$  мкМ, в то время как в норме она не превышает 0,1 мкМ вне зависимости от срока беременности ( $p < 0,001$ ). Применение антибиотиков при ПРПО способствовало нормализации концентрации ( $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ ). Можно предположить, что повышение этого показателя связано с бактериальной инфекцией. Показания других маркеров воспаления: количество лейкоцитов в венозной крови и в мазке влагалищного содержимого, уровень С-РБ достоверно не изменялись как при ПРПО, так и при ВУИ ( $p > 0,1$ ). Поскольку показатель концентрации ( $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ ) повышался практически во всех случаях ПРПО, в отличие от всех других, используемых в современной медицине клинических и биохимических показателей, есть очевидный смысл его применения для текущего контроля состояния беременных, особенно при угрозе ПР. О возможности контроля состояния плода по концентрации ( $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ ) в крови матери, пока однозначно утверждать нельзя.*

**Ключевые слова:** оксид азота; нитрит; нетиолатные нитрозосоединения, преждевременные роды; преждевременный разрыв плодных оболочек; внутриутробная инфекция.

**Для цитирования:** Титов В.Ю., Ананкина А.А., Осипов А.Н., Шалина Р.И., Иванова Е.А., Попова М.В. Возможности диагностики внутриутробного инфицирования по содержанию нитрита и нетиолатных нитрозосоединений в плазме материнской крови. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (11): 633-639. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-11-633-639>

**Для корреспонденции:** Титов Владимир Юрьевич, д-р биол. наук, вед. науч. сотр. отд. медицинской биофизики; e-mail: vtitov43@yandex.ru

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки

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

Поступила 11.07.2022

Принята к печати 26.07.2022

Опубликовано 14.11.2022

*Titov V. Yu.<sup>1</sup>, Osipov A. N.<sup>1</sup>, Shalina R. I.<sup>2</sup>, Anankina A. A.<sup>2</sup>, Ivanova E. A.<sup>1,2</sup>, Popova M. V.<sup>1,2</sup>*

## THE POSSIBILITY OF DIAGNOSING INTRAUTERINE INFECTION BY THE CONTENT OF NITRITE AND NON-THIOLATE NITROSO COMPOUNDS IN MATERNAL BLOOD PLASMA

<sup>1</sup>Department of general and medical biophysics of Russian National Research Medical University n.a. N.I.Pirogov, 117997, Moscow, Russian Federation;

<sup>2</sup>Department of obstetrics and gynecology of Russian National Research Medical University n.a. N.I.Pirogov, 117997, Moscow, Russian Federation

*The aim of the study is to develop a method for early diagnosis of intrauterine infection (IUI). A study of markers of inflammation in the venous blood of 60 pregnant women was conducted. The study was followed by a retrospective assessment of the outcomes of pregnancies and childbirth. Of these, 33 patients with a gestation period of more than 37 weeks (full-term pregnancy) and, accordingly, 27 patients from whom the blood sample was taken at a period of less than 37 weeks – patients with the threat of premature birth (PB). PB is the main factor contributing to the development of IUI. 27 patients were diagnosed with premature rupture of the membranes (PROM). Of these, 15 are with the threat of PB. 8 of them had a diagnosed IUI. In all cases of diagnosed PROM, including those with IUI, the concentration of nitrite and nontiolate nitroso compounds ( $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ ) in the mother's blood plasma was  $2.3 \pm 1.2$   $\mu\text{M}$ , while normally it does not exceed 0.1  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ). Regardless of the duration of pregnancy. The use of antibiotics in the case of PROM contributed to the normalization of the concentration ( $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ ). Therefore, increasing of this indicator is result of bacterial infection. Indications of other markers of inflammation: the number of leukocytes in venous blood and in a smear of vaginal contents, the level of C-RB did not significantly change in both PROM and IUI ( $p > 0.1$ ). Since the concentration index ( $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ ) increased in almost all cases of PREM, unlike all other clinical and biochemical indicators used in modern medicine, there is an obvious sense of its use for the current monitoring of the health of pregnant women. But it is still impossible to say unequivocally about the possibility of monitoring the fetal health by concentration ( $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ ) in the mother's blood.*

**Key words:** nitric oxide; nitrite; nontiolate nitroso compounds; premature birth; premature rupture of fetal membranes; intrauterine infection.

**For citation:** Titov V. Yu., Osipov A. N., Shalina R. I., Anankina A. A., Ivanova E. A., Popova M. V. The possibility of diagnosing intrauterine infection by the content of nitrite and non-thiolate nitroso compounds in maternal blood plasma. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (11): (in Russ.). 633-639. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-11-633-639>

**For correspondence:** *Titov Vladimir Yurievich*, Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher of the Department of Medical Biophysics, Institute of Translational Medicine; e-mail: [vtitov43@yandex.ru](mailto:vtitov43@yandex.ru)

**Information about authors:**

Titov V. Yu., <https://orcid.org/0000-0002-2639-7435>;  
Osipov A. N., <https://orcid.org/0000-0001-7244-2818>;  
Shalina R. I., <https://orcid.org/0000-0001-7121-1663>;  
Anankina A. A., <https://orcid.org/0000-0002-0223-0868>;  
Ivanova E. A., <https://orcid.org/0000-0003-3635-1550>;  
Popova M. V., <https://orcid.org/0000-0002-3671-780X>.

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

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

Received 11.07.2022

Accepted 26.07.2022

Published 14.11.2022

**Введение.** В структуре перинатальной заболеваемости и смертности внутриутробная инфекция (ВУИ) занимает ведущее место [1-4]. Одним из основных факторов риска развития ВУИ является преждевременный разрыв плодных оболочек (ПРПО), произошедший до 37 недели гестации [5-7]. Антенатальная диагностика ВУИ затруднена тем, что этот процесс у матери может проходить бессимптомно [8]. УЗИ способно зафиксировать изменения, развившиеся вследствие уже начавшегося процесса [8]. Методы, обладающие высокой чувствительностью и специфичностью, требуют инвазивного вмешательства (амниоцентез, кордоцентез). Их применение оправдано при наличии клинических симптомов [9]. Необходим неинвазивный метод, обладающий высокой чувствительностью и специфичностью, с возможностью массового и систематического контроля.

Предложен метод ранней диагностики воспалительных процессов, основанный на регистрации содержания нитрита и нетиолатных нитрозосоединений ( $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ ) в плазме крови при помощи запатентованного ферментного сенсора, основанного на обратимом ингибировании фермента каталазы нитритом и нитрозосоединениями и утрате ими способности ингибировать под действием ряда веществ, специфичных для каждой группы этих соединений [10-12]. Впоследствии сенсоры, основанные на этом принципе, предложены рядом исследователей [13-16]. Нитрит и нетиолатные нитрозосоединения являются продуктами взаимодействия супероксидного аниона, продуцируемого активированными лейкоцитами, с соединениями – депо оксида азота [17-19]. У этих соединений в плазме нет эффективных конкурентов за супероксид. В норме  $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$  находятся в концентрации менее 0,1 мкМ, поскольку неактивированные лейкоциты не продуцируют супероксид. Содержание в плазме  $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$  в концентрации свыше 0,15 мкМ свидетельствует о наличии в организме воспалительного процесса [20]. Определение  $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$  может быть высокочувствительным и высокоспецифичным методом ранней диагностики воспаления, значения которого не зависят от индивидуальных особенностей.

У беременных с диагностированным ПРПО концентрация  $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$  в крови увеличивается до 1 мкМ и выше [21].

Цель исследования – определить возможность использования показателей концентрации  $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$  в плазме крови матери для диагностики ВУИ.

**Материал и методы.** Проведено одномоментное исследование маркёров воспаления в венозной крови 60 беременной пациентки с последующей ретроспективной оценкой исходов беременностей и родов.

Группы разделены в зависимости от срока гестации и наличия ПРПО: Ia группа (группа контроля) – пациентки со сроком гестации  $\geq 37$  недель с целым плодным пузырьком ( $n=21$ ), Ib – пациентки со сроком гестации  $\geq 37$  недель и ПРПО ( $n=12$ ), IIa – пациентки с угрозой ПР с целым плодным пузырьком ( $n=12$ ), IIb – пациентки с угрозой ПР ( $< 37$  недель) и ПРПО (без ВУИ новорожденного) ( $n=7$ ), IIc – пациентки с угрозой ПР ( $< 37$  недель), ПРПО и наличием ВУИ ( $n=8$ ).

Критерии включения: информированное согласие на участие в исследовании, одноплодная беременность, для групп Ia и Ib – срок гестации  $\geq 37$  недель, для групп IIa, b, c – срок гестации  $\geq 22$  и  $< 37$  недель.

Критерии исключения: антенатальная гибель и врождённые пороки развития у плода, антибактериальная терапия накануне госпитализации (7 дней и менее), воспалительные заболевания матери в стадии обострения.

Диагностика преждевременного разрыва плодных оболочек (ПРПО) осуществлялась с помощью теста на подтекание околоплодных вод – AmniSure ROM Test, основанного на выявлении во влажной среде поддерживаемом плацентарного  $\alpha$ -микроглобулина  $\alpha$ -1 (PAMG-1), продуцируемого клетками децидуальной оболочки, присутствующего в норме только в околоплодных водах [22].

Для контроля воспалительных процессов определяли С-реактивный белок, используя иммуноферментный метод для количественного определения *in vitro* С-реактивного белка (СРБ) в сыворотке крови человека, обозначаемый как метод «С-реактивный белок высокочувствительный» (или hsCRP ELISA). Данный тест основан на принципе твёрдофазного непрямого ИФА. Использован также показатель числа лейкоцитов.

*Определение содержания нитрита и нитрилатных нитрозосоединений в плазме.* В экспериментах использованы реактивы: Na-фосфат однозамещённый, натрия хлорид, перекись водорода,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , нитрит калия, нитрат натрия, ЭДТА, глутатион (Sigma, США). Содержание  $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$  определяли с помощью ферментного сенсора, принцип работы которого основан на свойстве нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ), S-нитрозотиолов (RSNO), динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) и нитрилатных нитрозосоединений, не содержащих железа (RNO), ингибировать фермент каталазу в присутствии галоид-ионов с примерно равной эффективностью. ДНКЖ утрачивают ингибирующий эффект в среде, содержащей хелатор железа, разрушающий комплекс (ЭДТА), и ловушку NO (оксигемоглобин). RSNO трансформируются в ДНКЖ под воздействием закисного железа и тиолов и приобретают их свойства. Нитрит и RNO не трансформируются в ДНКЖ в нейтральной среде, следовательно, не разрушаются хелаторами железа и сохраняют ингибирующую способность в среде, содержащей хелатор железа и ловушку NO. Других эффективных ингибиторов каталазы плазма не содержит. Чувствительность метода – 50 нМ [10, 17, 20].

Для определения содержания  $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$  у больных отбиралась кровь в количестве 2 мл. Для предотвращения свертывания крови использован раствор гепарина – 0,1 мл 1% раствора на 10 мл крови. Плазму получали путём центрифугирования образцов на центрифуге ЦУМ-1 при скорости 3000 об/мин в течение 10 минут. Супернатант отделяли от эритроцитов и использовали для определения содержания  $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$  [10, 17, 20].

Определение активности каталазы осуществлялось калориметрическим методом, основанным на контроле кинетики теплопродукции, сопровождающей разложение перекиси водорода [17].

Диагноз угрозы преждевременных родов (ПР) устанавливался на основании жалоб на нерегулярные спастические боли в животе и поясничной области, подтекание околоплодных вод, по данным объективного исследования: повышенный тонус матки, укорочение шейки матки.

*Диагностика ВУИ.* Диагностика осуществлялась согласно клиническим рекомендациям по внутриутробной пневмонии, утверждённым российской ассоциацией специалистов перинатальной медицины и российским обществом неонатологов [23]. Диагностика осуществлялась в первые 72 часа жизни ребёнка по клинико-лабораторным признакам, включающим температуру тела, проявления сердечно-сосудистой недостаточности, респираторные нарушения и ряд других проявлений. Лабораторные признаки ВУИ включали лейкоцитарную формулу, СРБ, анализ мочи, рентгенограмма грудной клетки. О течении у ребёнка инфекционного процесса свидетельствует наличие как минимум двух клинических и одного лабораторного признака. Основным критерий диагностики врождённой пневмонии – наличие инфильтративных теней на рентгенограмме лёгких (в первые 3-е суток жизни) [23].

*Статистическая обработка данных.* Для статистического анализа и построения графиков использован пакет статистических программ IBM SPSS Statistics 26.0 (IBM, США) и StatTech v. 2.8.4 (ООО «Статтех», Россия). Количественные показатели оценивались на предмет соответствия нормальному распределению с помощью критерия Шапиро-Уилка (число исследуемых в группах менее 50). С учётом соответствия нормальному распределению количественные показатели описывались с помощью средних арифметических величин (M) и стандартных отклонений (SD). Категориальные данные описывались с указанием абсолютных значений и процентных долей. Сравнение двух независимых групп по количественному показателю, имеющему нормальное распределение, при условии равенства дисперсий выполнялось с помощью t-критерия Стьюдента. Сравнение трёх и более групп по количественному показателю, имеющему нормальное распределение, выполнено с помощью однофакторного дисперсионного анализа, апостериорные сравнения проведены с помощью критерия Тьюки (при условии равенства дисперсий). Критерием статистической значимости полученных результатов считали общепринятую в медицинской статистике величину  $p < 0,05$ .

Таблица 1

Характеристика групп по возрасту, ИМТ, сроку гестации на момент взятия пробы, паритету беременностей и родов

Показатели	Своевременные роды (n=33)		Угроза преждевременных родов (n=27)			p
	Ia ПРПО «-» (M±SD), n=21	Ib ПРПО «+» (M±SD), n=12	IIa ПРПО «-» (M±SD), n=12	IIb ПРПО «+» без ВУИ (M±SD), n=7	IIc ПРПО «+» с ВУИ (M±SD), n=8	
Возраст, годы	29,9±6,0	32,9±6,0	34,3±5,5	27,4±5,5	34,3±4,2	0,080
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	23,7±4,0	23,7±3,9	24,5±4,0	22,6±2,9	25,5±6,1	0,790
Срок гестации, нед	40,1±1,0	39,4±1,1	33,9±2,4	34,9±0,9	33,1±2,3	<0,001*
Паритет беременностей	2±2	2±1	3±1	2±1	4±2	0,097
Паритет родов	2±1	2±1	2±1	2±1	2±1	0,346

Примечание. \* – Различия показателей статистически значимы ( $p < 0,05$ ).

Перинатальные исходы новорожденных в зависимости от срока гестации, наличия ПРПО и ВУИ

Параметры	После 37 недель (n=33)		До 37 недель (угроза ПР) (n=27)	
	ПРПО«+», n=12	ПРПО«-», n=21	ПРПО«+», n=15	ПРПО«-», n=12
Здоровые дети	9 (75%)	16 (76%)	1 (7%)	0 (0%)
ВУИ	0 (0%)	0 (0%)	8 (53%)	0 (0%)
Осложнения, не связанные с воспалением	3 (25%)	5 (24%)	6 (40%)	12 (100%)

**Результаты.** Общая характеристика групп и перинатальные исходы беременностей и родов. Общая характеристика групп по возрасту, ИМТ, сроку гестации на момент взятия пробы, паритету беременностей и родов представлена в табл. 1. Состав групп статистически значимо не отличался по возрасту, ИМТ и паритету беременностей и родов ( $p>0,05$ ). Статистически значимые различия в сроке гестации соответствуют критериям разделения когорт.

Перинатальные исходы новорожденных представлены в табл. 2. В группе своевременных родов большая часть детей родилась здоровой, без перинатальных осложнений: 75,0% и 76,2% при наличии и отсутствии ПРПО, соответственно. Остальные дети родились без признаков ВУИ, осложнения связаны с хронической гипоксией, дистресс-синдромом, незрелостью или переносимостью, аспирацией околоплодных вод, диабетической фетопатией.

В группе с угрозой ПР и наличием ПРПО роды произошли в сроке  $33,5\pm 2,2$  нед. Только у одной из 12 пациенток с ПРПО родились здоровые дети, не нуждавшиеся в дополнительной респираторной поддержке и дальнейшем переводе на второй этап выхаживания. У 8 новорожденных диагностирована ВУИ после рождения. У остальных 6 – недоношенные с различными перинатальными осложнениями: синдром дыхательных расстройств у новорожденных, церебральная депрессия, преходящая ишемия миокарда. В группе преждевременных родов без ПРПО все дети родились без признаков ВУИ, все осложнения связаны с недоношенностью.

Соотношение концентрации ( $NO_2^-+RNO$ ) в венозной крови матери с диагностированными ПРПО и ВУИ. Данные по некоторым клиническим и биохимическим показателям крови, образцы которой взяты у пациенток с угрозой преждевременных родов и госпитализированных в сроке доношенной беременности, с наличием и отсутствием ПРПО приведены в табл. 3. У всех пациенток с ПРПО как при своевременных, так и при преждевременных родах имело место повышение концентрации  $NO_2^-+RNO$  в плазме крови матери до  $1,3-5,5$  мкМ. В среднем, у пациенток, у которых в последующем родился ребенок с ВУИ, среднее значение показателя концентрации  $NO_2^-+RNO$  –  $2,3\pm 1,1$  мкМ.

При оценке значений концентрации ( $NO_2^-+RNO$ ) получены следующие результаты:  $2,4\pm 0,8$  и  $2,4\pm 1,0$  мкМ, у пациенток с ПРПО при своевременных и преждевременных родах, соответственно. У пациенток без ПРПО:  $0,4\pm 0,3$  и  $0,8\pm 0,5$  мкМ при своевременных и

преждевременных родах, соответственно. Установлены статистически значимые различия между показателями пациенток с ПРПО и без ( $p<0,001$ ). Это средние значения. В отсутствие ПРПО при доношенной беременности в 85,7% случаев, а при недоношенной в 50% концентрация ( $NO_2^-+RNO$ ) менее 0,1 мкМ/л, что, согласно нашим данным характерно для нормы – отсутствия какого-либо воспаления [10, 17, 20, 21]. Показания других маркеров воспаления: количество лейкоцитов (WBC), уровень СРБ в венозной крови, лейкоциты в мазке влагалищного содержимого не информативны ( $p>0,1$ ).

У 9 пациенток выявлена повышенная концентрация  $NO_2^-+RNO$  в крови (от 0,6 до 2,8 мкМ), но не диагностировано ПРПО. 3 пациентки с доношенной беременностью, 6 – с угрозой ПР (табл. 3).

При доношенной беременности повышение наблюдалось при гестационном пиелонефрите в стадии ремиссии (1) и вагините (1), у одной пациентки воспалительных процессов в организме матери не наблюдалось. Все пациентки с угрозой преждевременных родов (6) выписаны из стационара беременными с положительным эффектом от проводимой терапии: 5 – поступили повторно с доношенным сроком гестации, 1 – родила преждевременно. У 3-х пациенток – хронический цистит, у 1 – вагинит при поступлении, 1 – гестационный пиелонефрит в стадии ремиссии, 1 – перенесла коронавирусную инфекцию в начале III триместра беременности. Из тех, кто родил своевременно: 1 ребенок родился с признаками крайней незрелости (несмотря на доношенный срок), 1 – с ВПР сердечно-сосудистой системы (в связи с чем исключен из дальнейшего анализа), 3 – здоровы.

По патогистологическому исследованию последа признаков восходящей амниотической инфекции не обнаружено, все дети без признаков инфицирования.

Влияние антибактериальной терапии при ПРПО на значение показателя  $NO_2^-+RNO$ . При угрозе преждевременных родов с наличием ПРПО в соответствии с клиническими рекомендациями Минздрава РФ от 2020 [24] проводилась антибактериальная терапия. Применение антибиотиков приводило к снижению содержания  $NO_2^-+RNO$  до нормы (табл. 4), что свидетельствует о наличии бактериального компонента в развитии патологического процесса, приводящего к активации фагоцитов, показателем чего является повышение концентрации  $NO_2^-+RNO$  [17, 20]. Беременные, у которых произошла нормализация показателя в результате антибактериальной терапии, родили детей без признаков ВУИ. Послеродовый пе-

**Частота встречаемости значений концентрации  $\text{NO}_2^-+\text{RNO}$ , СРБ, лейкоцитов в венозной крови беременных и в мазке влагалищного содержимого у пациенток в зависимости от срока гестации, наличия ПРПО и ВУИ**

Показатели	Своевременные роды (n=33) n (%)		Угроза преждевременных родов (n=27) n (%)		
	Ia ПРПО «-», n=21	Ib ПРПО «+», n=12	IIa ПРПО «-», n=12	IIb ПРПО «+» без ВУИ, n=7	IIc ПРПО «+» с ВУИ, n=8
$\text{NO}_2^-+\text{RNO}$ , мкМ/л					
<0,1	18 (85%)	0 (0%)	6 (50%)	0 (0%)	0 (0%)
0,1-1,0	1 (5%)	0 (0%)	1 (8%)	0 (0%)	0 (0%)
1,0-2,0	0 (0%)	2 (17%)	3 (25%)	5 (71%)	5 (63%)
$\geq 2,0$	2 (10%)	10 (83%)	2 (17%)	2 (29%)	3 (37%)
СРБ, мг/л (норма: до 6,0 мг/л)					
<1	6 (28%)	2 (17%)	1 (8%)	2 (29%)	0 (0%)
1,0-6,0	14 (67%)	9 (75%)	9 (75%)	5 (71%)	5 (63%)
$\geq 6$	1 (5%)	1 (8%)	2 (17%)	0 (0%)	3 (37%)
Лейкоциты, $10^9/\text{л}$ (норма: (4-9) $\times 10^9/\text{л}$ )					
$\leq 9$	8 (38%)	2 (17%)	6 (50%)	3 (43%)	3 (37%)
>9	13 (62%)	10 (83%)	6 (50%)	4 (57%)	5 (63%)
Число лейкоцитов в мазке, шт. в поле зрения (норма: <10 шт. в поле зрения)					
$\leq 10$	11 (52%)	7 (58%)	4 (33%)	5 (71%)	7 (87%)
>10	10 (48%)	5 (42%)	8 (67%)	2 (29%)	1 (13%)

риод протекал без особенностей. Беременная, у которой показатель остался повышенным, родила ребёнка с установленным диагнозом ВУИ; по заключению патогистологического исследования последа отмечено, что плацента с признаками восходящей амниотической инфекции, представленной мембранитом, субхориальным интервиллуситом, хориоамнионитом, васкулитом сосудов пуповины.

Повышение (свыше 0,1 мкМ) концентрации  $\text{NO}_2^-+\text{RNO}$  отмечено у всех пациенток с ПРПО. Обращает на себя внимание наличие нормальных значений лейкоцитов в венозной крови и СРБ у большинства пациенток (табл. 3).

Возникает вопрос, какими процессами обусловлены повышения концентрации ( $\text{NO}_2^-+\text{RNO}$ ) при ПРПО в венозной крови: происходящими в организме матери, в плодных оболочках или в тканях плода.  $\text{NO}_2^-+\text{RNO}$  в последнем случае из крови плода должны попасть в кровь матери. Для этого целесообразно проведение одновременного исследования состава нитрозосоединений в крови из пуповины и венозной крови матери.

*Соотношение концентраций ( $\text{NO}_2^-+\text{RNO}$ ) в венозной крови матери и в крови из пуповины.* Исследование показало, что у всех пациенток с ПРПО при содержании в крови матери ( $\text{NO}_2^-+\text{RNO}$ ) повышенной концентрации (более 0,1 мкМ), увеличение показателя регистрировалось и в крови пуповины, причём в несколько большей концентрации (табл. 5 (1-6)). В двух случаях при концентрации ( $\text{NO}_2^-+\text{RNO}$ ) в крови матери менее 0,1 мкМ, в крови плода из пуповины выяв-

лено значительное повышение ( $1,3\pm 0,2$  и  $2,6\pm 0,3$  мкМ, соответственно) концентрации этих соединений. При этом роды своевременные, через естественные родовые пути, дети родились здоровыми, оцененные 8/9 по шкале Апгар. Все представленные в табл. 5 образцы материнской крови, содержащие более 0,1 мкМ  $\text{NO}_2^-+\text{RNO}$ , принадлежали пациенткам с диагностированным ПРПО. При нормальном течении беременности концентрация ( $\text{NO}_2^-+\text{RNO}$ ) вплоть до родов менее 0,1 мкМ.

**Обсуждение.** Задача ранней диагностики ВУИ включает раннее выявление инфицирования и контроль за эффективностью лечения.

Наши данные показали, что при ПРПО у всех пациенток происходило увеличение концентрации  $\text{NO}_2^-+\text{RNO}$ , являющееся индикатором активации фагоцитов (табл. 3, 4). По-видимому, ПРПО сопряжён с активацией фагоцитов, принимающих участие как в реакциях воспаления, так и в изменении структуры плодных оболочек. Согласно современным представлениям, как при инфекционном, так и при неинфекционном воспалительном процессе происходит активация toll-like рецепторов, расположенных на иммунокомпетентных и эндотелиальных клетках на границе соприкосновения клеток матери и плода [25-27]. Запущенные иммунные механизмы ведут к активации фагоцитов, что, в свою очередь, может привести к активации эндогенных матричных металлопротеиназ с запуском процессов коллагенолиза, деградации, разрыва внеклеточного матрикса [28, 29]. Активация фагоцитов способствует развитию оксидативного стресс-

Содержание NO<sub>2</sub><sup>-</sup>+RNO в плазме крови у беременных с ПРПО на фоне антибактериальной терапии\*

№ пациентки	Срок гестации, нед	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> +RNO (мкМ/л) до начала АБТ	Продолжительность АБТ (сут) и применяемый препарат	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> +RNO (мкМ/л) после проведения АБТ
1	33-34	5,1±0,5	7 сут, цефтриаксон	<0,1
2	33-34	5,3±0,5	11 сут, цефтриаксон	0,2±0,1
3	35	1,6±0,2	6 сут, цефтриаксон	<0,1
4	30,9	2,5±0,3	8 сут, цефтриаксон	1,4±0,2

Примечание. \* – представлены значения в виде M±SD, число измерений показателя у одной пациентки n=4.

Таблица 5

Содержание NO<sub>2</sub><sup>-</sup>+RNO (мкМ/л) в венозной крови матери и в крови из пуповины при родах\*

№ пациентки*	Венозная кровь матери	Кровь из пуповины
1	2,1±0,2	5,8±0,3
2	2,0±0,3	3,1±0,3
3	3,8±0,3	5,3±0,4
4	1,9±0,2	3,6±0,3
5	4,9±0,3	5,4±0,4
6	2,1±0,2	2,7±0,2
7	<0,1	<0,1
8	<0,1	<0,1
9	<0,1	1,3±0,2
10	<0,1	2,6±0,3

Примечание. \* – С 1 по 6 – пациентки с диагностированным ПРПО, 5 – новорожденный с ВУИ, 1-4 – срок гестации ≥37 нед, 5-6 – срок гестации <37 недель. Представлены значения в виде M±SD, число измерений показателя у одной пациентки n=4.

са с повышением плацентарной митохондриальной активности и выработкой активных форм кислорода, мишенью для которых может являться коллаген плодных оболочек [29]. Концентрация NO<sub>2</sub><sup>-</sup>+RNO нормализуется в течение нескольких суток при антибактериальной терапии (табл. 4). Разрыв плодных оболочек сопряжен с инфицированием, приводящем к активации фагоцитов.

Факт ПРПО и сопутствующего инфицирования с высокой (близкой к 100%) вероятностью возможно выявить по концентрации NO<sub>2</sub><sup>-</sup>+RNO в крови матери.

Но каково состояние плода? Возникает другой вопрос – где происходит процесс, ведущий к образованию (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>+RNO): в крови матери или в крови плода? В какой мере содержание (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>+RNO) в крови матери отражает их содержание в крови и тканях плода, если эти соединения мы рассматриваем как высокочувствительные маркеры активации фагоцитов [17, 20]. Сравнение данных содержания (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>+RNO) в венозной крови матери и в крови из пуповины показывает, что линейная корреляция между ними отсутствует. Наличие (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>+RNO) в крови из пуповины при отсутствии в крови матери (см. табл. 4) можно объяснить кратковременным снижением кислородной насыщенности крови во время родов. Кратковременная гипоксия способствует

продукции супероксида и активации лейкоцитов [30-32]. Кровь из пуповины можно исследовать только после родов (или с помощью инвазивных методик во время беременности), в то время как интерес представляет диагностика в антенатальном периоде.

Согласно современным представлениям, ПРПО представляет собой патологию плодных оболочек, при которой ось воспаление – окислительный стресс играет главную роль в создании путей, которые могут привести к ослаблению мембран клеток посредством различных процессов [29, 30]. ПРПО не просто включает воспаление плодных оболочек, но последнее является его возможной причиной. Наши данные об увеличении концентрации (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>+RNO) в крови у всех пациенток с ПРПО – факт, подтверждающий такие представления. Эффект антибиотиков, зафиксированный в этой работе (см. табл. 4) и в предыдущей, свидетельствует о вкладе бактерий в этот процесс. В случае нормальных родов при своевременном излитии вод увеличения концентрации (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>+RNO) в крови не происходило (см. табл. 5), т. е., в этих ситуациях каких-либо воспалительных процессов в плодных оболочках не происходит. Поскольку показатель концентрации (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>+RNO) повышался, практически, у всех пациенток с ПРПО, в отличие от всех других, используемых в современной медицине клинических и биохимических показателей, имеется очевидное показание его применения для текущего контроля состояния беременных, особенно при угрозе ПР. Но вопрос: можно ли по концентрации (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>+RNO) в крови матери контролировать состояние плода пока остается открытым.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 4-6, 8, 13-16, 18-20, 22, 25-32 см. REFERENCES)

1. Послова Л.Ю., Ковалишена О.В., Сергеева А.В., Каткова Н.Ю., Сенягина Н.Е. Эпидемиология внутриутробных инфекций: учебное пособие. Н. Новгород: «Ремедиум Приволжье»; 2019.
3. Куклина Л.В., Кравченко Е.Н. Роль внутриутробной инфекции в перинатальной смертности. *Здравоохранение Российской Федерации*. 2019; 63(5): 245-50.
7. Новикова В. А., Пенжоян Г. А., Рыбалка Е. В., Аутлева С. Р., Васина И. Б., Филина К. В. Нерешенные вопросы преждевременных родов при преждевременном разрыве плодных оболочек. *Российский вестник акушера-гинеколога*. 2012; 12(4):25-31.
9. Сидорова И. С., Макаров И. О., Матвиенко Н. А. Внутриутробная инфекция: диагностика, профилактика и лечение. М.: МЕД-пресс-информ; 2008.
10. Титов В.Ю., Осипов А.Н., Горский В.А., Агапов М.А., Иванова А.В., Балякин Ю.В., Камчатнов П.Р., Жданова С.Г. Способ

- диагностики острого неспецифического воспалительного процесса. Патент РФ № 2461831; 2012.
11. Титов В.Ю., Петренко Ю.М., Ванин А.Ф., Степура И.И. Определение нитрита и нитрозосоединений в биосистемах калориметрическим методом. *Биофизика*. 2010; 55(1): 95-106.
  12. Титов В.Ю., Петренко Ю.М., Ванин А.Ф. Механизм ингибирования каталазы нитро- и нитрозо – соединениями. *Биохимия*. 2008; 73(1): 113-8.
  17. Титов В.Ю., Осипов А.Н., Крейнина М.В., Ванин А.Ф. Особенности метаболизма оксида азота в норме и при воспалении. *Биофизика*. 2013; 58 (5): 857-70.
  21. Титов В.Ю., Осипов А.Н., Балицкий С.П., Шалина Р.И. Ранняя диагностика хориоамнионита и внутриутробного инфицирования при преждевременном излитии околоплодных вод по содержанию нитрита и нитрилатных нитрозосоединений в плазме. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; 58(12): 7-10.
  23. Антонов А.Г., Байбарина Е.Н., Балашова Е.Н., Дегтярев Д.Н., Зубков В.В., Иванов Д.О. и др. Врожденная пневмония (клинические рекомендации). *Неонатология: Новости. Мнения. Обучение*. 2017; 4: 133-48.
  24. Клинические рекомендации «Преждевременные роды». Минздрав РФ; 2020. Разработчики: Российское общество акушеро-гинекологов и Ассоциация акушерских анестезиологов-реаниматологов. Доступно по адресу: [https://cr.minzdrav.gov.ru/recommend/331\\_1](https://cr.minzdrav.gov.ru/recommend/331_1). (Дата обращения: 30 июня 2022 г.)
- 
- #### REFERENCES
1. Poslova L.Yu., Kovalishena, O.V., Sergeeva A.V., Katkova N.Yu., Senyagina N.E. Epidemiology of intrauterine infections: a training manual [Epidemiologiya vnutriutrobykh infektsii: uchebnoe posobie]. Nizhniy Novgorod: Remedium Privolzh'e; 2019. DOI: 10.21145/978-5-906125-72-9\_2019. (in Russian)
  2. Klein J. O. Infectious Disease of the Fetus and Newborn Infant. J. Remington, J. O. Klein, C. B. Wilson. WB Elsevier Saunders Company, PA, USA. 2011: 918-1041.
  3. Kuklina L.V., Kravchenko E.N. The role of intrauterine infection in perinatal mortality. *Zdravookhranenie Rossiyskoy Federatsii*. 2019; 63(5):245-50. DOI: 10.18821/0044-197X-2019-63-5-245-250. (in Russian)
  4. Liu L., Johnson H.L., Cousens S., Perin J., Scott S., Lawn J.E. et al. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. Child Health Epidemiology Reference Group of WHO and UNICEF. *Lancet*. 2012; 379(9832): 2151-61. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)60560-1.
  5. Blencowe H., Cousens S., Chou D., Oestergaard M., Say L., Moller A.B., Kinney M., Lawn J. Born too soon: the global epidemiology of 15 million preterm births. *Reprod. Health* 10, 2013; Suppl 1: S2. DOI: 10.1186/1742-4755-10-S1-S2.
  6. Purisch S.E., Gyamfi-Bannerman C. Epidemiology of preterm birth. *Semin Perinatol.*, 2017; 41(7):387-91. DOI: 10.1053/j.semperi.2017.07.009.
  7. Novikova V.A., Penzhoian G.A., Rybalka E.V., Autleva S.R., Vasina I.B., Filina K.V. Unsolved problems of preterm birth in premature rupture of fetal membranes. *Rossiyskiy vestnik akushera-ginekologa*. 2012; 12(4):25-31. (in Russian)
  8. Sciaky-Tamir Y., Hershkovitz R., Mazor M., Shelef I., Erez O. The use of imaging technology in the assessment of the fetal inflammatory response syndrome—imaging of the fetal thymus. *Prenatal Diagnosis*. 2015; 35:413-9. DOI: 10.1002/pd.4560.
  9. Sidorova I.S., Makarova I.O., Matvienko N.A. Intrauterine infection: diagnosis, prevention and treatment. Moscow: MEDpress-inform; 2008. (in Russian)
  10. Titov V.Yu., Osipov A.N., Gorsky V.A., Agapov M.A., Ivanova A.V., Balyakin Yu.V., Kamchatnov P.R., Zhdanova S.G. Method of diagnosis of acute nonspecific inflammatory process. Patent RF No. 2461831; 2012. (in Russian)
  11. Titov V., Petrenko Yu., Vanin A., Stepuro I. Detection of nitrite and nitrosocompounds in chemical systems and biological liquids by the calorimetric method. *Biophysics*. 2010; 55 (1): 77-86. DOI: 10.1134/S0006350910010148.
  12. Titov V.Yu., Petrenko Yu.M., Vanin A.F. Mechanism of Inhibition of Catalase by Nitro and Nitroso Compounds. *Biokhimiya (Moscow)*. 2008; 73 (1): 92-6. DOI: 10.1134/s0006297908010148.
  13. Gahlaut A., Hooda V., Gothwal A. Enzyme-based ultrasensitive electrochemical biosensors for rapid assessment of the nitrite toxicity: recent advances and perspectives. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2019; 49 (1): 32-43. DOI: 10.1080/10408347.2018.1461551.
  14. Dhull V., Gahlaut A., Gothwal A., Hooda V., Duhan J.S. Nitrite biosensors: analytical tools for determination of toxicity due to presence of nitrite ions. *Biotechnology: Prospects and Applications*, 2012: 217-26. DOI: 10.1007/978-81-322-1683.
  15. Zazoua A., Hnaïen M., Jaffrezic-Renault N., Cosnier S., Kherrat R. A new HRP/catalase biosensor based on microconductometric transduction for nitrite determination. *Materials Science and Engineering C*. 2009; 29(6): 1919-22. DOI:10.1016/j.msec.2009.03.008.
  16. Mousty C., Cosnier S., Chen H., Chen L. A new approach for nitrite determination based on a HRP/catalase biosensor. *Materials Science and Engineering C*. 2008; 28(5-6): 726-30. DOI:10.1016/j.msec.2007.10.015.
  17. Titov V., Osipov A., Kreinina M., Vanin A. Features of Metabolism of Nitric Oxide in Normal State and Inflammation. *Biofizika*. 2013; 58 (5): 676-88. DOI: 10.1134/S0006350913050163.
  18. Shumayev K., Gubkin A., Serezhenkov V., Lobysheva I., Kosmachevskaya O., Ruuge E. et al. Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with albumin- and methemoglobin-bound dinitrosyl-iron complexes. *Nitric Oxide*. 2008; 18 (1): 37-46. DOI: 10.1016/j.niox.2007.09.085.
  19. Guzik T.J., Korbut R., Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J. Physiol. Pharmacol.* 2003; 54(4): 469-87.
  20. Titov V., Osipov A., Vanin A. The Ability of Blood Plasma to Inhibit Catalase in the Presence of Chloride is a Highly Sensitive Indicator of Deposited Nitric Oxide and Leukocyte Activation. *Current Enzyme Inhibition*, 2020; 16 (2): 172-80. DOI:10.2174/1573408016999200429123919.
  21. Titov V.Yu., Osipov A.N., Balitsky S.P. Shalina R.I. Early diagnostics of chorion and amnion inflammation and antenatal infecting at a premature rupture of membranes by nitrite and non-thiolate nitroso compounds content evaluation in blood plasma. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2013; 58(12): 7-10. (in Russian)
  22. Lee S., Lee J., Seong H., Lee S., Park J., Romero R. et al. The clinical significance of a positive Amniscure test in women with term labor with intact membranes. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* 2009; 22(4): 305-10. DOI: 10.1080/14767050902801694.
  23. Antonov A.G., Baibarina E.N., Balashova E.N., Degtyarev D.N., Zубков V.V., Ivanov D.O. et al. Congenital pneumonia (clinical recommendations). *Neonatologiya: Novosti. Mneniya. Obuchenie*. 2017; 4:133-48. DOI: 10.24411/2308-2402-2017-00049. (in Russian)
  24. Clinical recommendations “Premature birth”. Ministry of Health of the Russian Federation. 2020. Developers: The Russian Society of Obstetricians and Gynecologists and the Association of Obstetric Anesthesiologists and Resuscitators. Available at: [https://cr.minzdrav.gov.ru/recommend/331\\_1](https://cr.minzdrav.gov.ru/recommend/331_1). (Accessed June 30, 2022). (in Russian)
  25. Szubert M., Weteska M., Zgliczynska J., Olszak O., Zgliczynska M., Kalinka J. et al. The association between imbalances in vaginal microflora and duration of pregnancy as well as selected maternal and neonatal parameters. *Ginekologia Polska* 2021; 92(9):7. DOI: 10.5603/GP.a2021.0035.
  26. Kemp M.W. Preterm Birth, Intrauterine Infection, and Fetal Inflammation. *Frontiers in Immunology*. 2014; 5:574. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00574.
  27. Min A.M., Saito M., Simpson J.A., Kennedy S.H., Nosten F.H., McGready R. Placental histopathology in preterm birth with confirmed maternal infection: A systematic literature review. *PLoS ONE*. 2021; 16(8):1-21. DOI: 10.1371/journal.pone.0255902.
  28. Green E.S., Arck P.C. Pathogenesis of preterm birth: bidirectional inflammation in mother and fetus. *Semin Immunopathol.* 2020; 42:413-29. DOI:10.1007/s00281-020-00807-y.
  29. Menon R., Richardson L.S. Preterm prelabor rupture of the membranes: A disease of the fetal membranes. *Semin Perinatol*. 2017, 41(7):409-19. DOI: 10.1053/j.semperi.2017.07.012.
  30. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. 5<sup>th</sup> ed. Oxford: University press; 2015.
  31. Umbrello M., Dyson A., Feelisch M., Singer M. The key role of nitric oxide in hypoxia: hypoxic vasodilation and energy supply-demand matching. *Antioxid. Redox. Signal.* 2013; 19(14):1690-710. DOI: 10.1089/ars.2012.4979.
  32. Fago A., Jensen F.B. Hypoxia tolerance, nitric oxide, and nitrite: lessons from extreme animals. *Physiology (Bethesda)*. 2015; 30(2):116-26. DOI: 10.1152/physiol.00051.2014.

## ГЕМАТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Таганович А. Д.<sup>1</sup>, Ковганко Н. Н.<sup>1</sup>, Мурашко Д. И.<sup>1</sup>, Колб А. В.<sup>1</sup>, Прохорова В. И.<sup>2</sup>, Готько О. В.<sup>2</sup>, Державец Л. А.<sup>2</sup>

### ДООПЕРАЦИОННЫЕ БИОМАРКЕРЫ В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С III СТАДИЕЙ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ БЕЗРЕЦИДИВНОЙ ВЫЖИВАЕМОСТИ ПОСЛЕ ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ

<sup>1</sup>УО Белорусский государственный медицинский университет Минздрава Республики Беларусь, 220116, г. Минск, Беларусь;

<sup>2</sup>ГУ Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова Минздрава Республики Беларусь, 223040, Минская область, п.Лесной, Беларусь

*Изучали возможность использования дооперационного уровня 42 показателей, характеризующих клеточный состав и метаболизм в крови пациентов с III стадией аденокарциномы легкого (АК), для прогнозирования их безрецидивной выживаемости.*

*Обследованы 451 пациент с впервые диагностированной АК III стадии и проведенным хирургическим лечением (объем резекции – R0). Анализировалась длительность безрецидивного периода, клеточный состав крови, концентрация С-реактивного белка (СРБ), альбумина, антигенов Cyfra 21-1, SCC, TPA, хемокинов CXCL5, CXCL8, изофермента пируваткиназы TuM2 PK, HIF-1α и гиалуроновой кислоты в сыворотке крови; измеряли долю клеток крови лейкоцитарного ряда, снабженных рецепторами CXCR1 и CXCR2, CD44 (вариантная форма б) в сыворотке крови. Для выяснения зависимости длительности безрецидивного периода после проведенного лечения от времени наблюдения строили графики Каплана-Мейера. О взаимосвязи определяемых показателей с выживаемостью судили с помощью одно- и многофакторной моделей пропорциональных рисков Кокса. Сравнение групп с различным риском рецидива АК проводили, используя Log Rank тест и  $\chi^2$  (хи-квадрат). Оценку прогностической информативности лабораторных тестов проводили с помощью ROC-анализа.*

*Показано, что абсолютные показатели концентрации моноцитов, эозинофильных лейкоцитов, относительное количество лимфоцитов с рецептором CXCR1 в крови и уровень Cyfra 21-1 в сыворотке крови до оперативного лечения имеют связь с длительностью безрецидивного периода у пациентов с АК III стадии после резекции опухоли. Составлено регрессионное уравнение, включающее уровень Cyfra 21-1, CXCR1 лимфоциты и величину отношения эозинофилы / моноциты. На основе полученного порогового значения  $Y=0,597$  построен график Каплана-Мейера выживаемости пациентов, результаты которого соответствуют TNM-стратификации этих же пациентов.*

**Ключевые слова:** аденокарцинома легкого; рецидив; прогноз; клетки крови; CYFRA 21-1, CXCR1.

**Для цитирования:** Таганович А.Д., Ковганко Н.Н., Мурашко Д.И., Колб А.В., Прохорова В.И., Готько О.В., Державец Л.А. Дооперационные биомаркеры в крови пациентов с III стадией аденокарциномы легкого для прогнозирования безрецидивной выживаемости после хирургического лечения. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (11): 640-646. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-11-640-646>

**Для корреспонденции:** Таганович Анатолий Дмитриевич, зав. каф. биологической химии; e-mail: [ataganovich@gmail.com](mailto:ataganovich@gmail.com)

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

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

Поступила 08.06.2022

Принята к печати 02.09.2022

Опубликовано 14.11.2022

*Tahanovich A.D.<sup>1</sup>, Kauhanka N.N.<sup>1</sup>, Murashka D.I.<sup>1</sup>, Kolb A.V.<sup>1</sup>, Prokhorova V.I.<sup>2</sup>, Got'ko O.V.<sup>2</sup>, Derzhavets L.A.<sup>2</sup>*

#### PREOPERATIVE BLOOD MARKERS FOR PREDICTION OF RECURRENCE-FREE SURVIVAL AFTER SURGICAL TREATMENT OF PATIENTS WITH STAGE III LUNG ADENOCARCINOMA

<sup>1</sup> Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus;

<sup>2</sup> National Centre of oncology and medical radiology, Minsk region, Lesnoy, Belarus

*The possibility of the preoperative level of 42 indicators characterizing the cellular composition and metabolism in blood of patients with stage III lung adenocarcinoma (AC) to predict their relapse-free survival was studied.*

*Blood samples of 451 patients with newly diagnosed AC stage III after their surgical treatment (resection volume – R0) have been investigated. The duration of the relapse-free period (period of observation – 1 year), cellular composition of the blood, concentration of C-RP, albumin, Cyfra 21-1 antigens, SCC, TPA, chemokines CXCL5, CXCL8, pyruvate kinase TuM2 PK isoenzyme, HIF-1α and hyaluronic acid in blood serum so as the proportion of blood cells with CXCR1 and CXCR2, CD44V6 receptors in blood serum were measured. To determine the dependence of the duration of the relapse-free period after the treatment on the observation time, Kaplan-Meier graphs were built. The relationship between the determined parameters and survival was judged using single- and multi-factor Cox proportional hazard models. Comparison of groups with different risk of AC recurrence was performed using the Log Rank test and  $\chi^2$ . The assessment of the predictive information content of laboratory tests was carried out using ROC analysis. It was shown that the concentration of monocytes, eosinophilic leukocytes, the relative quantity of lymphocytes with CXCR1 receptor, the level of Cyfra 21-1 before surgical treatment were associated with the duration of the*

*relapse-free period. A regression equation was compiled, which included the level of Cyfra 21-1, relative content of lymphocytes with CXCR1, and the eosinophilic leukocytes / monocytes ratio. Based on the threshold value  $Y=0,597$ , a Kaplan-Meier plot of patient survival was built and the results of it correspond to the TNM stratification. The prognostic sensitivity of the results of the equation – 85,7%, the specificity – 94,7%.*

**Key words:** lung adenocarcinoma; relapse; prognosis; blood cells; CYFRA 21-1; CXCR1.

**For citation:** Tahanovich A.D., Kauhanka N.N., Murashka D.I., Kolb A.V., Prokhorova V.I., Got'ko O.V., Derzhavets L.A. Preoperative blood markers for prediction of recurrence-free survival after surgical treatment of patients with stage III lung adenocarcinoma. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (11): 640-646 (in Russ.) DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-11-640-646>

**For correspondence:** Tahanovich A.D., head of the department of biological chemistry; e-mail: [ataganovich@gmail.com](mailto:ataganovich@gmail.com)

**Information about authors:**

Tahanovich A.D., <https://orcid.org/0000-0002-0668-2888>;  
Kauhanka M.M., <https://orcid.org/0000-0002-3193-5955>;  
Kolb A.V., <https://orcid.org/0000-0003-1224-2878>;  
Murashka D.I., <https://orcid.org/0000-0002-1890-6252>;  
Prokhorova V.I., <https://orcid.org/0000-0002-6078-4447>;  
Got'ko O.V., <https://orcid.org/0000-0001-8083-0861>;  
Derzhavets L.A., <https://orcid.org/0000-0002-9246-4704>.

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

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

Received 08.06.2022  
Accepted 02.09.2022  
Published 14.11.2022

**Введение.** Рак легкого занимает одну из лидирующих позиций в структуре онкологических заболеваний. Ежегодная смертность от него составляет 1,3 млн человек [1]. Более 85% всех случаев рака легкого приходится на немелкоклеточный рак (НМРЛ) [2]. Наиболее частыми гистологическими подтипами его являются аденокарцинома (АК) и плоскоклеточный рак (ПКРЛ), (50% и 30% случаев НМРЛ соответственно) [3].

Приблизительно у 20-25% пациентов с АК диагностируют III стадию, которая характеризуется низкой выживаемостью [3]. Даже после полной резекции и послеоперационной консолидирующей (адьювантной) химиотерапии у 20–40% пациентов сохраняется риск рецидива опухоли [4]. Основными препятствиями в их лечении являются развитие регионарных или отдаленных метастазов и резистентность к химиотерапии [5]. Поэтому имеется необходимость поиска прогностических факторов или биомаркеров, которые могли быть использованы для предсказания безрецидивной выживаемости пациентов и ответа на лечение.

Независимыми маркерами прогноза при НМРЛ являются фрагмент 19 цитокератина (CYFRA 21-1), антиген плоскоклеточного рака (SCC), тканевой полипептидный антиген, присутствующий в протеолитических фрагментах цитокератинов 8, 18 и 19 в качестве компонента цитоскелета неплоского эпителия (ТРА). Агрессивная, быстро растущая опухоль с множественными метастазами продуцирует и секретирует много онкомаркера в сыворотку крови, что указывает на плохой прогноз [6–8]. Общим недостатком этих маркеров является невысокая диагностическая эффективность их определения, обусловленная или низкой специфичностью (чаще), или невысокой чувствительностью [9,10].

Есть сведения, что выраженность системного воспаления, о котором судят на основании отношения концентрации нейтрофилов к уровню лимфоцитов, тромбоцитов к лимфоцитам, прогностического нутриционного индекса, имеет корреляционную связь с неблагопри-

ятным прогнозом при НМРЛ [11]. Сообщается, что у пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой после хирургического лечения независимым прогностическим значением обладает системный иммуновоспалительный индекс (SII) [12], а высокий уровень С-реактивного белка (СРБ) может быть связан с плохим прогнозом на ранних стадиях НМРЛ [13].

В процессе трансформации клетки эпителиального или мезенхимного происхождения начинают экспрессировать рецепторы хемокинов, используя их для миграции и выживания в сайтах, удаленных от первичной опухоли. В частности, активация сигнального пути посредством взаимодействия хемокинов CXCL5 или CXCL8 с рецепторами CXCR1/2 в микроокружении опухоли разных видов рака усиливает ее прогрессирование и коррелирует с ухудшением выживаемости пациентов [14].

Повышенная экспрессия компонентов оси гиалуроновая кислота/рецептор CD44 (вариантная форма 6)/индуцируемый гипоксией фактор-1 альфа (HIF-1 $\alpha$ ) была связана со степенью дифференцировки и гистологическим типом НМРЛ [15]. Положительной экспрессии HIF-1 $\alpha$  в опухолевых тканях пациентов с НМРЛ и мелкоклеточным раком легкого сопутствовала более низкая общая выживаемость [16].

Несмотря на актуальность и мотивированность исследователей, маркеры рака легкого до сих пор остаются спорными. Прогностический эффект их, как выяснилось, зависит от гистологического типа опухоли, стадии, проведенного лечения [17-19]. Следовательно, чтобы получить более точные результаты оценки прогностического значения онкомаркеров, необходимо проведение когортных исследований пациентов с относительно однородными характеристиками и отдельными гистологическими подтипами НМРЛ.

Поэтому в настоящем исследовании изучалась возможность использования дооперационного уровня ряда вышеперечисленных показателей, характеризующих

клеточный состав и метаболизм в крови пациентов с III стадией аденокарциномы легкого, для прогнозирования их безрецидивной выживаемости и принятия решения о терапевтической стратегии. Необходимым условием отбора таких показателей было сопоставление прогностической ценности их определения с известными маркерами Cyfra 21-1, SCC, TPA.

**Материал и методы.** В исследовании участвовали 451 пациент (табл. 1) с впервые диагностированной аденокарциномой легкого III стадии при поступлении в стационар ГУ «РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова» в период с 01.01.2015 г. по 31.12.2021 г. Средний возраст пациентов составил 59±26 лет. После проведенного им хирургического лечения (объем резекции соответствовал R0), анализировали длительность безрецидивного периода по результатам наблюдения в течение одного года.

Все обследованные дали письменное добровольное согласие на участие в исследовании, проведение которого было одобрено решением Комитета по биомедицинской этике учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет».

Образцы крови собирали в вакутайнер с ЭДТА-К2 в качестве антикоагулянта из локтевой вены натощак. Для получения сыворотки кровь собирали в пробирку с тромбином и разделительным гелем. В образцах крови определяли концентрацию клеток на гематологическом анализаторе Sysmex ХЕ-5000 (Sysmex Group, Япония), уровень альбуминов и С-реактивного белка – на биохимическом анализаторе AU680 (Beckman Coulter, США) с использованием оригинальных наборов реагентов. Рассчитывали системный индекс воспалительного ответа (SII) ( $[ТЦ] \times [НФ] / [ЛФ]$ , где [ТЦ] – абсолютный показатель концентрации тромбоцитов, [НФ] – абсолютный показатель концентрации нейтрофильных лейкоцитов, [ЛФ] – абсолютный показатель концентрации лимфоцитов), воспалительный прогностический индекс (PI) ( $[С-РБ] \times [НФ] / ([ЛФ] \times [альбумин])$ ) [20,21] и системный воспалительный индекс ответа (SIRI) ( $[НФ] \times [МЦ] / [ЛФ]$ , где [МЦ] – абсолютный показатель концентрации моноцитов) [22].

У 40 пациентов в образцах сыворотки крови определяли концентрацию CYFRA 21-1, SCC, TPA на автоматическом анализаторе Cobas e411 (Roche Diagnostics GmbH, Германия), использующем принцип электрохемилюминесценции. Измерение концентрации CXCL5, CXCL8, TuM2 РК, HIF-1 $\alpha$  и гиалуроновой кислоты проводили с помощью ИФА-наборов FineTest (КНР) на

автоматическом ИФА-анализаторе Brio (Seac, Италия). Оптическую плотность оценивали при длине волны 450 нм и референсной длине волны 620 нм на планшетном фотометре Sirio (Seac, Италия).

Долю клеток крови, снабженных CXCR1 и CXCR2, CD44v6 и плотность этих рецепторов на их поверхности определяли, используя проточный цитофлуориметр Navios (Beckman Coulter, США). Для этого в пробирку помещали 100 мкл крови и раствор, содержащий смесь антител с флуоресцентными метками: CD181(CXCR1)-PE-Cy5 (BioLegend, США), CD182(CXCR2)-PE (BioLegend, США) и CD45-Pacific Orange (Exbio, Чехия), CD44v6-FITC (Invitrogen, США). Через 15 мин инкубации в темноте с антителами к смеси добавляли 1 мл лизирующего раствора VersaLyse (Beckman Coulter, Франция). Фиксацию антител на поверхности клеток проводили с помощью раствора IQTest 3 (Beckman Coulter, Франция).

Для выяснения зависимости длительности безрецидивного периода после проведенного лечения от времени наблюдения строили графики Каплана-Майера. Оценку взаимосвязи определяемых показателей с выживаемостью осуществляли с помощью одно- и многофакторной моделей пропорциональных рисков Кокса. Сравнение групп с различным риском рецидива АК проводили, используя Log Rank тест и  $\chi^2$  (хи-квадрат). Для всех имеющихся выборок данных проверяли гипотезу нормальности распределения по критериям Колмогорова-Смирнова, а также путем построения гистограмм распределения. Поскольку количественные значения показателей не подчинялись нормальному распределению, анализ проводили методами непараметрической статистики с использованием программы статистического анализа данных MedCalc («MedCalc Software», Бельгия). Рассчитывались медиана и интерквартильный размах (25%-75%). Для оценки различий между двумя независимыми группами применяли U-критерий Манна-Уитни. Оценку интегральной прогностической информативности лабораторных тестов проводили с помощью метода построения характеристических ROC-кривых с последующим вычислением площади под ROC-кривой (AUC). О прогностической ценности анализируемых показателей судили на основании расчета чувствительности, специфичности, предсказательной ценности положительного и отрицательного результатов и диагностической эффективности теста. Пороговое значение определяли, как величину оптимального соче-

Таблица 1

Обследованные пациенты с III стадией АК

TNM	Число пациентов	Мужчины	Женщины	Grade 1	Grade 2	Grade 3
T1N2M0	50	41	9	17	20	13
T2N2M0	72	61	11	28	27	17
T3N1M0	72	47	25	24	34	14
T4N0M0	53	38	15	20	20	13
T4N1M0	55	35	20	23	21	11
T3N2M0	84	58	26	33	36	15
T4N2M0	65	49	16	23	26	16

тания чувствительности и специфичности теста при построении кривых зависимости чувствительности от вероятности ложноположительных результатов. При всех видах статистического анализа критическое значение уровня значимости принимали как равное 5%.

**Результаты и обсуждение.** Результаты графического анализа Каплана-Майера демонстрируют зависимость безрецидивной выживаемости пациентов с III стадией АК от размера опухоли (Т) по результатам наблюдения в течение 1 года после оперативного лечения. При Т4 она составила 54%. Меньшему размеру опухоли (Т1-3) соответствовала более высокая безрецидивная выживаемость пациентов (78%-83%).

У пациентов с III стадией АК и отсутствием регионарных метастазов (N0) полученные данные демонстрируют более высокую безрецидивную выживаемость, чем у пациентов с регионарными метастазами (N1-2). К концу первого года разница в выживаемости достигает 11%. Однако величина  $\chi^2$  составила 2,98 и характеризует разницу между N1 и N3 как статистически недостоверную ( $p = 0,062$ ).

Стадия III АК неоднородна и разделяется на IIIA, IIIB и IIIC стадии [1]. Каждая из них включает несколько сочетаний дескрипторов, различающихся размером опухоли и степенью распространенности регионарных метастазов (табл. 2). Поскольку пациенты с поражением лимфоузлов в контралатеральном легком (N3) не подвергаются хирургическому лечению (все они относятся к IIIC стадии и частично к IIIB), для оценки влияния на выживаемость использовались данные пациентов с IIIA и IIIB стадиями АК. Согласно графику Каплана-Майера, начиная с 1 месяца и до года после оперативного лечения прослеживаются два типа безрецидивной выживаемости: высокая – для IIIA стадии и низкая – для IIIB стадии. Разница между ними составляет 19%. Она существенна и статистически достоверна, о чем свидетельствуют результаты Log Rank теста ( $\chi^2 = 5,11$ ;  $p = 0,042$ ).

Различной дифференцированности клеток опухоли (G1-3) соответствовала разная безрецидивная выживаемость. Наиболее высокой она была при G1. У 90% пациентов к концу первого года после оперативного лечения рецидива не было. Соответственно при G2 эта величина составила 85% и при G3 – 73%. Однако различия в выживаемости, судя по величине  $\chi^2$ , были несущественны.

Grade характеризует степень злокачественности опухоли. Чем менее она дифференцирована, тем более злокачественна. Поэтому логично было предполагать разную безрецидивную выживаемость пациентов, опухоль легкого у которых характеризуется разным Grade. Действительно, исследование 531 пациента с HMPJ приве-

ло к заключению о том, что степень дифференцировки опухолевых клеток может служить в качестве критерия оценки риска рецидива заболевания после хирургического лечения, но, главным образом, на I-II стадиях [23]. В проведенном нами ранее исследовании мы также наблюдали разницу безрецидивной выживаемости пациентов с I-II стадиями аденокарциномы и плоскоклеточного рака легкого [24]. Особенностью III стадии является то обстоятельство, что заболевание уже имеет выраженный характер. Можно допустить, что на этом этапе Grade теряет влияние на вероятность рецидива. Поэтому мы не наблюдали существенной разницы в безрецидивной выживаемости пациентов с III стадией АК в зависимости от дифференцированности клеток опухоли.

У пациентов с T4N1M0 (IIIA стадия АК), безрецидивная выживаемость после проведенного лечения меньше, чем у пациентов с другими вариантами Т и N стадии IIIA (табл. 2). А у пациентов с T3N2M0 (IIIB стадия) рецидив заболевания развивается медленнее, чем при других TN-комбинациях этой же стадии. Соответственно построенному графику Каплана-Майера (рис. 1, а), пациенты через год после проведенного лечения разделяются на две группы. Одна характеризуется сравнительно высокой выживаемостью и включает пациентов с T1N2M0, T3N1M0, T2N2M0, T4N0M0, T3N2M0. В другую группу входят пациенты с более коротким безрецидивным периодом. Она включает T4N1M0 и T4N2M0. Разница выживаемости между этими группами весьма значительна, если судить по результатам Log Rank теста ( $\chi^2 = 8,35$ ,  $p=0,039$ ).

Полученные данные служили основанием для объединения пациентов с вышеперечисленными характеристиками в группы медленного и быстрого риска рецидива заболевания после проведенного лечения. Результаты построения графика Каплана-Майера (рис. 1, б) в объединенных группах демонстрируют различие, которое значительно превышает приведенные выше разницу выживаемости в зависимости только от размера опухоли Т или от наличия регионарных метастазов N, или от степени дифференцировки G, или от стадии А-В. Особенно отчетливо оно проявляется через 3 месяца после проведенного лечения, все время нарастая. Величина  $\chi^2$ , характеризующая различия кривых безрецидивной выживаемости для этих групп пациентов с III стадией АК, самая большая и составила 10,31 ( $p=0,025$ ).

В группе высокого риска рецидива опухоли из 42 лабораторных показателей только абсолютные показатели концентрации моноцитов, эозинофильных лейкоцитов ([ЭФ]), отношение [ЭФ]/[МЦ], доля лимфоцитов с рецептором CXCR1 и уровень Sufrα 21-1 были существенно выше, чем в группе низкого риска. (табл. 3). Остальные показатели (индексы SII, IPI, SIRI, уровень HIF-1α, CXCL5, CXCL8, TuM2 PK, CXCR1 и др.) были неинформативными.

Поэтому только эти параметры использованы в моделях пропорциональных рисков Кокса, которые показывают одинаковую значимость их для выживаемости пациентов (табл. 4). Одновременно, результаты многофакторного анализа подтверждают результаты однофакторного анализа о наличии связи, на сей раз, совокупности этих же параметров с безрецидивной выживаемостью.

Таблица 2

Деление III стадии рака легкого в зависимости от размера опухоли (Т) и распространенности регионарных метастазов (N)

Стадия	Комбинация Т и N
IIIA	T1N2M0, T2N2M0, T3N1M0, T4N0M0, T4N1M0
IIIB	T1N3M0, T2N3M0, T3N2M0, T4N2M0
IIIC	T3N3M0, T4N3M0

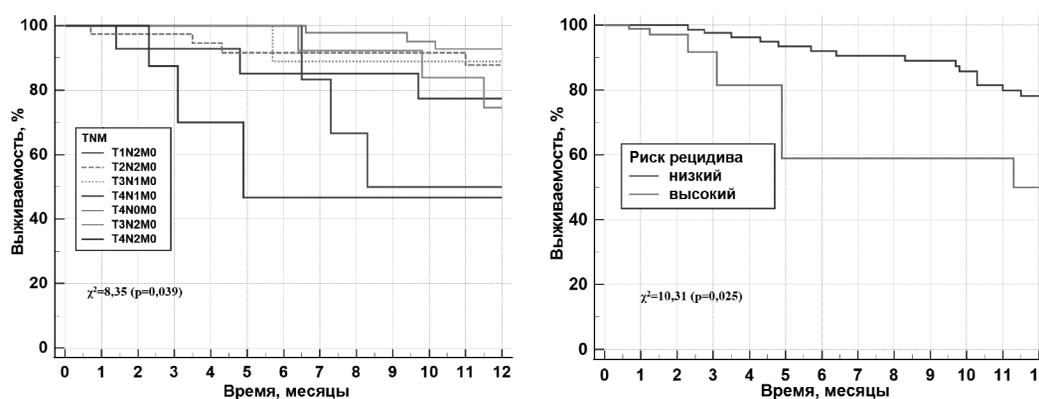


Рис. 1. Безрецидивная выживаемость пациентов с III стадией АК в зависимости от: а – размера опухоли и наличия регионарных метастазов, б – группы риска.

Таблица 3

Уровень рецепторов, клеток и белков крови, статистически достоверно отличающийся у пациентов с III стадией АК и различной длительностью безрецидивного периода после проведенного лечения

Показатель	Низкий риск	Высокий риск	p
[МЦ], $\times 10^9/\text{л}$	0,61 [0,51 – 0,72]	0,92 [0,68 – 1,19]	0,031
[ЭФ], $\times 10^9/\text{л}$	0,12 [0,060 – 0,21]	0,34 [0,30 – 0,45]	0,006
[ЭФ]/[МЦ]	0,157 [0,088 – 0,287]	0,469 [0,288 – 0,682]	0,021
Доля лимфоцитов с CXCR1, %	1,60 [0,70 – 2,30]	3,50 [3,40 – 4,80]	0,016
[CYFRA 21-1], нг/мл	2,98 [2,22 – 4,24]	5,35 [3,60 – 12,31]	0,031

Таблица 4

Значимые изменения концентрации клеток и белков в крови для безрецидивной выживаемости пациентов с III стадией АК по результатам анализа модели пропорциональных рисков Кокса

Показатель	Одновариантная модель		Многовариантная модель	
	ОР (95% ДИ)	p	ОР (95% ДИ)	p
Доля лимфоцитов с CXCR1, %	1,137 (1,005 – 1,269)	0,013	1,112 (1,003 – 1,221);	0,019
[CYFRA 21-1], нг/мл	1,211 (1,009 – 1,413)	0,016	1,185 (1,007 – 1,413);	0,018
[МЦ], $\times 10^9/\text{л}$	1,189 (1,093 – 1,285)	0,023	1,162 (1,074 – 1,250);	0,027
[ЭФ], $\times 10^9/\text{л}$	11,357 (1,205 – 14,241)	0,027	10,121 (1,181 – 13,322);	0,034
[ЭФ]/[МЦ]	12,152 (1,511-22,793)	0,019	11,373 (1,409-21,337);	0,023

Примечание. ОР – отношение рисков; 95% ДИ – 95% – доверительный интервал; p – показатель уровня статистической достоверности отношения рисков.

Согласно результатам ROC-анализа самая высокая специфичность (82,4%) характерна для определения относительного количества лимфоцитов, снабженных CXCR1, в то время как диагностическая чувствительность значений этого показателя не превышает 66,7% (табл. 5). Значения других отобранных показателей имели соизмеримые цифры этих параметров в диапазоне 63,2%-76,2%. Как результат, диагностическая эффективность их использования для прогнозирования безрецидивной выживаемости самой низкой была у концентрации моноцитов – 65%, а самой высокой у лимфоцитов, снабженных CXCR1 – 75%.

Три показателя: Cyfra 21-1, CXCR1 лимфоциты и Э/М были вовлечены в регрессионный анализ для составления уравнения. Ожидалось, что результаты уравнения могут иметь более высокие чувствительность и специфичность в стратификации пациентов с АК III по длительности безрецидивной выживаемости. Вовлечение комбинации показателей или маркеров – общепринятый прием именно с такой целью [25-30]. Удобство

же регрессионного уравнения заключается в том, что в результате использования для его расчета нескольких маркеров получается одно числовое значение, которое удобно анализировать с диагностической или прогностической целью. Приводим уравнение логистической регрессии для предсказания развития опухолевой прогрессии у пациентов с III стадией АК.

$$Y = \frac{\exp(-14,022 + 0,539 \cdot X_1 + 1,294 \cdot X_2 + 12,035 \cdot X_3)}{1 + \exp(-14,022 + 0,539 \cdot X_1 + 1,294 \cdot X_2 + 12,035 \cdot X_3)}$$

где: X1 – результат определения концентрации (нг/мл) антигена Cyfra 21-1 в сыворотке крови; X2 – относительное количество (%) рецептора CXCR1 в лимфоцитах; X3 – отношение эозинофильных лейкоцитов к моноцитам; Y – результат регрессионного уравнения; числа перед значениями X1-X3 – коэффициенты логистической регрессии;  $\exp (\approx 2,718)$  – основание натурального логарифма; «- 14,022» – константа логистического уравнения.

Диагностическая значимость определения уровня параметров в крови пациентов с низким и высоким риском рецидива

Показатель	ПЗ	ДЧ	ДС	ПЦПР	ПЦОР	AUC	ДЭ
Доля лимфоцитов с CXCR1, %	>2,55	66,7	84,2	82,4	69,6	0,713	75,0
[CYFRA 21-1], нг/мл	>4,16	71,4	73,7	74,8	69,9	0,703	72,5
[МЦ], $\times 10^9/\text{л}$	>0,77	66,7	63,2	66,7	63,2	0,631	65,0
[ЭФ], $\times 10^9/\text{л}$	>0,24	61,9	73,7	72,2	63,6	0,653	67,5
[ЭФ]/[МЦ]	>0,313	76,2	63,2	69,6	70,6	0,672	70,0
Y	>0,597	85,7	94,7	90,0	85,0	0,842	87,5

Примечание. ПЗ – пороговое значение, ДЧ – диагностическая чувствительность, ДС – диагностическая специфичность, ПЦПР – прогностическая ценность положительного результата, ПЦОР – прогностическая ценность отрицательного результата, AUC- площадь под ROC-кривой, ДЭ – диагностическая эффективность, Y – результат регрессионного уравнения.

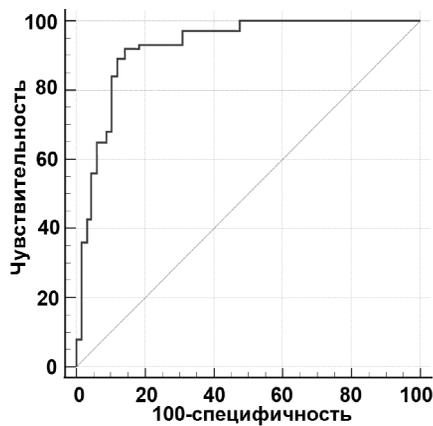


Рис. 2. ROC-кривая модели прогнозирования безрецидивной выживаемости у пациентов с АК III стадии после оперативной резекции опухоли.

Анализ качества уравнения логистической регрессии (см. формулу) показывает, что все отобранные показатели вносят существенный вклад в его результат. Это следует из того обстоятельства, что их включение в уравнение приводит к значительному снижению отрицательного удвоенного значения логарифма функции правдоподобия ( $\Delta=35,1$ ,  $p<0,05$ ) и соответствует хорошему качеству предложенной модели. Об этом же свидетельствует рассчитанный критерий согласия Хосмера-Лемешева, равный 12,1 ( $p=0,158$ ). То есть, уровень статистической значимости превышает значение 0,05, что подтверждает согласованность данных регрессионного уравнения при отнесении пациентов к низкому или высокому риску прогрессирования опухоли при АК.

О надежности регрессионного уравнения, которое использует комбинацию из значений уровня вышеназванных маркеров для прогнозирования риска опухолевой прогрессии, свидетельствуют и результаты ROC-анализа. Площадь под ROC-кривой, согласно экспертной шкале AUC, соответствует «очень хорошему» качеству прогностической модели (0,842) (рис. 2). Оптимальное пороговое значение для разделения групп низкого и высокого риска развития опухолевой прогрессии составляет 0,597 (табл. 5). То есть, если значение  $Y>0,597$ , то в 90% случаев у пациента действительно высокая вероятность рецидива опухоли, в то время как при значении  $Y\leq 0,597$  у 85% пациентов будет правильно предсказана низкая вероятность.

Диагностическая эффективность определения вероятности низкого или высокого риска развития рецидива опухоли в случае использования результатов логистического уравнения значительно выросла – до 87,5% (чувствительность – 85,7%, специфичность – 94,7%). Как видно, все эти показатели оказались гораздо выше, чем при использовании каждого из них с аналогичной прогностической целью в отдельности (табл. 5).

Работоспособность предложенной регрессионной модели на основе полученного порогового значения  $Y=0,597$  демонстрирует график Каплана-Майера выживаемости пациентов с III стадией АК до прогрессирования (рис. 3). Распределение безрецидивной выживаемости на относительно высокую и низкую, по данным однолетнего наблюдения, соответствует результатам TNM-стратификации (рис. 1б). Выживаемость к концу первого года для пациентов с низким риском развития опухолевой прогрессии составляет 79% – для TNM-стратификации и 77% – при вовлечении отобранных параметров крови в регрессионное уравнение. Для пациентов с высоким риском опухолевой прогрессии выживаемость к концу первого года после проведенного лечения составляет 49% и 48%, соответственно. Медианное значение длительности периода безрецидивной выживаемости для группы высокого риска составляет 11,3 месяца для TNM-стратификации и 11,4 месяцев – при оценке выживаемости по лабораторным показателям. Обращает внимание еще одно обстоятельство: отчетливая разница между графиками высокой и низкой выживаемости имеет место уже на первом месяце после проведенного

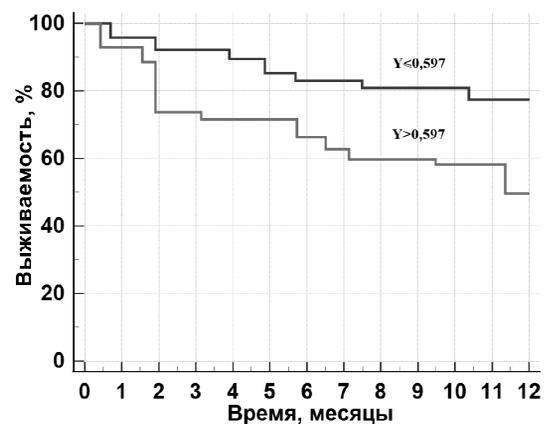


Рис. 3. Безрецидивная выживаемость пациентов с АК III стадией в зависимости от результата регрессионного уравнения Y.

лечения и в дальнейшем она увеличивается. Различия же кривых высокой и низкой безрецидивной выживаемости, построенных на основе TNM, появляется только спустя два месяца после проведенного лечения.

Таким образом, проведение графического анализа Каплана-Майера и последующий отбор критериев, позволивших разделить пациентов с III стадией АК на группы высокого и низкого риска рецидива заболевания, анализ лабораторных показателей – кандидатов в биомаркеры, обосновывают связь абсолютных показателей концентрации моноцитов, эозинофильных лейкоцитов, доли лимфоцитов с рецептором CXCR1 в крови и уровня Суфа 21-1 в сыворотке крови с длительностью безрецидивного периода у пациентов с АК III стадии. Составленное регрессионное уравнение, включающее результаты их определения, будет полезно для использования их в предсказании безрецидивной выживаемости пациентов с III стадией АК.

#### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Vansteenkiste J., Postmus P.E., Kerr K.M., Oudkerk M., Senan S., Waller D.A. et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 2013; 24 (Suppl 6):vi89–98. DOI: 10.1093/annonc/mdx222.
2. Navani N., Fisher D.J., Tierney J.F., Stephens R.J., Burdett S. Preoperative chemotherapy for non-small-cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis of individual participant data. *Lancet.* 2014; 383(9928):1561–71. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)62159-5.
3. Perez-Moreno P., Brambilla E., Thomas R., Soria J.C. Squamous cell carcinoma of the lung: molecular subtypes and therapeutic opportunities. *Clin. Cancer Res.* 2012; 18(9):2443-51. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2370.
4. Feng W., Fu X.L., Cai X.W., Yang H.J., Wu K.L., Fan M., et al. Patterns of local regional failure in completely resected stage IIIA(N2) non-small cell lung cancer cases: implications for postoperative radiation therapy clinical target volume design. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2014; 88(5):1100–7. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2013.12.048.
5. Fortunato O., Boeri M., Moro M., Verri C., Mensah M., Conte D. et al. Mir-660 is downregulated in lung cancer patients and its replacement inhibits lung tumorigenesis by targeting MDM2-p53 interaction. *Cell Death Dis.* 2014; 5:e1564. DOI: 10.1038/cddis.2014.507.
6. Huang M.S., Jong S.B., Tsai M.S., Lin M.S., Chong I.W., Lin H.C., et al. Comparison of cytokeratin fragment 19 (CYFRA 21-1), tissue polypeptide antigen (TPA) and carcinoembryonic antigen (CEA) as tumour markers in bronchogenic carcinoma. *Respir. Med.* 1997; 91(3):135-42. DOI: 10.1016/S0954-6111(97)90049-4.
7. Chen Z.Q., Huang L.S., Zhu B. Assessment of Seven Clinical Tumor Markers in Diagnosis of Non-Small-Cell Lung Cancer. *Dis. Markers.* 2018; 2018:9845123. DOI: 10.1155/2018/9845123.
8. Noonan S.A., Patil T., Gao D., King G.G., Thibault J.R., Lu X., et al. Baseline and On-Treatment Characteristics of Serum Tumor Markers in Stage IV Oncogene-Addicted Adenocarcinoma of the Lung. *J. Thorac. Oncol.* 2018; 13(1):134-138. DOI: 10.1016/j.jtho.2017.08.005.
9. Zamay T.N., Zamay G.S., Kolovskaya O.S., Zukov R.A., Petrova M.M., Gargaun A., et al. Current and Prospective Protein Biomarkers of Lung Cancer. *Cancers (Basel).* 2017; 9(11):155. DOI: 10.3390/cancers9110155.
10. Yu Z., Zhang G., Yang M., Zhang S., Zhao B., Shen G., et al. Systematic review of CYFRA 21-1 as a prognostic indicator and its predictive correlation with clinicopathological features in Non-small Cell Lung Cancer: A meta-analysis. *Oncotarget.* 2017; 8(3):4043-4050. DOI: 10.18632/oncotarget.14022.
11. Yang J.R., Xu J.Y., Chen G.C., Yu N., Yang J., Zeng D.X., et al. Post-diagnostic C-reactive protein and albumin predict survival in Chinese patients with non-small cell lung cancer: a prospective cohort study. *Sci. Rep.* 2019; 9(1):8143. DOI: 10.1038/s41598-019-44653-x.
12. Yang R., Chang Q., Meng X., Gao N., Wang W. Prognostic value of Systemic immune-inflammation index in cancer: A metaanalysis. *J. Cancer.* 2018; 9(18):3295-3302. DOI: 10.7150/jca.25691.
13. Leuzzi G., Galeone C., Gisabella M., Duranti L., Taverna F., Sautoni P., et al. Baseline C-reactive protein level predicts survival of early-stage lung cancer: evidence from a systematic review and meta-analysis. *Tumori.* 2016; 102(5):441-9. DOI: 10.5301/tj.5000522.
14. Zhang W., Wang H., Sun M., Deng X., Wu X., Ma Y., et al. CXCL5/CXCR2 axis in tumor microenvironment as potential diagnostic biomarker and therapeutic target. *Cancer Commun. (Lond.).* 2020; 40(2-3):69-80. DOI: 10.1002/cac2.12010.
15. Luo Z., Wu R.R., Lv L., Li P., Zhang L.Y., Hao Q.L., et al. Prognostic value of CD44 expression in non-small cell lung cancer: a systematic review. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2014; 7(7):3632-46.
16. Yang S.L., Ren Q.G., Wen L., Hu J.L. Clinicopathological and prognostic significance of hypoxia-inducible factor-1 alpha in lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci.* 2016; 36(3):321-7. DOI: 10.1007/s11596-016-1586-7.
17. Carvalho S., Troost E.G., Bons J., Menheere P., Lambin P., Oberije C. Prognostic value of blood-biomarkers related to hypoxia, inflammation, immune response and tumour load in non-small cell lung cancer – A survival model with external validation. *Radiother. Oncol.* 2016; 119(3):487-94. DOI: 10.1016/j.radonc.2016.04.024.
18. Holdenrieder S., Wehnl B., Hettwer K., Simon K., Uhlig S., Dayyani F. Carcinoembryonic antigen and cytokeratin-19 fragments for assessment of therapy response in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Br. J. Cancer.* 2017; 116(8):1037-45. DOI: 10.1038/bjc.2017.45.
19. Wang J., Jiang W., Zhang T., Liu L., Bi N., Wang X., et al. Increased CYFRA 21-1, CEA and NSE are Prognostic of Poor Outcome for Locally Advanced Squamous Cell Carcinoma in Lung: A Nomogram and Recursive Partitioning Risk Stratification Analysis. *Transl. Oncol.* 2018; 11(4):999-1006. DOI: 10.1016/j.tranon.2018.05.008.
20. Yang R., Chang Q., Meng X., Gao N., Wang W. Prognostic value of Systemic immune-inflammation index in cancer: A meta-analysis. *J. Cancer.* 2018; 9(18):3295-3302. DOI: 10.7150/jca.25691.
21. Dirican N., Dirican A., Anar C., Atalay S., Ozturk O., Bircan A., et al. A New Inflammatory Prognostic Index, Based on C-reactive Protein, the Neutrophil to Lymphocyte Ratio and Serum Albumin is Useful for Predicting Prognosis in Non-Small Cell Lung Cancer Cases. *Asian. Pac. J. Cancer Prev.* 2016; 17(12):5101-6. DOI: 10.22034/APJCP.2016.17.12.5101.
22. Xu L., Yu S., Zhuang L., Wang P., Shen Y., Lin J., et al. Systemic inflammation response index (SIRI) predicts prognosis in hepatocellular carcinoma patients. *Oncotarget.* 2017; 8(21):34954-60. DOI: 10.18632/oncotarget.16865.
23. Hidetaka U., Fumihito T. Prediction of recurrence after complete resection in patients with NSCLC. *Anticancer Res.* 2012; 32(9):3953-60.
24. Tahanovich A.D., Kauhanka N.N., Prohorova V.I., Murashka D.I., Gotko O.V. Determination of the Risk of Tumor Progression in Patients with Early Stages of Adenocarcinoma and Squamous Cell Lung Carcinoma Based on Laboratory Parameters. *Biochem. (Moscow), Suppl. Ser. B: Biomed. Chem.* 2022; 16(2), 154-63. DOI: 10.18097/PBMC20216706507.
25. DeCotiis C., Hu Y., Greenberg A.K., Huie M., Tsay J.C., Pass H., et al. Inflammatory cytokines and non-small cell lung cancer in a CT-scan screening cohort: Background review of the literature. *Cancer Biomark.* 2016; 16(2):219-33. DOI: 10.3233/CBM-150559.
26. Liao C., Yu Z., Guo W., Liu Q., Wu Y., Li Y., et al. Prognostic value of circulating inflammatory factors in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Biomark.* 2014; 14(6):469-81. DOI: 10.3233/CBM-140423.
27. Molina R., Holdenrieder S., Auge J.M., Schalhorn A., Hatz R., Stieber P. Diagnostic relevance of circulating biomarkers in patients with lung cancer. *Cancer Biomark.* 2010; 6(3-4):163-78. DOI: 10.3233/CBM-2009-0127.
28. Fang R., Zhu Y., Khadka V.S., Zhang F., Jiang B., Deng Y. The Evaluation of Serum Biomarkers for Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC) Diagnosis. *Front. Physiol.* 2018; 9:1710. DOI: 10.3389/fphys.2018.01710.
29. Holdenrieder S. Biomarkers along the continuum of care in lung cancer. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 2016; 245:S40-5. DOI: 10.1080/00365513.2016.1208446.
30. Sylman J.L., Mitrugno A., Atallah M., Tormoen G.W., Shatzel J.J., Tassi Yunga S., et al. The Predictive Value of Inflammation-Related Peripheral Blood Measurements in Cancer Staging and Prognosis. *Front. Oncol.* 2018; 8:78. DOI: 10.3389/fonc.2018.00078.

## ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Филиппова Ю.Ю., Девятова Е.В., Алексеева А.С., Бурмистрова А.Л.

### ЦИТОКИНЫ И НЕЙРОТРОФИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ В ОЦЕНКЕ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ АУТИЗМА У ДЕТЕЙ

ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», 454001, Челябинск, Россия

*В связи с неуклонным ростом числа детей с аутизмом и высокой гетерогенностью клинических групп, диагностика данных расстройств и их тяжести является актуальной проблемой современной медицины. В ходе работы обследованы 126 детей от 3 до 13 лет с типичным нейроразвитием и детей с тяжелой и легкой степенью расстройств аутистического спектра (РАС). Степень тяжести определена согласно рейтинговой шкале детского аутизма (CARS). В плазме крови проведена оценка уровня некоторых про-/противовоспалительных цитокинов и нейротрофических факторов (фактора роста нервов бета и нейротрофического фактора мозга) методом иммуноферментного анализа. Связи между показателями в каждой группе обследованных оценены с помощью критерия Спирмена и визуализированы в виде тепловой карты корреляций. Статистическая обработка данных проведена в программно-статистической среде R. Выявлены значимо высокие уровни IL-4 в плазме крови и уменьшение числа значимых корреляций внутри/между системами у детей с легкой степенью тяжести аутизма по сравнению с нейротипичными детьми. Такие данные, вероятно, могут выступать отражением теории о том, что для части детей с РАС характерно замедленное развитие мозга, как вариант эволюционной нормы. Напротив, у детей с тяжелой степенью РАС, показаны высокие системные уровни IL-6 и IFN $\gamma$  на фоне низких значений IL-10, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  и NGF $\beta$ , поддержанных практически полным отсутствием внутри/и межсистемных взаимодействий. Это может служить показателем дезадаптации иммунной и нервной систем при тяжелом аутизме, отражающимся на патогенезе заболевания. Таким образом, комплекс показателей: высоких уровней ключевых провоспалительных цитокинов – IL-6 и IFN $\gamma$ , низких значений IL-10, NGF $\beta$  и дезинтеграция цитокиновой и нервной систем на периферии, могут быть предложены в качестве подхода для индикации степени тяжести состояния у детей с РАС.*

**Ключевые слова:** цитокины; мозг-выделенный нейротрофический фактор; фактор роста нервов бета; расстройства аутистического спектра; дети; диагностика.

**Для цитирования:** Филиппова Ю.Ю., Девятова Е.В., Алексеева А.С., Бурмистрова А.Л. Цитокины и нейротрофические факторы в оценке степени тяжести аутизма у детей. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (11): 647-651.  
DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-11-647-651>

**Для корреспонденции:** Филиппова Юлия Юрьевна, канд. биол. наук, доц. каф. микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета; e-mail: [julse@rambler.ru](mailto:julse@rambler.ru)

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

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

Поступила 12.09.2022

Принята к печати 12.10.2022

Опубликовано 14.11.2022

*Filippova Yu. Yu., Devyatova E. V., Alekseeva A. S., Burmistrova A. L.*

CYTOKINES AND NEUROTROPHIC FACTORS IN THE SEVERITY ASSESSMENT OF CHILDREN AUTISM

Chelyabinsk state university, Chelyabinsk, Russia

*Due to the steady increase in the number of children with autism and the high heterogeneity of clinical groups, the diagnosis of these disorders and their severity is an urgent problem in modern medicine. In the course of the work, 126 children from 3 to 13 years old with typical neurodevelopment and with severe and mild autism spectrum disorders (ASD) were examined. Disease severity was determined according to the Childhood Autism Rating Scale (CARS). The levels of pro-/anti-inflammatory cytokines and neurotrophic factors (nerve growth factor beta and brain-derived neurotrophic factor) in blood plasma were assessed by enzyme immunoassay. Associations between indicators in each group of patients were assessed using the Spearman test and visualized as a heatmap of correlations. Statistical data processing was carried out in the R software. Significantly high levels of IL-4 in blood plasma and a decrease in the number of significant correlations within/between systems were revealed in children with mild autism compared with children with typical neurodevelopment. Such data can probably reflect the theory that some children with ASD are characterized by slow brain development, as a variant of the evolutionary norm. On the contrary, in children with severe ASD, high systemic levels of IL-6 and IFN $\gamma$  are shown against the background of low values of IL-10, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  and NGF $\beta$ , supported by the almost complete absence of intra/ and intersystem interactions. This may act as an indicator of maladaptation of the immune and nervous systems in severe autism, which contributes to the pathogenesis of the disease. Thus, a set of indicators: high levels of key pro-inflammatory cytokines – IL-6 and IFN $\gamma$ , low levels of IL-10, NGF $\beta$  and disintegration of the cytokine and nervous systems in the periphery can be proposed as an approach to indicate the severity of the condition in children with ASD.*

**Key words:** cytokines; brain-derived neurotrophic factor; nerve growth factor beta; autism spectrum disorders; children; diagnosis.

**For citation:** Filippova Yu.Yu., Devyatova E.V., Alekseeva A.S., Burmistrova A.L. Cytokines and neurotrophic factors in the severity assessment of children autism. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (11): 647-651 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-11-647-651>

**For correspondence:** Filippova Yu.Yu., Cand. Sci. Biol., Associate Professor, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Faculty of Biology; e-mail: [julse@rambler.ru](mailto:julse@rambler.ru)

**Information about authors:**

Filippova Yu.Yu., <https://orcid.org/0000-0001-5041-6444>;  
Devyatova E.V., <https://orcid.org/0000-0002-0932-3637>;  
Alekseeva A.S., <https://orcid.org/0000-0002-2524-8569>;  
Burmistrova A.L., <https://orcid.org/0000-0001-6462-9500>.

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

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

Received 12.09.2022  
Accepted 12.10.2022  
Published 14.11.2022

**Введение.** Расстройства аутистического спектра (РАС) – это группа расстройств нейробиологического происхождения, характеризующихся проблемами в общении и социальных навыках, а также повторяющимся поведением [1]. РАС отличаются высокой гетерогенностью и вариабельностью тяжести клинических симптомов, что затрудняет понимание патогенеза, который, скорее всего, является полиэтиологическим, и поиск информативных биомаркеров аутизма и тяжести течения данной патологии [2]. В 2018 г. К. Охја с соавт. [3] предложена гипотеза, что формирование фенотипов РАС может быть связано с дисрегуляцией взаимодействия иммунной системы, синаптогенных факторов роста (таких, как фактор роста нервов бета – NGF $\beta$ , и нейротрофический фактора мозга – BDNF) и их сигнальных путей. Эта концепция основывается, прежде всего, на данных многочисленных исследований о наличии нейровоспаления при РАС [4-6]. Важно, что оно поддерживается и/или находит отражение в изменении уровней цитокинов в периферической системе [7]. Авторами показано, что нейровоспаление может оказывать влияние на функцию мозга с помощью различных механизмов, в том числе: 1) через непосредственную индукцию синтеза NGF в месте воспаления, в том числе нейрональными и глиальными клетками мозга [8]; 2) через модуляцию BDNF, посредством стимуляции выработки глюкокортикоидов и нейротрансмиттеров, таких, как глутамат и гамма-аминомасляная кислота [9, 10].

NGF и BDNF в норме обеспечивают пре- и постнатальное развитие мозга, модулируя рост и дифференцировку нейронов, а также воздействуя на синаптическую и структурную пластичность [2, 8, 11]. Они являются ключевыми молекулами в сложной сети двунаправленных сигналов между нервной и иммунной системами [8, 12, 13]. Дисбаланс их продукции может способствовать развитию и поддержанию хронического воспаления [12, 13].

Системное воспаление, высокие уровни NGF и BDNF были показаны рядом авторов у лиц с аутизмом [14, 15]. Однако, до сих пор не известно, лежит ли дисбаланс цитокинов и нейротрофических факторов в основе патофизиологии РАС, его отдельных клинических фенотипов, или они являются только маркерами генетических, эпигенетических и экологических факторов, и какова значимость данных маркеров [16].

Цель данной работы – изучение плазменных уровней некоторых цитокинов и нейротрофинов, а также корреляционных связей между ними, для оценки степени тяжести расстройств аутистического спектра у детей.

**Материал и методы.** В работе представлены результаты обследования 81 ребенка с расстройствами аутистического спектра (РАС), проходивших немедикаментозную реабилитацию в СРЦ «Здоровье» г. Челябинск. Соотношение по полу составило 4:1 (мальчики:девочки), возраст детей от 3 до 13 лет (медиана – 6,0 лет). Диагностика и оценка степени тяжести состояния осуществлялась психотерапевтами центра с помощью рейтинговой шкалы детского аутизма (Childhood Autism Rating Scale, CARS). В зависимости от тяжести состояния, дети с аутизмом были разделены на 2-е группы: 51 ребёнок с легкой или умеренной степенью аутизма (средний балл CARS 32,0 $\pm$ 1,5) и 30 лиц с тяжелым аутизмом (средний балл CARS 39,0 $\pm$ 3,4). Контрольную группу составили 45 детей с нормотипичным нейроразвитием соответствующего пола, в возрасте 4-13 лет (медиана – 9,0 лет), находившиеся на обучении в дошкольных и школьных учреждениях пос. Первомайский Челябинской области. В группах сравнения не было различий по соматическим заболеваниям, в том числе, аллергопатологиям и заболеваниями со стороны желудочно-кишечного тракта. Очаги хронической инфекции отсутствовали. Законными представителями всех детей было подписано информированное согласие на участие в исследовании. Работа одобрена Этическим комитетом Челябинского государственного университета (протокол № 2 от 27.08.2019 г.).

Комплекс лабораторных обследований включал определение в плазме крови детей уровней некоторых цитокинов: IL-6, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-4 («Вектор-Бест», Новосибирск), BDNF («R&D Systems» США) и NGF $\beta$  («RayBiotech», США), методом твердофазного гетерогенного иммуноферментного анализа. Учет результатов проводили на планшетном фотометре Multiscan EX (Финляндия).

Статистическая обработка данных выполнена в программно-статистической среде R (v. 3.6.1). В связи с ненормальностью распределения данных, были использованы непараметрические методы анализа. В каждой группе для всех показателей рассчитывали медиану и интерквартильный диапазон. Сравнение групп проводили с помощью критерия Краскела-Уоллиса с попарны-

ми сравнениями по Коноверу-Инману. Связь признаков оценивали определением коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Результаты визуализировали в виде тепловой карты корреляций. Различия и зависимости считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ .

**Результаты.** По результатам нашего исследования в группе детей с легкой степенью тяжести аутизма уровни иммунорегуляторного цитокина – IL-4 в плазме крови были значимо выше, чем в группе детей с типичным нейроразвитием (см. таблицу).

Статистически значимых различий как в уровнях остальных цитокинов, так и в уровнях нейротрофических факторов: BDNF и NGFβ, не выявлено (см. таблицу).

При оценке внутри-/межсистемных взаимодействий в группе детей с легким аутизмом установлены две значимые положительные связи внутри цитокиновой системы: TNFα и IL-1β ( $p=0,512$ ,  $p<0,001$ ); IL-1β и IL-4 ( $p=0,303$ ,  $p=0,029$ ); и два положительных межсистемных взаимодействия: между BDNF и IL-6 ( $p=0,270$ ,  $p=0,049$ ); а также между NGFβ и IL-1β ( $p=0,294$ ,  $p=0,034$ ) (см рисунок, а).

В группе детей с тяжелой степенью аутизма статистически значимые изменения были характерны для 6 из 8-ми показателей, включенных в работу. Так, при тяжелом аутизме у детей содержание в плазме крови провоспалительных цитокинов: IL-6 и IFNγ было значимо выше, а TNFα, IL-1β, противовоспалительного цитокина – IL-10, и NGFβ – ниже, по сравнению с их концентрацией как у детей с типичным нейроразвитием, так и у детей с легкой степенью тяжести РАС (см. таблицу). В группе детей с тяжелым аутизмом выявлены только две значимые положительные внутрицитокиновые связи: TNFα и IL-1β ( $p=0,379$ ,  $p=0,043$ ); IFNγ и IL-4 ( $p=0,366$ ,  $p=0,049$ ) (см. рисунок, б). Значимых корреляций между нейротрофинами и цитокинами не обнаружено.

В группе детей с типичным нейроразвитием было показано наибольшее число значимых внутри- и межсистемных корреляций. Внутри цитокиновой системы – одна положительная между TNFα и IL-1β ( $p=0,791$ ,  $p<0,001$ ); и три отрицательные, в основе которых лежали взаимодействия IL-6: с TNFα ( $p=-0,506$ ,  $p<0,001$ ); с IL-1β ( $p=-0,314$ ,  $p=0,036$ ); и с IL-10 ( $p=0,415$ ,  $p=0,005$ ). В положительных связях между системами были задействованы BDNF и IL-1β ( $p=0,376$ ,  $p=0,011$ ); и NGFβ и IL-10 ( $p=0,314$ ,  $p=0,036$ ) (см. рисунок, в).

**Обсуждение.** В проведенном нами исследовании была предпринята попытка установить наличие/отсутствие взаимосвязи между важными показателями нейромунных взаимодействий – цитокинами и нейротрофинами на периферии и тяжестью течения РАС у детей. Установлено, что у детей с легкой формой течения РАС плазменные уровни всех исследуемых цитокинов и нейротрофинов не отличаются от значений нейротипичных детей, за исключением значимо высоких уровней иммунорегуляторного цитокина – IL-4. Хотя P. Goines и P. Ashwood [16] было показано, что IL-4 был повышен в плазме крови во втором триместре беременности и амниотической жидкости у матерей детей с РАС, физиологически, в мозге, IL-4 в значительной степени играет нейротрофическую роль. Он активируется во время воспаления центральной нервной системы, индуцируя альтернативную активацию глиальных клеток и защищая их от апоптоза, тем самым выполняет регуляторную функцию. Важно отметить, что, несмотря на наличие значимых внутри-/межсистемных взаимодействий средней силы у детей с легкой степенью тяжести аутизма, у них происходит перестройка и снижение значимых связей (уменьшение числа связей между цитокинами). Такие данные, вероятно, могут выступать отражением теории «гетерохронии развития» о том, что у части детей РАС является не столько патологией, сколько замедленным развитием мозга, как результат расширения границ нормы при эволюции вида *Homo sapiens* [17, 18].

Обнаруженное нами повышение системных уровней некоторых провоспалительных цитокинов (IL-6 и IFNγ) и снижение концентрации противовоспалительного цитокина – IL-10 у детей с тяжелой формой аутизма, может отражать наличие у данных детей хронического низкоуровневого воспаления; а практически полное отсутствие значимых связей между цитокинами и нейротрофинами (нами установлены только 2 положительные корреляции внутри цитокиновой системы) – о дезинтеграции двунаправленного взаимодействия нервной и иммунной систем.

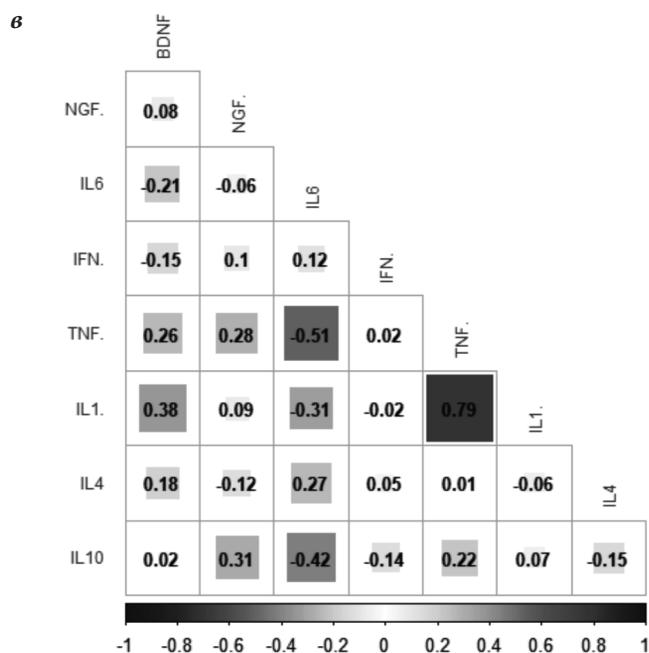
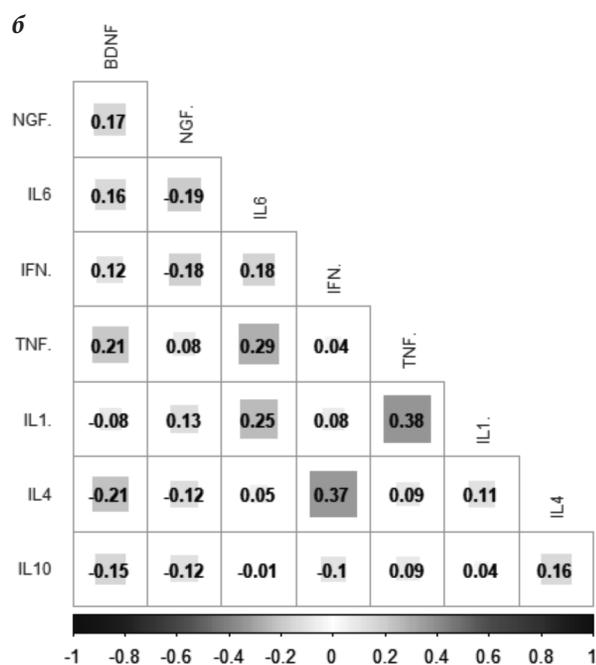
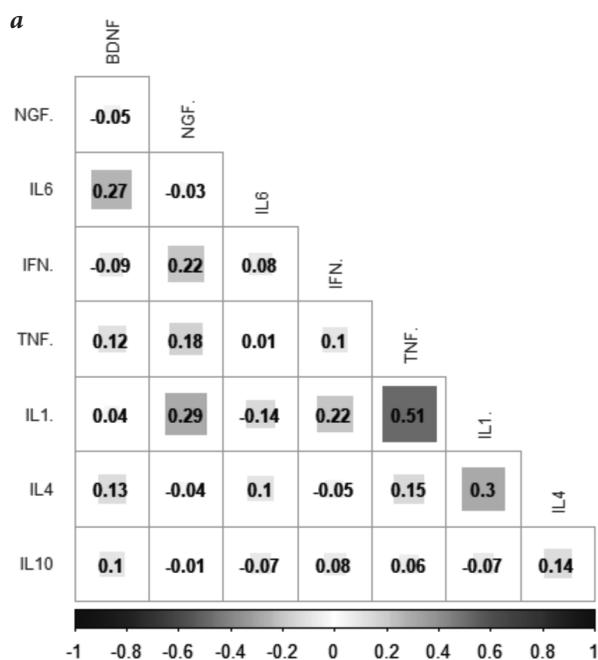
На фоне хронического воспаления нами установлено значимое снижение уровней NGFβ в плазме крови детей с тяжелым аутизмом. Полученные данные носят дискуссионный характер. Так, рядом авторов были описаны значительные увеличения синтеза NGF в воспаленных тканях у пациентов и на животных моделях воспалительных заболеваний (при ревматоидном артрите, системной красной волчанке и др.) [8], в том числе и в сыворотке детей с аутизмом [15] и подгруппе детей с РАС с регрессом [19]. С другой стороны, D. Rodrigues и соавт. [22] не обнаружили значимых различий в периферических уровнях ни одного из нейротрофических

Содержание некоторых цитокинов и нейротрофических факторов (пкг/мл) в плазме крови детей с разной степенью тяжести аутизма, Me (25%-75%)

Показатель	Легкий аутизм	Тяжелый аутизм	Нормотипичное развитие
IL-6	1,80 (0,47-3,06)	3,95*/** (2,39-6,22)	2,09 (0,89-3,19)
IFNγ	9,91 (8,87-11,35)	14,84*/** (12,58-15,92)	11,13 (9,22-12,65)
TNFα	2,81 (2,37-3,78)	1,37*/** (1,09-1,69)	2,46 (1,58-4,08)
IL-1β	3,45 (2,63-4,25)	1,89*/** (1,66-2,09)	3,07 (2,08-4,36)
IL-10	7,46 (6,21-10,35)	5,69*/** (3,20-8,71)	9,68 (4,06-13,53)
IL-4	2,72* (2,37-3,11)	2,27 (2,0-2,57)	2,22 (1,87-2,55)
BDNF	11777,0 (4405,0-24420,0)	12550,0 (9550,0-19020,0)	12870,0 (6903,0-21700,0)
NGFβ	9,31 (6,32-16,68)	5,92*/** (0,72-12,10)	7,88 (4,54-15,38)

Примечание. \* – значимые различия между детьми с аутизмом и детьми с типичным нейроразвитием ( $p \leq 0,05$ ); \*\* – значимые различия между детьми с легкой и тяжелой формами аутизма ( $p \leq 0,05$ ).

IMMUNOLOGY



Корреляционные связи между показателями цитокинов и нейротрофинов плазмы крови у детей с разной степенью тяжести аутизма.

*a* – легкий аутизм; *б* – тяжелый аутизм; *в* – типичное нейроразвитие. Цифрами показана сила связи ( $r$ ), а также её направленность – отрицательная и положительная. Темным цветом выделены статистически значимые корреляции.

факторов между лицами с РАС и контролем [20]. Несмотря на то, что NGF на периферии вырабатывается большим числом клеток, включая иммунные, его синтез четко контролируется во всех областях организма, иннервируемых чувствительными и симпатическими нейронами, и строго ограничен очагом воспаления, поскольку изменение концентрации NGF глубоко модифицирует физиологию организма [8, 21]. Важно отметить, что NGF обладает множеством эффектов, которые могут быть как провоспалительными, так и противовоспалительными. Это очевидное противоречие можно объяснить, рассматривая NGF как часть эндогенного механизма, который, активируя иммунные ответы, также

активирует пути, необходимые для подавления воспалительной реакции и ограничения повреждения тканей [8]. G. Prencipe и соавт. [22] продемонстрировали, что NGF является частью регуляторной петли в моноцитах: воспалительные стимулы, активируя провоспалительный ответ через толл-подобные рецепторы (TLR), усиливают экспрессию рецептора NGF – тирозинкиназы A. В TLR-активированных моноцитах NGF снижает продукцию воспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 и IL-8), индуцируя высвобождение противовоспалительных медиаторов (IL-10 и антагониста рецептора IL-1). Вероятно, обнаруженные нами низкие уровни NGF $\beta$  в плазме крови детей с тяжелым аутизмом на фоне высоко-

ких уровней провоспалительных цитокинов, могут косвенно свидетельствовать о нарушении петли обратной регуляции хронического воспаления на периферии.

**Заключение.** Таким образом, комплекс показателей: высокие уровни ключевых провоспалительных цитокинов – IL-6 и IFN $\gamma$ , низкие значения IL-10 и NGF $\beta$ , а также дезинтеграция цитокиновой и нервной систем на периферии, могут быть предложены в качестве подхода для индикации степени тяжести состояния у детей с РАС.

#### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Xu N., Li X., Zhong Y. Inflammatory cytokines: potential biomarkers of immunologic dysfunction in autism spectrum disorders. *Mediators Inflamm.* 2015; 2015: 531518.
2. Skogstrand K., Hagen C.M., Borbye-Lorenzen N., Christiansen M., Bybjerg-Grauholm J., Bækvad-Hansen M. et al. Reduced neonatal brain-derived neurotrophic factor is associated with autism spectrum disorders. *Transl. Psychiatry.* 2019; 9(1): 252.
3. Ohja K., Gozal E., Fahnestock M., Cai L., Cai J., Freedman J.H. et al. Neuroimmunologic and Neurotrophic Interactions in Autism Spectrum Disorders: Relationship to Neuroinflammation. *Neuromolecular Med.* 2018; 20(2): 161-73.
4. Toscano C.V.A., Barros L., Lima A.B., Nunes T., Carvalho H.M., Gaspar J.M. Neuroinflammation in autism spectrum disorders: Exercise as a “pharmacological” tool. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2021; 129: 63-74.
5. Matta S.M., Hill-Yardin E.L., Crack P.J. The influence of neuroinflammation in Autism Spectrum Disorder. *Brain Behav. Immun.* 2019; 79: 75-90.
6. Dipasquale V., Cutrupi M.C., Colavita L., Manti S., Cuppari C., Salpietro C. Neuroinflammation in Autism Spectrum Disorders: Role of High Mobility Group Box 1 Protein. *Int. J. Mol. Cell Med.* 2017; 6(3): 148-55.
7. Yirmiya R. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain Behav Immun.* 2011; 25(2): 181-213.
8. Minnone G., De Benedetti F., Bracci-Laudiero L. NGF and Its Receptors in the Regulation of Inflammatory Response. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18(5): 1028.
9. Calabrese F., Rossetti A.C., Racagni G., et al. Brain-derived neurotrophic factor: a bridge between inflammation and neuroplasticity. *Front. Cell Neurosci.* 2014; 22: 430.
10. Galic M.A., Riazi K., Pittman Q.J. Cytokines and brain excitability. *Front. Neuroendocrinol.* 2012; 33: 116–25.
11. Park H., Poo M.M. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat. Rev. Neurosci.* 2013; 14(1): 7-23.
12. Skaper S.D. Nerve growth factor: a neuroimmune crosstalk mediator for all seasons. *Immunology.* 2017; 151(1): 1-15.
13. Jin Y., Sun L.H., Yang W., Cui R.J., Xu S.B. The Role of BDNF in the Neuroimmune Axis Regulation of Mood Disorders. *Front. Neurol.* 2019; 10: 515.
14. Pancheva R., Georgieva M. Autism spectrum disorders: neurotrophins enter the dance. *Biomedical Reviews.* 2014; 25: 93-9.
15. Mostafa G.A., Meguid N.A., Shehab A.A.S., Elsaied A., Maher M. Plasma levels of nerve growth factor in Egyptian autistic children: Relation to hyperserotonemia and autoimmunity. *J. Neuroimmunol.* 2021; 358: 577638.
16. Goines P.E., Ashwood P. Cytokine dysregulation in autism spectrum disorders (ASD): possible role of the environment. *Neurotoxicol. Teratol.* 2013; 36: 67-81.
17. Baron-Cohen, S. Editorial perspective: neurodiversity – a revolutionary concept for autism and psychiatry. *J. Child Psychol. Psychiatry.* 2017; 58(6): 744-7.
18. Crespi B. Developmental heterochrony and the evolution of autistic perception, cognition and behavior. *BMC Med.* 2013; 11: 119.
19. Gomez-Fernandez A., de la Torre-Aguilar M.J., Gil-Campos M., Flores-Rojas K., Cruz-Rico M.D., Martin-Borreguero P. et al. Children With Autism Spectrum Disorder With Regression Exhibit a Different Profile in Plasma Cytokines and Adhesion Molecules Compared to Children Without Such Regression. *Front. Pediatr.* 2018; 6: 264.
20. Rodrigues D.H., Rocha N.P., Sousa L.F., Barbosa I.G., Kummer A., Teixeira A.L. Circulating levels of neurotrophic factors in autism spectrum disorders. *Neuro. Endocrinol. Lett.* 2014; 35(5): 380-4.
21. Aloe L., Rocco M.L., Bianchi P., Manni L. Nerve growth factor: from the early discoveries to the potential clinical use. *J. Transl. Med.* 2012; 10: 239.
22. Prencipe G., Minnone G., Strippoli R., De Pasquale L., Petrini S., Caiello I. et al. Nerve growth factor downregulates inflammatory response in human monocytes through TrkA. *J. Immunol.* 2014; 192(7): 3345-54.

Дорофеев А.С., Александрова Е.Н., Новиков А.А., Салиев К.Г., Сандлер Ю.Г., Винницкая Е.В.

## ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ СКРИНИНГОВЫХ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИНУКЛЕАРНЫХ АНТИТЕЛ С ПОМОЩЬЮ НЕПРЯМОЙ РЕАКЦИИ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ НА HEP-2 КЛЕТКАХ И ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ПРИ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ПЕЧЕНИ

ГБУЗ МКНЦ имени А.С. Логинова ДЗМ, 111123, Москва, Россия

*Антинуклеарные антитела (АНА) – гетерогенная группа аутоантител, реагирующих с различными компонентами клеточного ядра и цитоплазмы. АНА являются основным серологическим маркером аутоиммунных заболеваний печени (АИЗП).*

*Цель исследования – сравнить диагностическое значение двух методов скринингового определения АНА (непрямой реакции иммунофлюоресценции на клетках HEP-2 (HPIF-HEP-2) и иммуноферментного анализа (ИФА) в сыворотках больных АИЗП.*

*Исследованы сыворотки 118 больных АИЗП (51 – аутоиммунным гепатитом – АИГ, 19 – первичным билиарным холангитом – ПБХ, 48 – перекрестным синдромом – OVERLAP), 30 больных неалкогольной жировой болезнью печени (НАЖБП) и 30 здоровых доноров (ЗД). Определение АНА методом HPIF-HEP-2 осуществлялось путем визуальной оценки образцов под микроскопом AXIOSKOP 40, методом ИФА – на автоматическом анализаторе Alegria. Отмечена слабая степень согласованности положительных и отрицательных результатов скринингового исследования АНА при использовании HPIF-HEP-2 и ИФА (коэффициент каппа Коэна  $\kappa=0,4$ ). Скрининговое определение АНА у больных АИЗП методом HPIF-HEP-2 отличалось большей диагностической чувствительностью (ДЧ) (68,6%) и меньшей частотой выявления ложноотрицательных результатов (31,4%) по сравнению с ИФА (35,6% и 64,4% соответственно,  $p<0,05$ ). Общая диагностическая специфичность (ДС) исследования АНА в HPIF-HEP-2 была ниже, чем при применении ИФА (66,7% и 86,7% соответственно,  $p<0,05$ ). Оба скрининговых метода определения АНА (HPIF-HEP-2 и ИФА) являлись полезными для диагностирования АИЗП (отношение правдоподобия положительного результата исследования – ОППР: 2,1 и 2,6, соответственно). По уровню отношения правдоподобия отрицательного результата (ОПОР) скрининг АНА методом HPIF-HEP-2, в отличие от ИФА, служил «полезным» тестом для исключения диагноза АИЗП (0,5 и 0,8 соответственно).*

*Определение АНА с помощью HPIF-HEP-2 служит наиболее чувствительным и «полезным» скрининговым тестом для диагностики АИЗП, а ИФА относится к категории менее «полезных» скрининговых методов из-за низкой диагностической чувствительности и высокой частоты выявления ложноотрицательных результатов.*

**Ключевые слова:** антинуклеарные антитела; диагностическое значение; непрямая реакция иммунофлюоресценции на HEP-2 клетках; иммуноферментный анализ; аутоиммунные заболевания печени.

**Для цитирования:** Дорофеев А.С., Александрова Е.Н., Новиков А.А., Салиев К.Г., Сандлер Ю.Г., Винницкая Е.В. Диагностическое значение скрининговых методов определения антинуклеарных антител с помощью непрямой реакции иммунофлюоресценции на HEP-2 клетках и иммуноферментного анализа при аутоиммунных заболеваниях печени. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (11): 652-657. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-11-652-657>

**Для корреспонденции:** Дорофеев Алексей Сергеевич, мл. науч. сотр. лаб. научно-диагностических исследований; e-mail: a.dorofeev@mknc.ru

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

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

Поступила 17.08.2022

Принята к печати 23.09.2022

Опубликовано 14.11.2022

*Dorofeev A.S., Aleksandrova E.N., Novikov A.A., Saliev K.G., Sandler Yu.G., Vinnitskaya E.V.*

### DIAGNOSTIC VALUE OF SCREENING METHODS FOR THE DETERMINATION OF ANTINUCLEAR ANTIBODIES USING INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE ON HEP-2 CELLS AND ENZYME IMMUNOASSAY IN AUTOIMMUNE LIVER DISEASES

A.S. Loginov Moscow Clinical Research and Practical Center, Moscow Healthcare Department. Moscow, Russian Federation

*Antinuclear antibodies (ANA) are a heterogeneous group of autoantibodies that react with various components of the cell nucleus and cytoplasm. ANA is the main serological marker for autoimmune liver disease (AILD).*

*The aim of the study was to compare the diagnostic value of two methods of screening for the determination of ANA (indirect immunofluorescence reaction on HEP-2 cells (IIF-HEP-2) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the sera of AILD patients.*

*The sera of 118 patients with AILD (51 with autoimmune hepatitis – AIH, 19 with primary biliary cholangitis – PBC, 48 with overlapping syndrome – OVERLAP), 30 patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and 30 healthy donors (HD) were studied. Determination of ANA by the IIF-HEP-2 method was carried out by visual assessment of samples under an AXIOSKOP 40 microscope, by ELISA – on an Alegria automatic analyzer.*

*A weak degree of agreement between the positive and negative results of the ANA screening study using IIF-HEP-2 and ELISA (Cohen's kappa coefficient  $\kappa=0.4$ ) was noted. Screening determination of ANA in patients with AILD by the IIF-HEP-2 method was distinguished by greater diagnostic sensitivity (DS) (68.6%) and a lower frequency of false negative results (31.4%) compared with ELISA (35.6% and 64.4% respectively,  $p<0.05$ ). The overall diagnostic specificity (DS) of the ANA study in IIF-HEP-2 was lower than with ELISA (66.7% and 86.7%, respectively,  $p<0.05$ ). Both screening methods for determining ANA (IIF-HEP-2 and ELISA)*

were useful for diagnosing AILD (positive likelihood ratio – LR+: 2.1 and 2.6, respectively). In terms of the negative likelihood ratio (LR-), screening for ANA by the IIF-HEp-2 method, in contrast to ELISA, served as a “useful” test to exclude the diagnosis of AILD (0.5 and 0.8, respectively).

The determination of ANA using IIF-HEp-2 is the most sensitive and “useful” screening test for the diagnosis of AILD, and ELISA is classified as a less “useful” screening method due to low diagnostic sensitivity and a high false-negative rate.

**Key words:** antinuclear antibodies; diagnostic value; indirect immunofluorescence reaction on HEp-2 cells; enzyme-linked immunosorbent assay; autoimmune liver disease.

**For citation:** Dorofeev A.S., Aleksandrova E.N., Novikov A.A., Saliev K.G., Sandler Yu.G., Vinnitskaya E.V. Diagnostic value of screening methods for the determination of antinuclear antibodies using indirect immunofluorescence on HEp-2 cells and enzyme immunoassay in autoimmune liver diseases. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (11): 652-657 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-11-652-657>

**For correspondence:** Dorofeev Aleksey Sergeevich, junior researcher laboratory of scientific and diagnostic research; e-mail: a.dorofeev@mknc.ru

**Information about authors:**

Dorofeev A.S., <https://orcid.org/0000-0002-8515-6658>;  
Aleksandrova E.N., <https://orcid.org/0000-0003-4074-5907>;  
Novikov A.A., <https://orcid.org/0000-0002-2738-2956>;  
Saliev K.G., <https://orcid.org/0000-0002-4581-7052>;  
Sandler Yu.G., <https://orcid.org/0000-0003-4291-812X>;  
Vinnitskaya E.V., <https://orcid.org/0000-0002-0344-8375>.

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

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

Received 17.08.2022  
Accepted 23.09.2022  
Published 00.11.2022

Аутоиммунные заболевания печени (АИЗП) – хронические заболевания печени неясной этиологии, характеризующиеся потерей иммунологической толерантности и развитием иммунного ответа против неизменных компонентов печеночной паренхимы и эпителия желчных протоков, что приводит к персистирующему иммуноопосредованному воспалению, прогрессирующей деструкции ткани печени, фиброзу и циррозу [1-5]. Основными нозологическими формами АИЗП являются аутоиммунный гепатит (АИГ), первичный билиарный холангит (ПБХ) и первичный склерозирующий холангит (ПСХ). Отдельную группу аутоиммунных поражений печени составляют перекрестные синдромы (OVERLAP), имеющие наряду с клиническими, лабораторными, инструментальными и гистологическими признаками АИГ критерии аутоиммунного холестатического заболевания (ПБХ, ПСХ или аутоиммунного холангита) [6-9].

Развитие патологического процесса при АИЗП сопровождается образованием широкого спектра аутоантител, реагирующих с различными антигенами-мишенями в гепатоцитах, холангиоцитах и нейтрофилах [10-12]. В число основных серологических маркеров, используемых для диагностики АИЗП, входят антинуклеарные антитела (АНА) – гетерогенная группа аутоантител, реагирующих с различными компонентами клеточного ядра и цитоплазмы (антитела к двуспиральной ДНК, гистонам, нуклеосомам, рибонуклеопротеинам, Ro/SSA, La/SSB, центромерам, sp100, gp210, F-актину, митохондриям и др.) [13]. В последние годы особое внимание уделяется методологическим аспектам исследования АНА при АИЗП [12, 14]. Существующие диагностические критерии АИГ включают положительные результаты скринингового определения АНА в сыворотке крови с помощью непрямой реакции иммунофлюоресценции (НРИФ) на криостатных срезах печени/почек крыс (мышей) в титрах  $\geq 1:40$  [5, 10, 15 – 19].

В то же время, согласно отечественным и международным рекомендациям, стандартным скрининговым методом исследования АНА служит НРИФ с использованием в качестве субстрата HEp-2 клеток – эпителиальных клеток рака гортани человека (АНА-НРИФ-HEp-2) [13]. По сравнению с НРИФ на криостатных срезах мышечной или крысиной печени (почек), применение НРИФ-HEp-2 для обнаружения АНА в титрах  $\geq 1:160$  позволяет существенно повысить чувствительность метода и дифференцировать различные типы флюоресценции, встречающиеся не только при АИГ (гомогенное, крапчатое ядерное свечение), но и у больных ПБХ (паттерны, ассоциирующиеся с антителами к sp100, gp210, центромерам и митохондриям). В лабораторной практике широкое распространение получил скрининговый метод определения АНА в сыворотках больных АИЗП на основе иммуноферментного анализа (ИФА) [10, 20, 21]. Данные литературы, касающиеся сравнительной оценки диагностической ценности скрининговых методов исследования АНА в сыворотках больных АИЗП с использованием НРИФ-HEp-2 и ИФА, немногочисленны и варьируют в зависимости от особенностей антигенов и реагентов в применяемых тест-системах, уровней позитивности антител и подбора групп больных [14, 22, 23].

Цель исследования – сравнить диагностическое значение двух методов скринингового определения АНА (НРИФ-HEp-2 и ИФА) в сыворотках больных АИЗП.

**Материал и методы.** Исследованы сыворотки 118 больных АИЗП: 51 – АИГ (44 женщины и 7 мужчин) в возрасте 51,8 (25-79) года, 19 – ПБХ (18 женщин и 1 мужчина) в возрасте 51,4 (25-72) года, 48 – OVERLAP (АИГ/ПБХ, АИГ/ПСХ) (44 женщины и 4 мужчины) в возрасте 53,6 (28-70) лет. Диагнозы АИЗП были установлены в соответствии с международными и отечественными диагностическими критериями [5, 15, 16] и подтверждены результатами морфологического исследова-

дования биоптата печени. Больные наблюдались в ГБУЗ МКНЦ имени А.С. Логинова ДЗМ с 2018 по 2020 год. Группу сравнения составили 30 больных неалкогольной жировой болезнью печени (НАЖБП). В контрольную группу вошли 30 здоровых доноров (ЗД). Обе группы были сопоставимы по полу и возрасту с обследованными больными АИЗП. Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на исследование.

Скрининговое исследование АНА в сыворотках крови осуществлялось двумя методами: НРИФ-НЕр-2 с использованием коммерческого набора реагентов Immco Hep-2-Cell Anti-Nuclear Antibodi IFA Kit ("Immco Diagnostics", США) путем визуальной оценки образцов флюоресценции под микроскопом AXIOSKOP 40 ("Zeiss", Германия) и ИФА на анализаторе «Alegria» («ANA-screen» (смеси 8 антигенов), «Orgentec», ФРГ). Верхние пределы референсных интервалов (ВПРИ) при измерении АНА соответствовали следующим значениям:  $\geq 1:160$  (НРИФ-НЕр-2),  $\geq 1,0$  ЕД/мл (ИФА).

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ "Statistica 8.0" ("StatSoft", США). Для измерения степени согласованности результатов определения АНА различными методами использовался коэффициент каппа ( $\kappa$ ) Коэна. Результаты представлены в виде медианы (Me) с интерквартильным размахом 25-75 перцентиль. Корреляционный анализ проводился по методу Спирмена. Различия считались значимыми при  $p < 0,05$ . Оценка клинической информативности скрининговых методов исследования АНА осуществлялась путем расчета диагностической чувствительности и специфичности (ДЧ и ДС), отношение правдоподобия положительного и отрицательного результата теста (ОППР и ОПОР). Наиболее «полезными» для диагностики АИЗП считались методы определения АНА с ОППР  $> 5$  и ОПОР  $< 0,2$ ; «полезными» – с ОППР  $> 2$  и  $\leq 5$ , ОПОР  $> 0,2$  и  $\leq 0,5$ ; «не имеющими пользы» – с ОППР  $\leq 2$  и ОПОР  $> 0,5$ .

**Результаты.** Данные о частоте скринингового обнаружения АНА методами НРИФ-НЕр-2 и ИФА в сыворотках больных АИЗП, НАЖБП и ЗД представлены в табл.1. Как следует из таблицы, АНА-НРИФ-НЕр-2 при АИГ (78,4%), ПБХ (84,2%) и OVERLAP (72,9%) выявлялись значительно чаще, чем у больных НАЖБП (66,0%) и ЗД (0%) ( $p < 0,05$  во всех случаях). В группе больных ПБХ отмечалась более высокая частота обнаружения АНА-НРИФ-НЕр-2 по сравнению с больными АИГ ( $p = 0,048$ ). Скрининг АНА методом ИФА показал увеличение частоты положительных результатов тестирования у больных АИГ (33,3%), ПБХ (31,6%) и OVERLAP (39,6%) относительно ЗД (3,3%) ( $p < 0,05$  во всех случаях), а при АИГ и OVERLAP – также относительно НАЖБП (23,3%) ( $p = 0,03$  и  $p = 0,006$ , соответственно). Среди больных НАЖБП, частота выявления АНА при использовании обоих скрининговых тестов (НРИФ-НЕр-2 и ИФА) достоверно превышала таковую у ЗД ( $p < 0,05$ ). При АИЗП и НАЖБП метод ИФА демонстрировал меньшую частоту положительных результатов скринингового исследования АНА в сыворотке крови по сравнению с НРИФ-НЕр-2 ( $p < 0,05$ ).

У большинства больных АИГ с положительными результатами определения АНА-НРИФ-НЕр-2 иден-

тифицировались различные варианты смешанных типов ядерного и цитоплазматического свечения (66,6%) (табл.2). Среди АНА-НРИФ-НЕр-2 – позитивных больных ПБХ, частота изолированного цитоплазматического митохондриального свечения (АС-21) составляла 25,0%, смешанных типов свечения с наличием центрального ядерного (АС-3), множественно-точечного ядерного (АС-6) и митохондриального цитоплазматического (АС-21) паттернов – 43,8%, других разновидностей смешанного свечения – 18,8%. В группе больных OVERLAP, позитивных по АНА-НРИФ-НЕр-2, также преобладали изолированное митохондриальное (АС-21) (22,9%) и смешанные типы свечения (68,6%), в том числе, с присутствием паттернов АС-3, АС-6, АС-21. У АНА-НРИФ-НЕр-2-позитивных больных НАЖБП наиболее часто отмечались ядерный крапчатый (АС-4, 5) (30,0%) и смешанный тип свечения с отсутствием паттернов АС-3, АС-6, АС-21 (35%).

Сравнительная частота позитивных/негативных результатов исследования АНА в сыворотках 178 больных АИЗП, НАЖБП и ЗД при использовании методов НРИФ-НЕр-2 и ИФА представлена в табл. 3. Позитивные/негативные результаты определения АНА в НРИФ-НЕр-2 и ИФА совпадали в 52,2% случаев (позитивные – у 18,5%, негативные – у 33,7% пациентов). Среди 101 пробы, позитивной по данным НРИФ-НЕр-2, у 33 (32,7%) положительные результаты выявления АНА были подтверждены ИФА. Среди 77 проб с отрицательными результатами определения АНА методом НРИФ-НЕр-2, 60 (77,9%) проб имели негативные показатели и при использовании метода ИФА. Несовпадение позитивных и негативных результатов исследования АНА при сравнении методов исследования НРИФ-НЕр-2 и ИФА отмечалось у 85 (47,8%) человек. 68 (38,2%) больных АИЗП, НАЖБП и ЗД были АНА-позитивными при использовании НРИФ-НЕр-2, но АНА-негативными по данным ИФА. У 17 (9,6%) проб АНА выявлялись методом ИФА и не идентифицировались с помощью НРИФ-НЕр-2. Степень согласованности позитивных/негатив-

Таблица 1

**Частота скринингового обнаружения АНА методами НРИФ-НЕр-2 и ИФА в сыворотках больных АИГ, ПБХ, OVERLAP, НАЖБП и здоровых доноров**

Группы обследованных, n (%)	НРИФ-НЕр-2	ИФА
АИГ, n = 51	30 (78,4) <sup>1,2,5</sup>	17 (33,3) <sup>****</sup>
ПБХ, n = 19	16 (84,2) <sup>1,4,5</sup>	6 (31,6) <sup>***</sup>
OVERLAP, n = 48	35 (72,9) <sup>3,5</sup>	19 (39,6) <sup>****</sup>
НАЖБП, n = 30	20 (66,0) <sup>2,3,4,5</sup>	7 (23,3) <sup>*****</sup>
ЗД, n = 30	0 (0) <sup>5</sup>	1 (3,3) <sup>***</sup>

Примечание. Достоверность различий в частоте обнаружения АНА при использовании НРИФ-НЕр-2:

–  $p = 0,048$  между больными АИГ и ПБХ; <sup>2</sup> –  $p = 0,04$  между больными АИГ и НАЖБП; <sup>3</sup> –  $p = 0,004$  между больными OVERLAP и НАЖБП; <sup>4</sup> –  $p = 0,0005$  между больными ПБХ и НАЖБП; <sup>5</sup> –  $p < 0,05$  между больными АИЗП, НАЖБП и ЗД.

Достоверность различий в частоте обнаружения АНА при использовании ИФА: \* –  $p = 0,03$  между больными АИГ и НАЖБП; \*\* –  $p = 0,006$  между больными OVERLAP и НАЖБП; \*\*\* –  $p < 0,05$  между больными АИЗП, НАЖБП и ЗД.

**Частота обнаружения различных типов свечения у больных АИЗП и НАЖБП с положительными результатами определения АНА в НРИФ-НЕР-2**

Типы свечения, n (%)	Группы обследованных			
	АИГ (n=30)	ПБХ (n=16)	OVERLAP (n=35)	НАЖБП (n=20)
Центромерное ядерное (АС-3)	0 (0)	0 (0)	2 (5,7)	1 (5)
Крапчатое ядерное (АС-4, 5)	6 (20)	2 (12,5)	1 (2,9)	6 (30)
Митохондриальное цитоплазматическое (АС-21)	2 (6,7)	4 (25)	8 (22,9)	3 (15)
Цитоплазматическое фибриллярное линейное, дискретное точечное, мелко-крапчатое (АС-15, АС-18, АС-19, АС-20)	2 (6,7)	0 (0)	0 (0)	1 (5)
Смешанное с наличием центромерного ядерного (АС-3), множественно-точечного ядерного (АС-6) и митохондриального цитоплазматического (АС-21) паттернов (АС-1, АС-3, АС-4, АС-5, АС-6, АС-7, АС-9, АС-10, АС-19, АС-21)	10 (33,3)	7 (43,8)	15 (42,9)	2 (10)
Смешанное ядерное, цитоплазматическое без АС-3, АС-6 и АС-21 (АС-1, АС-2, АС-4, АС-5, АС-10, АС-16, АС-18, АС-19, АС-20)	10 (33,3)	3 (18,8)	9 (25,7)	7 (35)

Примечание. АС – кодировка типов клеточного свечения (антиклеточных “anti-cell” паттернов) согласно номенклатуре, разработанной Международным консенсусом по паттернам АНА (“International consensus on ANA patterns” – ICAP) [24]. Жирным шрифтом выделены паттерны с наличием центромерного ядерного (АС-3), множественно-точечного ядерного (АС-6) и митохондриального цитоплазматического (АС-21) типа свечения, наиболее характерных для АИЗП.

**Сравнение частоты положительных и отрицательных результатов определения АНА в сыворотках 178 больных АИЗП, НАЖБП и ЗД при использовании методов НРИФ-НЕР-2 и ИФА**

НРИФ-НЕР-2 n (%)	ИФА, n (%)		
	Позитивный $\geq 1,0$ ЕД/мл	Негативный $< 1,0$ ЕД/мл	n (%)
Позитивный $\geq 1:160$	33 (18,5)	68 (38,2)	101 (56,7)
Негативный $< 1:160$	17 (9,6)	60 (33,7)	77 (43,3)
n (%)	50 (28,1)	128 (71,9)	178

ных результатов исследования АНА при интерпретации данных с помощью НРИФ-НЕР-2 и ИФА оценивалась как «слабая» ( $\alpha=0,4$ ).

У пациентов с АИГ, ПБХ, OVERLAP скрининговое определение АНА методом НРИФ-НЕР-2 показало более высокую ДЧ по сравнению с ИФА (72,9-84,2% vs 31,6-39,6%,  $p<0,05$ ) (табл. 4). Среди больных АИЗП, максимальные показатели ДЧ исследования АНА в НРИФ-НЕР-2 и минимальные значения ДЧ в случае измерения АНА с помощью ИФА наблюдались в группе ПБХ (84,2% и 31,6%, соответственно). При использовании НРИФ-НЕР-2 ложноотрицательные результаты скринингового определения АНА регистрировались у 31,4% – больных АИЗП (21,6% – АИГ, 15,8% – ПБХ, 27,1% – OVERLAP), ИФА – у 64,4% (66,7% – АИГ, 68,4% – ПБХ, 60,4% – OVERLAP) ( $p<0,05$ ). Общая ДС исследования АНА в НРИФ-НЕР-2 была ниже, чем при применении ИФА (66,7% и 86,7% соответственно,  $p<0,05$ ). Однако, относительно группы ЗД, показатели ДС скрининга АНА методами НРИФ-НЕР-2 и ИФА достоверно не различались, составляя 100% и 96,7% ( $p>0,05$ ). Оба метода исследования АНА (НРИФ-НЕР-2 и ИФА) являлись полезными тестами для диагностирования АИЗП (ОППР: 2,1 и 2,6, соответственно). По уровню ОПОР скрининговое определение АНА методом НРИФ-НЕР-2, в отличие от ИФА, служило «полезным» тестом для исключения диагноза АИЗП (0,5 и 0,8, соответственно).

**Обсуждение.** Полученные данные свидетельствуют о слабой согласованности результатов скринингового исследования АНА в сыворотках больных АИЗП при использовании НРИФ-НЕР-2 и ИФА. Важным фактором

несовпадения положительных/отрицательных результатов идентификации АНА с помощью НРИФ-НЕР-2 и ИФА является расхождение в чувствительности обоих методов. Как известно, НРИФ-НЕР-2, позволяющая выявлять антитела к 100-150 ядерным и цитоплазматическим антигенам путем визуального распознавания различных типов свечения, служит наиболее чувствительным скрининговым методом определения совокупности АНА в сыворотке крови [13, 25]. Технология ИФА, в большинстве случаев, не может заменить первичный скрининг АНА на основе НРИФ-НЕР-2, так как идентифицирует антитела к ограниченному количеству (8–10) очищенных/рекомбинантных антигенов или смеси антигенов (ядерному гомогенату) с измененными, либо утраченными эпитопами, что приводит к снижению ДЧ и увеличению числа ложноотрицательных результатов [20]. В нашей работе скрининговое определение АНА у больных АИЗП методом НРИФ-НЕР-2 отличалось большей ДЧ (68,6%) и меньшей частотой ложноотрицательных результатов (31,4%) по сравнению с ИФА (35,6% и 64,4%, соответственно). Более высокая ДЧ исследования АНА-НРИФ-НЕР-2 при АИГ, ПБХ и OVERLAP может быть обусловлена выявлением паттернов, ассоциирующихся с антителами к тем ядерным и цитоплазматическими аутоантигенам (sp100, митохондриальным, ядрышковым антигенам, тропомиозину, лизосомам, неизвестным антигенам), которые отсутствуют в стандартной смеси антигенов, используемых для тестирования АНА методом ИФА. Общая ДС скринингового исследования АНА-НРИФ-НЕР-2 у больных АИЗП была ниже, чем при использовании ИФА (66,7%

Таблица 4

**Диагностическая ценность двух методов скринингового определения АНА (НРИФ-НЕР-2 и ИФА) в сыворотках больных АИЗП (n=118)**

Показатели диагностической ценности	Группы обследованных	НРИФ-НЕР-2	ИФА
ДЧ (%)*	АИЗП (n=118)	68,6	35,6
	АИГ (n=51)	78,4	33,3
	ПБХ (n=19)	84,2	31,6
	OVERLAP (n=48)	72,9	39,6
ДС (%)**	НАЖБП (n=30)	33,3	76,7
	ЗД (n=30)	100,0	96,7
	Общая группа (n=60)	66,7	86,7
ОППР	АИЗП	2,1	2,7
	АИГ	2,4	2,5
	ПБХ	2,5	2,4
	OVERLAP	2,2	2,9
	АИЗП	0,5	0,7
ОПОР	АИГ	0,3	0,8
	ПБХ	0,2	0,8
	OVERLAP	0,4	0,7

Примечание. \* – ДЧ определения АНА методом НРИФ-НЕР-2 по сравнению с ИФА при АИЗП ( $p=0,0001$ ), АИГ ( $p=0,02$ ), ПБХ ( $p=0,001$ ) и OVERLAP ( $p=0,03$ ). \*\* – расчет показателей ОП проводился относительно общей группы больных НАЖБП и ЗД.

vs 86,7%), из-за более высокой, по сравнению с ИФА, частоты обнаружения АНА в НРИФ-НЕР-2 среди пациентов с НАЖБП (66,0% vs 23,3%). Отмечено, что количество положительных результатов определения АНА методом НРИФ-НЕР-2 при НАЖБП может возрастать на фоне иммуновоспалительных нарушений, инсулинорезистентности, повышения возраста пациентов [26-30]. J. Galaski и соавт. [14], исследовавшие сыворотки 113 больных АИГ и 202 лиц контрольной группы (82 пациентов с НАЖБП, 99 пациентов с ПСХ и 21 ЗД), показали возможность использования НРИФ-НЕР-2 и ИФА в качестве альтернативы скрининговому определению АНА с помощью рутинного метода НРИФ на криостатных срезах печени, почек и желудка примата/крысы. В работе получены сходные с нашими данные о ДЧ (75,4%), но более высокие значения ДС (73,6%) тестирования АНА-НРИФ-НЕР-2 у больных АИГ, что может быть связано с различиями в подборе групп сравнения и контроля. Показатели диагностической ценности скринингового определения АНА методом ИФА варьировали в зависимости от спектра ядерных/цитоплазматических антигенов и уровней ВПРИ, использовавшихся фирмами-производителями различных тест-систем. При применении наборов реагентов фирм “Euroimmun” (ФРГ) (8 антигенов; ВПРИ $\geq 1,0$  ЕД/мл) и “Bio-Rad” (США) (8 антигенов и ядерный экстракт из НЕР-2 клеток; ВПРИ $\geq 1,0$  ЕД/мл) для ИФА, значения ДЧ АНА у больных АИГ (22,1% и 65,5%) были достоверно ниже таковых у АНА-НРИФ-НЕР-2 ( $p<0,05$ ), а ДС (95,0% и 88,6%) – выше ( $p<0,05$ ),

что соответствует результатам наших исследований. ДЧ (79,6%) и ДС (78,2%) скринингового определения АНА методом ИФА с помощью тест-систем «Inova Diagnostics» (11 антигенов и ядерный экстракт из НЕР-2 клеток; ВПРИ $\geq 20,0$ ) совпадали с данными показателями у АНА-НРИФ-НЕР-2. Судя по площади под характеристическими (ROC) кривыми (ППК), НРИФ-НЕР-2 (ППК: 0,82-0,91) и две технологии ИФА с использованием ядерного экстракта из НЕР-2 клеток (ППК: 0,85-0,87) являются эффективными диагностическими скрининговыми методами для диагностики АИГ. В нашей работе ранги ОППР ( $>2$  и  $\leq 5$ ) также позволяют отнести выявление АНА с помощью НРИФ-НЕР-2 и ИФА к числу «полезных» скрининговых тестов для диагностики АИЗП. Следует подчеркнуть, что по уровню ОПОР скрининг АНА в НРИФ-НЕР-2 оказался самым «полезным» тестом (0,2-0,5) для исключения диагноза АИГ, ПБХ или OVERLAP.

**Выводы:**

1. Полученные данные свидетельствуют о слабой степени согласованности положительных и отрицательных результатов скринингового исследования АНА в сыворотках больных АИЗП при использовании НРИФ-НЕР-2 и ИФА ( $\kappa=0,4$ ).

2. Определение АНА методом НРИФ-НЕР-2 является наиболее чувствительным и «полезным» первичным скрининговым тестом для диагностики АИЗП.

3. ИФА антител к смеси ядерных антигенов относятся к категории менее «полезных» скрининговых тестов для диагностики АИЗП из-за низкой чувствительности и более высокой частоты выявления ложноотрицательных результатов по сравнению с НРИФ-НЕР-2 (64,4% и 31,4%, соответственно).

ЛИТЕРАТУРА (2-4, 6, 8-32 см. REFERENCES)

- Ивашкин В.Т., Буевров А.О. Аутоиммунные заболевания печени в практике клинициста. М.: М-Вести; 2001.
- Винницкая Е.В., Сандлер Ю.Г., Бакулин И.Г., Парфенов А.И., Ильченко Л.Ю., Никитин И.Г. и др. Актуальные вопросы диагностики и лечения аутоиммунного гепатита (по материалам Российского консенсуса. 2017 г.). *Терапевтический архив*. 2018; 90 (2): 12-8. DOI: 10.26442/terarkh201890212-18.
- Подымова С.Д., Перекрестные аутоиммунные синдромы в гепатологии. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2013; (4): 3-12.

REFERENCES

- Ivashkin V.T., Bueverov A.O. Autoimmune liver diseases in the practice of a clinician. Moscow: M-Vesti; 2001. (in Russian)
- Invernizzi P. Liver auto-immunology: the paradox of autoimmunity in a tolerogenic organ. *Journal of Autoimmunity*. 2013 Oct; 46:1-6. DOI: 10.1016/j.jaut.2013.08.006.
- Liberal R., Grant C.R. Cirrhosis and autoimmune liver disease: Current understanding. *World J. Hepatol*. 2016; 8 (28): 1157-68. DOI: 10.4254/wjh.v8.i28.1157.
- Cristen U., Hintermann E. Autoantibodies in Autoimmune Hepatitis: Can Epitopes Tell Us about the Etiology of the Disease? *Front Immunol*. 2018 Feb 16; 9: 163. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00163.
- Vinnitskaya E.V., Sandler Yu.G., Bakulin I.G., Parfenov A.I., Il'chenko L.Yu., Nikitin I.G. et al. Important problems in the diagnosis and treatment of autoimmune hepatitis (based on the Russian consensus 2017). *Terapevticheskiy arkhiv*. 2018 Feb 15; 90 (2): 12-8. DOI: 10.26442/terarkh201890212-18. (in Russian)

6. Boberg K.M., Chapman R.W., Hirschfield G.M., Lohse A.W., Manns M.P., Schrupf E. Overlap syndromes: The International Autoimmune Hepatitis Group (IAIHG) position statement on a controversial issue. *Journal of Hepatology*. 2011 Feb; 54 (2): 374-85. DOI: 10.1016/j.jhep.2010.09.002.
7. Podymova S.D. Cross autoimmune syndromes in hepatology. *Experimental'naya I klinicheskaya gastroenterologiya*. 2013 4: 3-12. (in Russian)
8. Czaja A.J., Autoantibody-Negative Autoimmune Hepatitis. *Dig. Dis. Sci.* 2012; 57: 610-24. DOI: 10.1007/s10620-011-2017-z.
9. Chazouillères O. Overlap Syndromes. *Dig Dis*. 2015; 33 (suppl. 2): 181-7. DOI:10.1159/000440831.
10. Vergani D., Alvarez F., Bianchi F.B., Cancado E.L., Mackay I.R., Manns M.P. et al. International Autoimmune Hepatitis Group. Liver autoimmune serology: a consensus statement from the committee for autoimmune serology of the International Autoimmune Hepatitis Group. *Journal of Hepatology*. 2004; 41: 677-83. DOI:10.1016/j.jhep.2004.08.002.
11. Czaja A.J. Autoantibodies as Prognostic Markers in Autoimmune Liver Disease. *Dig. Dis. Sci.* 2010; 55: 2144-61. DOI: 10.1007/s10620-010-1268-4.
12. Terziroli Beretta-Piccoli B., Mieli-Vergani G., Vergani D. Serology in autoimmune hepatitis: A clinical-practice approach. *European Journal of Internal Medicine* 48 (2018) 35-43. DOI:10.1016/j.ejim.2017.10.006.
13. Agmon-Levin N., Damoiseaux J., Kallenberg C., Sack U., Witte T., Herold M. et al. International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *Ann. Rheum. Dis.* 2014; 73 (1): 17-23. DOI: 10.1136/annrheumdis-2013-203863.
14. Galaski J., Weiler-Normann C., Schakat M., Zachou K., Muratori P., Lampalzer S. et al. Update of the simplified criteria for autoimmune hepatitis: evaluation of the methodology for immunoserological testing. *Journal Pre-proof*. 2020. DOI: 10.1016/j.jhep.2020.07.032.
15. Mack C.L., Adams D., Assis D.N., Kerkar N., Manns M.P., Mayo M.J. et al. Diagnosis and Management of Autoimmune Hepatitis in Adults and Children: 2019 Practice Guidance and Guidelines from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2020 Aug; 72 (2): 671-722. DOI: 10.1002/hep.31065.
16. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Autoimmune hepatitis. *J. Hepatol.* 2015; 63: 971-1004. DOI:10.1016/j.jhep.2015.09.016.
17. Hennes E.M., Zeniya M., Czaja A.J., Parés A., Dalekos G.N., Krawitt E.L. et al. Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2008 Jul; 48 (1): 169-76. DOI: 10.1002/hep.22322.
18. Lindor K.D., Gershwin M.E., Poupon R., Kaplan M., Bergasa N.V., Heathcote E. et al. Primary biliary cirrhosis. American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2009 Jul; 50 (1): 291-308. DOI: 10.1002/hep.22906.
19. Alvarez F., Berg P.A., Bianchi F.B., Bianchi L., Burroughs A.K., Cancado E.L. et al. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *Journal of Hepatology*. 1999 Nov; 31 (5): 929-38. DOI: 10.1016/s0168-8278(99)80297-9.
20. Bogdanos D.P., Invernizzi P., Mackay I.R., Vergani D. Autoimmune liver serology: current diagnostic and clinical challenges. *World J. Gastroenterol.* 2008 Jun 7; 14 (21): 3374-87. DOI: 10.3748/wjg.14.3374.
21. Lindor K.D., Bowlus C.L., Boyer J., Levy C., Mayo M. Primary Biliary Cholangitis: 2018 Practice Guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2019 Jan; 69 (1): 394-419. DOI: 10.1002/hep.30145.
22. Zhang W., De D., Mohammed K.A., Munigala S., Chen G., Lai J.P. et al. New Scoring Classification for Primary Biliary Cholangitis-Autoimmune Hepatitis Overlap Syndrome. *Hepatology Communications*, 2018 Feb 20; 2 (3): 245-253. DOI: 10.1002/hep4.1148.
23. Czaja A.J. Performance Parameters of the Conventional Serological Markers for Autoimmune Hepatitis. *Dig. Dis. Sci.* 2011 Feb; 56 (2): 545-54. DOI: 10.1007/s10620-010-1501-1.
24. Chan E.K.L., von Mühlen C.A., Fritzler M.J., Damoiseaux J., Infantino M., Klotz W. et al. ICAP Committee. The International Consensus on ANA Patterns (ICAP) in 2021-The 6th Workshop and Current Perspectives. *J. Appl. Lab. Med.* 2022; 7 (1): 322-30. DOI: 10.1093/jalm/jfab140.
25. Meroni P.L., Schur P.H. ANA screening: an old test with new recommendations. *Ann. Rheum. Dis.* 2010; 69 (8): 1420-2. DOI: 10.1136/ard.2009.
26. Cotler S.J., Kanji K., Keshavarzian A., Jensen D.M., Jakate S. Prevalence and significance of autoantibodies in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *J. Clin. Gastroenterol.* 2004 Oct; 38 (9): 801-4. DOI: 10.1097/01.mcg.0000139072.38580.a0.
27. Tsuneyama K., Baba H., Kikuchi K., Nishida T., Nomoto K., Hayashi S. et al. Autoimmune features in metabolic liver disease: a single-center experience and review of the literature. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2013 Aug; 45 (1): 143-8. DOI: 10.1007/s12016-013-8383-x.
28. Loria P., Lonardo A., Leonardi F., Fontana C. Carulli L., Verone A.M. et al. Non-organ-specific autoantibodies in non-alcoholic fatty liver disease: prevalence and correlates. *Dig. Dis. Sci.* 2003 Nov; 48 (11): 2173-81. DOI: 10.1023/b:ddas.0000004522.36120.08.
29. Mitra A, Ray S. High-Titre ANA Positivity in NAFLD: An Uncommon Presentation of a Common Disease. *Eur. J. Case Rep. Intern. Med.* 2020 Jun 8; 7 (9): 001714. DOI: 10.12890/2020\_001714.
30. Adams L.A., Lindor K.D., Angulo P. The prevalence of autoantibodies and autoimmune hepatitis in patients with nonalcoholic Fatty liver disease. *Am. J. Gastroenterol.* 2004 Jul; 99 (7): 1316-20. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2004.30444.x.

## КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Марданлы С.С.<sup>1</sup>, Марданлы С.Г.<sup>1</sup>, Казаков А.А.<sup>2</sup>, Дёмкин В.В.<sup>2</sup>, Затевалов А.М.<sup>3</sup>, Миронов А.Ю.<sup>3,4</sup>

### РАЗРАБОТКА ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ВИРУСА ГЕРПЕСА ЧЕЛОВЕКА 7 ТИПА

<sup>1</sup>ЗАО «Эколаб», Электрогорск, 142530. Россия;

<sup>2</sup>ФГБУ «Институт молекулярной генетики НИЦ «Курчатовский институт», 123182, Москва, Россия;

<sup>3</sup>ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия;

<sup>4</sup>Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России, 115682, Москва, Россия

*Разработана ПЦР-тест-система для детекции ДНК вируса герпеса человека 7 типа. Поиск и отбор консервативных участков проведён, сравнивая полногеномные нуклеотидные последовательности ВГЧ-7. В качестве мишени для амплификации выбран дублированный в геномах ВГЧ-7 фрагмент. Отработка работоспособности тест-систем проведена на синтетической матрице и клиническом материале. Разработанная тест-система обладает высокой чувствительностью и специфичностью и показала хорошую эффективность выявления ДНК ВГЧ-7 в клиническом материале.*

**Ключевые слова:** ПЦР-тест-система; ВГЧ-7; ВГЧ7; ПЦР; молекулярно-генетический анализ.

**Для цитирования:** Марданлы С.С., Марданлы С.Г., Казаков А.А., Демкин В.В., Затевалов А.М., Миронов А.Ю. Разработка ПЦР-тест-системы для детекции вируса герпеса человека 7 типа. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (11): 658-662. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-11-658-662>

**Для корреспонденции:** Затевалов Александр Михайлович, гл. науч. сотр. лаб. диагностики и профилактики инфекционных заболеваний: e-mail: [zatevalov@gabrich.ru](mailto:zatevalov@gabrich.ru)

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

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

Поступила 17.08.2022

Принята к печати 27.09.2022

Опубликовано 00.11.2022

Mardanly S.S.<sup>1</sup>, Mardanly S.G.<sup>1</sup>, Kazakov A.A.<sup>2</sup>, Demkin V.V.<sup>2</sup>, Zatevalov A.M.<sup>3</sup>, Mironov A.Yu.<sup>3,4</sup>

### DEVELOPMENT OF A PCR ASSAY FOR THE DETECTION OF HUMAN HERPES VIRUS TYPE 7

<sup>1</sup>CJSC «Ekolab», 142530, Elektrogorsk, Russia;

<sup>2</sup>Federal State Budgetary Institution "Institute of Molecular Genetics, National Research Center "Kurchatov Institute", 123182, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>G. N. Gabrichevsky research institute for epidemiology and microbiology of the Rospotrebnadzor, 125212, Moscow, Russia;

<sup>4</sup>Federal Scientific and Clinical Center for Specialized Types of Medical Care and Medical Technologies of the FMBA of Russia, 115682, Moscow, Russia

*A PCR assay has been developed to identify the DNA of the human herpes virus type 7. The search and selection of conserved regions was carried out by comparing the whole genome nucleotide sequences of HHV-7. A fragment duplicated in the HHV-7 genomes was chosen as a target for amplification. The performance of the assay was tested on a synthetic matrix and clinical samples. The developed assay has high sensitivity and specificity and showed good efficiency in detecting HHV-7 DNA in clinical samples.*

**Key words:** PCR assay; HHV-7; HHV7; PCR; molecular genetic analysis.

**For citation:** Mardanly S.S., Mardanly S.G., Kazakov A.A., Demkin V.V., Zatevalov A.M., Mironov A.Yu. Development of a PCR assay for the detection of human herpes virus type 7. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (11): 658-662 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-11-658-662>

**For correspondence:** Zatevalov A.M., Chief Researcher, Laboratory for Diagnosis and Prevention of Infectious Diseases; e-mail: [zatevalov@gabrich.ru](mailto:zatevalov@gabrich.ru)

#### Information about authors:

Mardanly S.S., <https://orcid.org/0000-0002-4440-6075>;

Mardanly S.G., <https://orcid.org/0000-0002-4556-135X>;

Kazakov A.A., <https://orcid.org/0000-0002-5559-6003>;

Demkin V.V., <https://orcid.org/0000-0002-3408-6100>;

Zatevalov A.M., <https://orcid.org/0000-0002-1460-4361>;

Mironov A. Yu., <https://orcid.org/0000-0002-8544-5230>.

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

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

Received 17.08.2022

Accepted 27.09.2022

Published 14.11.2022

**Введение.** Вирусы герпеса человека (ВГЧ), образующие достаточно многочисленное семейство и вызывающие различные заболевания, после первичного инфицирования могут персистировать в латентной форме и реактивироваться при снижении иммунитета или вследствие других причин. Изученность их встречаемости в популяции, возможных взаимосвязей в ходе инфицирования и персистенции, факторов риска и взаимораспределения в органах и тканях инфицированных пациентов остается недостаточной [1].

Герпесвирусы человека 7 типа (ВГЧ-7) относятся к семейству *Herpesviridae*, подсемейству *Betaherpesvirinae*, роду *Roseolovirus* [1;3]. Среди герпесвирусов человека ВГЧ-7 наиболее близок к вирусу герпеса человека 6 типа (ВГЧ-6), который также относится к розеоловирусам, то есть вирусам, вызывающим розеола у детей [1].

Геномные структуры (колинеарность) ВГЧ-7 и ВГЧ-6 схожи, но гомология между геномами незначительная, и геном ВГЧ-7 приблизительно на 10% короче. Вирусы обладают антигенным родством, что приводит к кросс-реактивности в серологических реакциях [4]. В отличие от ВГЧ-6, у которого выявляют 2 генетических варианта А и В, внутривидовая вариабельность ВГЧ-7 менее выражена, генетические варианты у ВГЧ-7 в настоящее время не выделяют.

ВГЧ 6 и 7-го типа дети заражаются в младенческом возрасте или в раннем детстве, после чего вирусы персистируют в организме пожизненно [5]. Первичная инфекция сопровождается неспецифическим лихорадочным заболеванием или проявляется как синдром розеола [6]. После первичной инфекции ВГЧ-6 вирус остается персистирующим или латентным с множественной локализацией в мононуклеарных клетках периферической крови, в слюнных железах, центральной нервной системе. У иммунокомпрометированных лиц реактивация ВГЧ-6 сопровождается лихорадкой, энцефалитом, сыпью, отторжением трансплантированных органов [7, 8].

ВГЧ 7 типа – лимфотропный вирус, генетически тесно связанный с ВГЧ-6 [9]. ВГЧ-7 вызывает розеола у детей реже, чем ВГЧ-6. Заражение ВГЧ-7 происходит позднее, но клиническая картина неотличима от заражения ВГЧ-6. Заражение ВГЧ-6 и ВГЧ-7 могут вести к тяжёлым неврологическим осложнениям, включая энцефалит и синдром Гийена-Барре [10].

ВГЧ-7 обладает избирательным тропизмом только к CD<sup>+</sup> Т-лимфоцитам. ВГЧ-7 выявляют в лимфоидной ткани, слюнных железах, миндалинах, печени, почках, лёгких, кожных покровах. После проникновения ВГЧ-7 в организм через кровь или дыхательные пути, о механизмах развития заболевания имеется мало сведений. Предполагается, что очагами латентной инфекции ВГЧ-7 являются CD<sub>4</sub><sup>+</sup> Т-лимфоциты [9].

Наибольшую опасность ВГЧ-7, как и другие розеоловирусы, представляет его реактивация, которая может вызвать серьёзные заболевания у иммунокомпрометированных лиц. К этой категории лиц относятся реципиенты трансплантатов гемопоэтических стволовых клеток, реципиенты паренхиматозных органов, а также пациенты с синдромом приобретенного иммунодефицита (СПИД) [10, 11].

Вышеперечисленное диктует необходимость разработки диагностических методов (систем) для индикации и идентификации розеоловирусов в клиническом материале.

Цель исследования – разработка тест-системы для выявления ВГЧ 7 типа методом ПЦР.

**Материал и методы.** Сравнительный анализ и выравнивание нуклеотидных последовательностей проведён с использованием сетевого сервиса Nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), выбор участков, пригодных для подбора амплификационных мишеней проведён с использованием авторской программы [12], анализ специфичности праймирования *in silico* проведён с использованием сетевого сервиса PRIMER BLAST ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK\\_LOC=BlastHome](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)).

Выделение ДНК из клинического материала проводили с использованием наборов Рибопреп (Интерлабсервис, Россия). ДНК элюировали в 100 мкл 0,1 М Трис-ЭДТА буфер (рН 8,3). В ПЦР брали 5 мкл. Амплификацию проводили в 30 мкл раствора, содержащего 50 мМ Трис-НСl рН – 8,3, 22 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,05% Tween 20, 100 мкМ dNTP, 2,5 ЕД Таq-ДНК полимеразы. Режим амплификации: 40 циклов 95° 10 с, 60° 20 с, 72° 10 секунд. Праймеры и искусственную матрицу синтезировали в ЗАО «Евроген» (Москва, Россия), зонды в ООО «ДНК-синтез» (Москва, Россия). В качестве положительного контроля использована синтетическая одонитевая ДНК, воспроизводящая последовательность ампликона. ПЦР проводили на приборе CFX-96 (Bio-Rad, США).

Для получения аналитических характеристик готовили линейку десятикратных разведений искусственной матрицы в диапазоне концентраций 10<sup>8</sup> – 10 ГЭ/мкл. В буфер для разведения добавляли препараты ДНК, выделенной из крови человека, для максимального приближения к условиям клинических исследований.

**Результаты.** В данной работе исследовали присутствие вирусов герпеса человека ВГЧ-6 и ВГЧ-7, которые, также как и цитомегаловирус, ВГЧ-5, относятся к бета-герпесвирусам, а также вируса Эпштейн-Барра (ВЭБ, семейство гамма-герпесвирусов) в клинических образцах. Для этих целей определяли наличие специфической вирусной ДНК в предоставленных пробах слюны и сыворотки пациентов при помощи ПЦР в режиме реального времени.

В первом эксперименте 10 образцов слюны, ПЦР-положительных на ДНК ВГЧ-6, были дополнительно проанализированы при помощи качественной ПЦР в реальном времени для определения ВГЧ-7. В 4-х из десяти случаев (40,0%) при тестировании была обнаружена ДНК ВГЧ-7, что свидетельствует о возможной персистенции у значительной части пациентов обоих вирусов.

Во втором эксперименте было использовано 20 образцов слюны и 10 образцов сыворотки, положительных в исследовании на ВГЧ-6. 15 из 20 (75%) образцов слюны и только один из 10 образцов (10%) сыворотки показали присутствие ВГЧ-7, позволяя предположить схожий профиль выявляемости данных вирусов в слюне пациентов и существование возможных различий по их обнаружению в крови при клиническом проявлении инфекции.

В третьей подборке были собраны 10 проб слюны, положительных на ВЭБ, которые также были проверены в исследовании на ВГЧ7 и показали присутствие только 1-й (10%) положительной пробы, предполагая достаточно редкую персистенцию ВГЧ-7 и ВЭБ в противоположность ВГЧ-6.

**Подбор последовательностей праймеров.** Праймеры подбирали на основании анализа полногеномных последовательностей ВГЧ-7, имеющихся в базе нуклеотидных последовательностей GenBank на 14.01. 2022 г. В качестве референс последовательности выбрана последовательность ВГЧ-7 AF037218.1. В аннотации к данной последовательности указано, что фрагмент с координатами 1..10034 представлен в геноме как повторяющаяся последовательность. После выравнивания этого фрагмента с использованием BLAST выяснилось, что копии данного фрагмента не у всех ВГЧ-7 представлены полноценно. В частности, в последовательности U43400.1 одна из копий встречалась в усечённом виде – недоставало 4-х тыс. нуклеотидов. Исходя из этого, для дальнейшего анализа выбран фрагмент с координатами 3990-9720, который присутствовал во всех 3-х имеющихся в базе данных полногеномных последовательностях ВГЧ-7. В результате последующего анализа внутривидовой вариабельности и температурных профилей плавления фрагмента 3990-9720 при использовании собственной оригинальной программы выбрано 2 участка, которые положены в основу разработки 2-х альтернативных систем праймеров: HV7IT+HV7JBr и HV7NA+HV7NIr.

**Оценка специфичности работы праймеров.** Результаты *in silico* анализа специфичности подобранных праймеров представлены в табл. 1.

Праймеры обладают 100% гомологией и с последовательностями ВГЧ-7, при отсутствии какой-либо гомологии с другими вирусами и организмами.

Поскольку разрабатываемая тест-система предназначена для клинической лабораторной диагностики образцов, полученных от человека, содержащих большое количество ДНК хозяина, то остается риск формирования неспецифических продуктов. Для оценки этого риска проведена эмпирическая оценка специфичности работы праймеров на отрицательных образцах ДНК человека. С каждой парой праймеров проведён анализ 4-х образцов ДНК человека, с доказанным отсутствием ВГЧ-7. Результаты постановки ПЦР представлены на рис. 1, а, б.

На отрицательных образцах, т. е. в отсутствии специфической матрицы, при наличии высокой концентрации ДНК человека возможно образование неспецифических продуктов на поздних циклах амплификации. При этом для системы праймеров HV7IT+HV7JBr пересечение порога амплификации *Ct* происходит на более поздних циклах (29-31), а для системы HV7NA+HV7NIr — на более ранних (26-30). Наименьший уровень неспецифичности показала система HV7IT+HV7JBr, для которой разработан Taqman-зонд. Работа системы с зондом на линейке разведений положительной матрицы продемонстрирована на рис.2.

Значения *Ct*, полученные на разных разведениях матрицы и аналитические характеристики системы, рассчитанные на этом основании, приведены в табл. 2 и 3.

Разработанная тест-система использована для изучения распространения ВГЧ-7 в слюне пациентов, положительных на ВГЧ-6 или вирус Эпштейн-Барра (ВЭБ). Проанализировано 30 образцов слюны, ПЦР-положительных на ДНК ВГЧ-6. В 19 из 30 образцов слюны (63,3%) при тестировании обнаружена ДНК ВГЧ-7, что свидетельствует о совместной персистенции обоих вирусов у значительной части пациентов.

В другой независимой подборке, состоящей из 10 проб слюны, положительных на ВЭБ, исследование на ВГЧ-7 выявило только 1 (10%) положительную пробу,

Таблица 1

Специфичность праймеров в «Primer Blast»

Номер последовательности	Организм	Длина продукта	HV7IT	HV7JBr
KF558370.1	Human herpesvirus-7	92	.....	.....
KF558370.1	Human herpesvirus-7	92	.....	.....
AF037218.1	Human herpesvirus-7	92	.....	.....
AF037218.1	Human herpesvirus-7	92	.....	.....
U43400.1	Human herpesvirus-7	92	.....	.....
U43400.1	Human herpesvirus-7	92	.....	.....
KF558370.1	Human herpesvirus-7	98	.....	.....
KF558370.1	Human herpesvirus-7	98	.....	.....
AF037218.1	Human herpesvirus-7	98	.....	.....
AF037218.1	Human herpesvirus-7	98	.....	.....
U43400.1	Human herpesvirus-7	98	.....	.....
U43400.1	Human herpesvirus-7	98	.....	.....

Примечание. Точками обозначены гомологичные позиции.

Таблица 2

**Значения Ct на разных разведениях матрицы**

Разведение матрицы	Концентрация матрицы копий/мкл	Повторность				Ct средняя
		1	2	3	4	
-12	60	35,66	-	35,42	-	35,5
-11	600	32,87	-	33,03	33,27	33,1
-10	6000	29,72	29,83	29,33	29,5	29,6
-9	60000	26,22	26,48	26,14	26,43	26,3
-8	600000	23,19	23,16	23,01	23,04	23,1

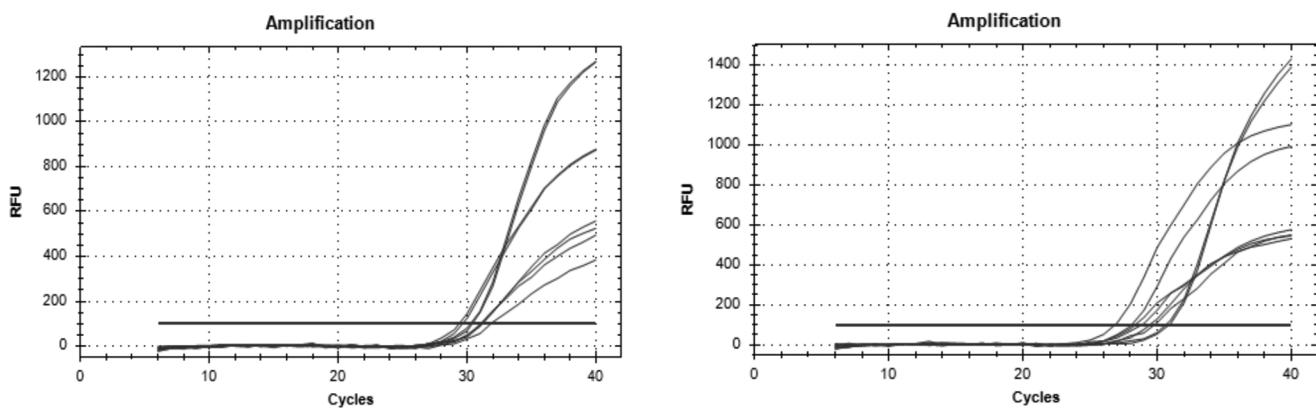
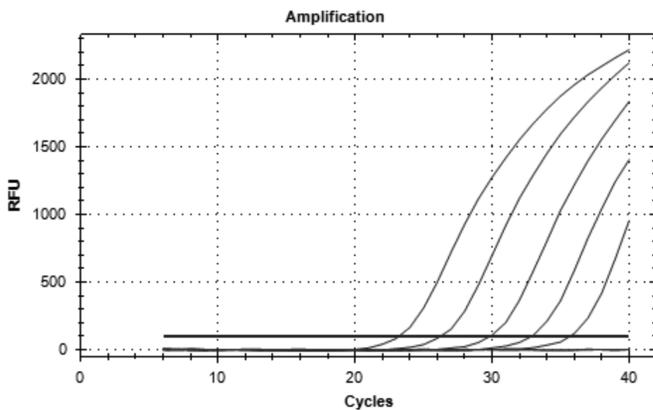


Рис. 1. Кривые амплификации, полученные с использованием систем праймеров. а – HV7IT+HV7JBr; б – HV7NA+HV7NIr.

Таблица 3

**Аналитические характеристики тест-системы HV7IT+HV7JBr+pbHV7IY**



Показатель	Значение
E (%)	103,6
M (Ct)	-3,158
R	0,99
R <sup>2</sup>	0,998
LOD (Копий/реакцию)	60

Примечание. E – эффективность ПЦР, M – среднее количество циклов необходимое для увеличения количества ПЦР продукта на порядок, R – коэффициент корреляции, R<sup>2</sup> – коэффициент детерминации, LOD (*limit of detection*) – предел чувствительности [15].

Рис. 2. Работа системы HV7IT+HV7JBr+pbHV7IY на положительной матрице. Линейка разведений 10<sup>-8</sup>-10<sup>-12</sup>.

Таблица 4

**Сравнение выявляемости ВГЧ-7 и ВГЧ-6 с результатами, полученными для клинических образцов**

№	Образцы слюны положительные ВГЧ7/ВГЧ6	Образцы сыворотки положительные ВГЧ7/ВГЧ6	Образцы слюны положительные ВГЧ7/ВЭБ
1	4/10 – 40%		
2	15/20 – 75%	1/10 – 10%	
3			1/10 – 10%

что предполагает достаточно редкую совместную персистенцию ВГЧ-7 и ВЭБ в противоположность ВГЧ-6.

Шесть положительных проб слюны в тестах с разработанной тест-системой на ВГЧ-7, повторно исследованы методом ПЦР в реальном времени на наличие вирусной ДНК с использованием альтернативной тест-системы на выявление ВГЧ 6 и 7 типов, производства ООО «Нанодиагностика». Подтверждено наличие ДНК ВГЧ 6 и 7 типов.

На основании полученных данных можно предположить, что ВГЧ6 и ВГЧ-7, относящиеся к одной и той же бета-группе герпесвирусов, могут иметь сходную картину распределения в слюне инфицированных пациентов. Сравнение выявляемости ВГЧ-7 и ВГЧ-6 с результатами, полученными для образцов, содержащих ДНК ВЭБ, указывает на меньшую вероятность такой корреляции (табл. 4).

Полученные результаты могут свидетельствовать о необходимости более детального исследования распределения ВГЧ-6 и ВГЧ-7 в пробах пациентов, предполагающих присутствие герпесвирусной инфекции. Клинические проявления при возможной реактивации данных герпесвирусов также требуют дополнительного изучения.

**Заключение.** Разработана отечественная ПЦР тест-система, которая позволяет эффективно детектировать ДНК ВГЧ-7 в клинических образцах.

ЛИТЕРАТУРА ( пп. 2, 4-10, 12, 13  
см. REFERENCES )

1. Марданлы С.С., Марданлы С.Г. Вирус герпеса седьмого типа. Обзор литературы. Орехово-Зуево: Государственный гуманитарно-технологический университет; 2021.
3. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: Учебник для студентов медицинских вузов. Воробьев А.А., Быков А.С., Бойченко М.Н., ред. 3-е изд., исправленное. М.: Медицинское информационное агентство; 2022. ISBN 978-5-9986-0478-2.
11. Контаров Н.А., Круглов И.В., Маркушин С.Г., Погарская И.В., Ртищев А.А., Юминова Н.В. и др. Актуальные проблемы современной вирусологии. Коллективная монография. Орехово-Зуево: Государственный гуманитарно-технологический университет; 2021.
13. Демкин В.В. Использование табличного редактора Excel для анализа выровненных нуклеотидных последовательностей. *Молекулярная генетика, микробиология, вирусология*. 2010; 3: 40-1.

REFERENCES

1. Mardany S.S., Mardany S.G. Herpes virus type seven. literature review. Orekhovo-Zuevo: Gosudarstvennyi gumanitarnotekhnologicheskii universitet; 2021. (in Russian)
2. Salahuddin S.Z., Ablashi D.V., Markham P.D., Josephs S.F., Sturzenegger S., Kaplan M. et al. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science*. 1986; 234(4776):596-601.
3. Medical Microbiology, Virology and Immunology: Textbook for Students of Medical Universities [Meditsinskaya mikrobiologiya, virusologiya i immunologiya]. Vorob'yov A.A., Bykov A.S., Boychenko M.N., eds. 3<sup>rd</sup> ed. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo; 2022. ISBN 978-5-9986-0478-2. (in Russian)
4. Caserta M.T. 207 – Human Herpesviruses 6 and 7 (Roseola, Exanthem Subitum). Sarah S. Long, Charles G. Prober, Marc Fischer, eds. Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases. 4<sup>th</sup> ed. Elsevier. 2018; 1081-8e4. DOI: 10.1016/B978-0-323-40181-4.00207-3.
5. Hall C.B., Long C.E., Schnabel K.C., Caserta M.T., McIntyre K.M., Costanzo M.A. et al. Human herpesvirus-6 infection in children. A prospective study of complications and reactivation. *N. Eng. J. Med.* 1994; 331: 432-8.
6. Braun D.K., Dominguez G., Pellett P.E. Human herpesvirus 6. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997; 10: 521-67.
7. Caserta M.T., Mock D.J., Dewhurst S. Human herpesvirus 6. *Clin. Infect. Dis.* 2001; 33: 829-33.
8. Yoshikawa T., Asano Y., Ihira M., Suzuki K., Ohashi M., Suga S. et al. Human herpesvirus 6 viremia in bone marrow transplant recipients: clinical features and risk factors. *J. Infect. Dis.* 2002; 185: 847-53.
9. Frenkel N., Schirmer E.C., Wyatt L.S., Katsafanas G., Roffman E., Danovich R.M., June C.H. Isolation of a new herpesvirus from human CD4+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 1990; 87(2):748-52.
10. Schwartz K.L., Richardson S.E., Ward K.N., Donaldson C., MacGregor D., Banwell B. et al. Delayed primary HHV-7 infection and neurologic disease. *Pediatrics*. 2014; 133(6):e1541-7.
11. Kontarov N.A., Kруглов I.V., Markushin S.G., Pogarskaya I.V., Rtishchev A.A., Yuminova N.V. et al. Current problems of modern virology. Orekhovo-Zuevo: Gosudarstvennyi gumanitarnotekhnologicheskii universitet; 2021. (in Russian)
12. Demkin V.V. Using the Excel Spreadsheet Editor to Analyze Aligned Nucleotide Sequences. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya, virusologiya*. 2010; (3):40. (in Russian)
13. Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 2009 Apr; 55(4): 611-22. DOI: 10.1373/clinchem.2008.112797.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Безродный С.Л.<sup>1,3</sup>, Жигалева О.Н.<sup>1</sup>, Марданлы С.Г.<sup>1,4</sup>, Помазанов В.В.<sup>2</sup>, Гашенко Т.Ю.<sup>1</sup>

## РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО ВЫЯВЛЕНИЯ РНК ВИРУСА SARS-COV-2 В НАЗО- И ОРОФАРИНГЕАЛЬНЫХ МАЗКАХ МЕТОДОМ ОТ-ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

<sup>1</sup>ЗАО Эколаб, 142530, Московская область, Электрогорск;

<sup>2</sup>ГОУ ВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет», 142611, Московская область, | г. Орехово-Зуево;

<sup>3</sup>ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора, 125212, Москва;

<sup>4</sup>ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И. М. Сеченова» Минздрава РФ, 119991, Москва, Россия;

*Коронавирусная инфекция продолжает распространяться по всему миру. В связи с этим целью данной работы - разработать набор реагентов для качественного выявления РНК вируса SARS-CoV-2. Набор разработан в ЗАО «ЭКОлаб». Для разработки набора были использованы 20 положительных образцов. Метод исследования состоял из нескольких этапов: выделение РНК SARS-CoV-2, реакции обратной транскрипции РНК и ПЦР-амплификации кДНК с одновременной детекцией результата в режиме «реального времени». Основные характеристики набора: аналитическая чувствительность – 100%, специфичность – 100%, точность – 100%. Таким образом, разработанная нами методика диагностики новой коронавирусной инфекции на основе ОТ-ПЦР в режиме реального времени позволяет качественно и быстро выявлять РНК бетакоронавируса в клиническом материале больных и здоровых лиц с подозрением на коронавирусную инфекцию и другими симптомами ОРВИ.*

**Ключевые слова:** COVID-19; пандемия, ПЦР-анализ; ОТ-ПЦР в режиме реального времени, диагностика инфекций.

**Для цитирования:** Безродный С.Л. Жигалева О.Н. Марданлы С.Г. Помазанов В.В. Гашенко Т.Ю. Разработка набора реагентов для качественного выявления РНК вируса SARS-CoV-2 в назо- и орофарингеальных мазках методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (11): 663-667. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-11-663-667>

**Для корреспонденции:** Безродный Святослав Леонидович; e-mail: [frebiotik@mail.ru](mailto:frebiotik@mail.ru)

**Финансирование.** Исследование финансировалось ЗАО «ЭКОлаб».

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

Поступила 15.08.2022

Принята к печати 15.09.2022

Опубликовано 14.11.2022

*Bezrodny S.L.<sup>1,3</sup>, Zhigaleva O.N.<sup>1</sup>, Mardanly S.G.<sup>1,4</sup>, Pomazanov V.V.<sup>2</sup>, Gashenko T.Yu.<sup>1</sup>*

DEVELOPMENT OF A REAGENT KIT FOR QUALITATIVE DETECTION OF SARS-COV-2 VIRUS RNA IN NASO AND OROPHARYNGEAL SMABS BY REAL-TIME RT-PCR

<sup>1</sup>CJSC «EKOLab», 142530, Elektrogorsk, Russia;

<sup>2</sup>The «State Humanitarian and Technological University», 142611, Moscow region, Orekhovo-Zuevo, Russia;

<sup>3</sup>G. N. Gabriчевskii Moscow research institute of epidemiology and microbiology of Rospotrebnadzor, 125212, Moscow, Russia;

<sup>4</sup>FGAOU VO «First MG MU named after I. M. Sechenov» Ministry of Health of Russia, 119991, Moscow, Russia

*The coronavirus infection continues to spread around the world. In this regard, the purpose of this work was: to develop a set of reagents for the qualitative detection of SARS-CoV-2 virus RNA. The set was developed by CJSC «Ecolab», 20 positive samples were used to develop the kit. The research method consisted of several stages: isolation of SARS-CoV-2 RNA, RNA reverse transcription reaction and PCR amplification of cDNA with simultaneous detection of the result in real time. The main characteristics of the kit: analytical sensitivity - 100%, specificity - 100%, accuracy - 100%. Thus, our method for diagnosing a new coronavirus infection based on real-time RT-PCR makes it possible to qualitatively and quickly detect betacoronavirus RNA in clinical material from patients and healthy individuals with suspected coronavirus infection and other symptoms of SARS. Keywords: COVID-19; pandemic, PCR analysis; Real-time RT-PCR, diagnosis of infections.*

**For citation:** Bezrodny S.L. Zhigaleva O.N. Mardanly S.G. Pomazanov V.V. Gashenko T.Yu. Development of a reagent kit for the qualitative detection of SARS-CoV-2 virus RNA in naso- and oropharyngeal swabs by real-time RT-PCR. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (11): 663-667 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-11-663-667>

**For correspondence:** Bezrodny Svyatoslav Leonidovich; e-mail: [frebiotik@mail.ru](mailto:frebiotik@mail.ru)

### Information about authors:

Bezrodny S.L., <https://orcid.org/0000-0001-5869-2503>;

Zhigaleva O.N., <https://orcid.org/0000-0002-5003-1089>;

Mardanly S.G., <https://orcid.org/0000-0002-4556-135X>;

Pomazanov V.V., <https://orcid.org/0000-0002-7336-9912>;

Gashenko T. Yu., <https://orcid.org/0000-0001-6768-2251>.

**Acknowledgment.** *The study was funded by CJSC «EKOlab».*

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

Received 15.08.2022

Accepted 15.09.2022

Published 14.11.2022

**Введение.** В 2019 г. мир охватила пандемия новой инфекции, вызванная РНК-содержащим вирусом из семейства *Coronaviridae* [1, 2]. Бетакоронавирус ( $\beta$ -CoV) является возбудителем тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 [2]. Предполагается, что коронавирус произошел от летучих мышей [3], однако есть данные указывающие на то, что коронавирус  $\beta$ -CoV был создан искусственным путем в лаборатории Уханьского института вирусологии (WIV) под руководством Ши Дженли и Ральфа С. Барика еще в 2015 году [4]. Геном бета-коронавирусов представлен одноцепочечной (+) РНК с 26-32 тысячами пар нуклеотидов. Общая структура генома  $\beta$ -CoV аналогична структуре генома других коронавирусов и включает в себя полибелок репликазы ORF1ab, а так же гены, кодирующие белки - S, M, E и N [5, 6]. Возникновение COVID-19 впервые произошло в Китае, в г. Ухань, инфекция быстро распространилась по всему миру [7]. По оценкам ВОЗ на сегодняшний день общее количество смертей от новой коронавирусной инфекции равно 6,4 миллион [8]. По данным Роспотребнадзора в Российской Федерации общее число смертей от коронавирусной инфекции составляет 380 076 человек [9].

Спектр клинических признаков COVID-19, варьируется от бессимптомного течения заболевания до тяжелой дыхательной недостаточности и полиорганной дисфункции [10]. Наиболее распространенными симптомами, связанными с COVID-19, являются лихорадка, сухой кашель, одышка, образование мокроты, миалгия, повышенная утомляемость [11]. Бессимптомное течение инфекции может возникать из-за ослабления иммунных реакций и субклинических проявлений, а также из-за латентной стадии, когда вирус выживает возможность для проникновения в клетку и размножения [12].

Одним из новейших методов диагностики новой коронавирусной инфекции является метод обнаружения SARS-CoV-2 без амплификации с помощью технологии CRISPR-Cas13a микроскопии с использованием камеры мобильного телефона, однако золотым стандартом диагностики инфекции SARS-CoV-2 является полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) [13]. ОТ-ПЦР - метод амплификации специфического фрагмента рибонуклеиновой кислоты (РНК), в основе которого лежит использование праймеров, направленных на гены нуклеокапсида (N), оболочки (E) и открытой рамки считывания *lab* - *ORF1ab* [13, 14]. Терапия новой коронавирусной инфекции включает как стандартные методы лечения с применением детоксикационной и антиоксидантной терапии [15], так и применение новых препаратов, воздействующих на процесс прикрепления к клеточной мембране проникновения и эндоцитоза вируса [16, 17].

Цель исследования: разработать набор реагентов для качественного выявления РНК вируса SARS-CoV-2.

**Материал и методы.** Для разработки метода были получены положительные образцы из медицинского центра E1 Clinic ЗАО «ЭКОлаб», г. Электрогорск. Взятие, транспортирование и хранение материала для исследования осуществлялось в соответствии с МР 3.1.0169-20 Лабораторная диагностика COVID-19.

Внутренний контрольный образец (ВКО) в данном наборе представляет собой ген РНКазы Р человека. Детекция ВКО в ходе реакции амплификации свидетельствует о наличии в исследуемом образце клинического материала (эпителиальных клеток из верхних дыхательных путей).

Положительный контрольный образец (ПКО) содержит плазмидную ДНК (*pUC19*) вируса SARS-CoV-2 (ЗАО «ЭКОлаб» кат.№120-03) в 0,1 М трис буфере (CAS номер: 77-86-1) с азидом натрия (CAS номер: 26628-22-8) - 0,1%.

При подготовке были использованы следующие реактивы и материалы: пластиковые флаконы объемом 2,0 мл фирмы «Sarstedt» (Германия), кат. № 72.609; хлорид натрия, CAS номер: 7647-14-5; гуанидин тиоционат, CAS номер: 593-84-0; CAS номер: 26628-22-8; азид натрия, CAS номер: 26628-22-8; ацетон, CAS номер: 67-64-10; ЭДТА, CAS номер: 60-00-4; олигонуклеотид модифицированный, ЗАО «ЭКОлаб» кат. №120-01; Taq ДНК-полимераза, ЗАО «ЭКОлаб» кат. №120-02; плазмидная ДНК, ЗАО «ЭКОлаб» кат. №120-03; планшет для ПЦР, фирма «Sovtech», Россия, кат. № PCR-P-96-08W; пленка для ПЦР-планшета, фирма «Sovtech» (Россия), кат. № P-500. Амплификацию, детекцию и обработку результатов проводили с помощью амплификатора Bio-Rad CFX 96, ФСЗ 2008/03399, производитель ООО «Био-Рад Лаборатории» (США).

Оценка аналитической надёжности с определением специфичности и чувствительности проведена согласно ГОСТ Р 53079.1-2008 и ГОСТ Р 53022.2-2008. Для проверки аналитической специфичности использована РНК штаммов различных вирусов с концентрацией матрицы не ниже  $10^3$  ГЭ/мл.

**Результаты и обсуждение.** Разработан набор реагентов «КовидЭк» для выявления РНК вируса SARS-CoV-2 в клиническом материале методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Условия проведения ПЦР подобраны экспериментально.

Метод исследования состоит из нескольких этапов: выделение РНК SARS-CoV-2, реакции обратной транскрипции РНК и ПЦР-амплификации кДНК с одновременной детекцией результата в режиме «реального времени».

На первом этапе проведена очистка суммарной РНК/ДНК с использованием реагентов для выделения РНК, основанная на связывании нуклеиновых кислот с магнитным сорбентом в присутствии хаотропных солей и их последующей элюцией в низкосолевого буфера. Метод исследования основан на реакции обратной транскрипции РНК и ПЦР-амплификации к-ДНК с одновременной

детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени. РНК SARS-CoV-2 подвергается обратной транскрипции с помощью ревертазы. Участки полученной кДНК амплифицировали при помощи специфических к данным участкам праймеров и фермента Taq-полимеразы. В состав реакционной смеси включены флуоресцентно-меченные олигонуклеотиды (ДНК-зонды). Данные ДНК-зонды, содержащие флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции, гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой к ДНК-мишени. При образовании специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, воздействие гасителя на флуоресцентную метку прекращается. В результате происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Количество разрушенных зондов увеличивается пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов.

Нарастающий уровень флуоресценции измеряется на каждом цикле амплификации. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени». В состав набора реагентов входит положительный контрольный образец (ПКО), представляющий собой MS2 фагоподобные частицы, содержащие фрагмент генома коронавируса SARS-CoV-2.

В качестве мишеней выбраны следующие инсерционные последовательности SARS-CoV-2: фрагменты ORF и N (табл. 1).

Молекулярная структура праймеров проверена с учётом общих требований при использовании алгоритма BLAST на основании анализа нуклеотидных последовательностей референсных штаммов, опубликованных в GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Реакционную смесь (мастер-микс) готовили путем смешивания в эппендорфе следующих реактивов по формуле:

$$5*(N+1) \text{ мкл ОТ-ПЦР-реагента} + 15*(N+1) \text{ мкл праймеров,}$$

где: N – общее количество реакций амплификации с учетом контрольных образцов.

Далее перемешивали полученный «Мастер Микс» путем 5-ти кратного переворачивания пробирки, осажи-

дали кратковременным центрифугированием и вносили по 20 мкл в микропробирки для проведения ПЦР.

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения) набора реагентов определялась с использованием контрольной панели «Анти-SARS-CoV-2-ПЦР-120», положительные образцы которой (№ 1-№ 6) содержат искусственную РНК вируса SARS-CoV-2 в разных концентрациях аналита (от 500 ГЭ/мл и выше). Положительные образцы по каналу «HEX» должны иметь значения Ct меньше или равно 33, по каналу «FAM» – значения Ct не анализируются (могут быть любые или отсутствовать). Чувствительность определялась по стандартной панели образцов «Анти-SARS-CoV-2-ПЦР-120», содержащих искусственно синтезированную РНК SARS-CoV-2, как процентное содержание образцов, определенных набором как положительные, и составляет 100%.

Специфичность определялась по стандартной панели образцов «Анти-SARS-CoV-2-ПЦР-120», не содержащих искусственно синтезированную РНК SARS-CoV-2, как процентное содержание образцов, определенных набором как отрицательные, и составляет 100%.

Для контроля повторяемости использовали образец КОЧ ПКО разведенный до концентрации  $1,0 \times 10^3$  копий/мл (5 образцов). Процедура проводилась одним оператором на одном наборе. Коэффициент вариации для повторяемости рассчитывался по формуле:  $CVp (\%) = Ct (\text{станд.отклон.}) / Ct (\text{ср.знач.}) \times 100 \%$  для 5 проб КОЧ ПКО и не превышает 3 %.

Для контроля воспроизводимости использовали образец КОЧ ПКО, разведенный до концентрации  $1,0 \times 10^3$  копий/мл (10 образцов). Процедура проводилась двумя разными операторами с двумя разными наборами одной серии в разные дни. Коэффициент вариации для воспроизводимости рассчитывается по формуле:  $CVp (\%) = Ct (\text{станд.отклон.}) / Ct (\text{ср.знач.}) \times 100 \%$  для 10 проб КОЧ ПКО и не превышает 6 %.

Интерпретация результатов ПЦР приведена в табл. 2.

Разработанным набором реагентов проведены исследования клинических образцов от 20 пациентов с симптомами ОРВИ и подтвержденным диагнозом COVID-19.

Результаты детекции вирусной РНК и РНКазы Р представлены на рисунке и в табл. 3.

Таблица 1

Используемые праймеры – фрагменты ORFa1b и N

Мишень	Ген	Нуклеотидная последовательность	Ориентация праймера
SARS-CoV-2	ORFa1b	5' TTCTGCGCCTCCCAAGCTGA 3'	Прямой
		5' CCTAATTGAGGTTGAACCT 3'	Обратный
		5' GTTGTCAGGCAGTGC GGCCAATC 3'	Флуоресцентный зонд
	N	5' CAATGCCCCAATCGTCTAC 3'	Прямой
		5' CCTCATCACCGAAAGTCGCAAC 3'	Обратный
		5' CCAAAACGGGCAACGCAGAGGGGAGC 3'	Флуоресцентный зонд
Homo sapiens	PHKазы P	5' GGATCCATCTCACTGCAATG 3'	Прямой
		5' CCTGCTATCAAAGACTCCACA 3'	Обратный
		5' CCTCTATTAATGTGGCGATTGACCGA 3'	Флуоресцентный зонд

Таблица 2

**Интерпретация результатов образцов**

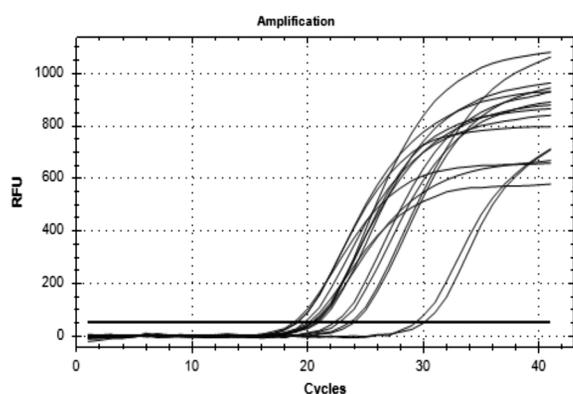
Результат образца	Значение «Сt» по каналу FAM/Green	Значение «Сt» по каналу HEX/Yellow
Положительный	+/-	≤ 33
Сомнительный	+/-	33–35
Отрицательный	+	> 35 или отсутствует
Не валидный	-	-

Таблица 3

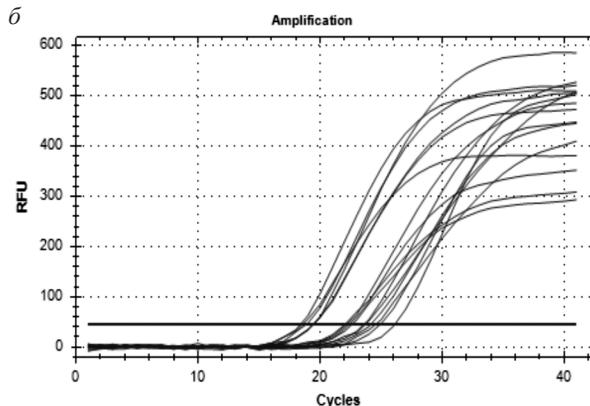
**Данные выявления коронавируса с внутренним контролем из клинических образцов**

Номер образца	Значение Ct		Интерпретация результата
	в канале FAM	в канале HEX	
ПМ1	34,11	21,59	Положительный
ПМ2	33,25	17,11	Положительный
ПМ3	25,90	26,81	Положительный
ПМ4	30,36	22,70	Положительный
ПМ5	26,92	18,41	Положительный
ПМ6	35,12	22,74	Положительный
ПМ7	28,10	25,15	Положительный
ПМ8	26,36	20,60	Положительный
ПМ9	34,75	25,52	Положительный
ПМ10	29,23	27,36	Положительный
ПМ11	28,41	27,74	Положительный
ПМ12	26,25	20,56	Положительный
ПМ13	32,80	24,73	Положительный
ПМ14	34,63	26,80	Положительный
ПМ15	30,15	22,75	Положительный
ПМ16	27,71	18,41	Положительный
ПМ17	35,16	19,61	Положительный
ПМ18	28,20	25,75	Положительный
ПМ19	26,24	20,70	Положительный
ПМ20	34,81	25,26	Положительный

*a*



*б*



Детекция нуклеиновых кислот.

*a* – выявление РНК коронавируса, *б* – выявление РНК РНКазы *P.*

Как видно из рисунка и табл. 3, разработанный нами набор реагентов выявляет коронавирус SARS-CoV-2 из клинических образцов, и может занять свое место в клинической лабораторной диагностике нового коронавируса.

**Заключение.** Разработанная методика диагностики новой коронавирусной инфекции на основе ОТ-ПЦР в режиме реального времени позволяет качественно и быстро выявлять РНК бета-коронавируса в клиническом материале больных и здоровых лиц с подозрением на вирусную инфекцию и другими симптомами ОРВИ.

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 3-14, см. REFERENCES)

- Лахтин В.М., Лахтин М.В., Комбарова С.Ю., Давыдкин В.Ю., Мелихова А.В., Давыдкин И.Ю., Миронов А.Ю., Алешкин В.А. Ковид как мультицелевая инфекция: превентивные стратегии управления. Эпидемиологический надзор за актуальными инфекциями: новые угрозы и вызовы: Сборник научных трудов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, 26–27 апреля 2021 г. Зайцева Н.Н., ред. Нижний Новгород: Медиаль; 2021; 1: 55-7.
- Хавкина Д.А., Руженцова Т.А., Чухляев П.В., Гарбузов А.А., Пушакова Е.К. и др. Роль дезинтоксикационной и антиоксидантной терапии в лечении COVID-19: теория и практика. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы.* 2020; 10 (2): 62-9.
- Руженцова Т.А., Чухляев П.В., Хавкина Д.А., Гарбузов А.А., Плоскирева А.А., Осешнюк Р.А., Солюянова Т.Н., Шестакова И.В. и др. Возможности этиотропной терапии коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2, у амбулаторных пациентов. *Медицинский оппонент.* 2020; 1 (9): 48-58.
- Руженцова Т.А., Чухляев П.В., Хавкина Д.А., Гарбузов А.А., Плоскирева А.А., Осешнюк Р.А. и др. Эффективность и безопасность применения фавипиравира в комплексной терапии COVID-19 легкого и среднетяжелого течения. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение.* 2020; 4 (35): 26-38.

#### REFERENCES

- Chen Y., Liu Q., Guo D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J. Med. Virol.* 2020; 92: 418–23. DOI: 10.1002/jmv.25681.
- Lakhtin V.M., Lakhtin M.V., Kombarova S.Yu., Davydkin V.Yu., Melikhova A.V., Davydkin I.Yu., Mironov A.Yu., Aleshkin V.A. COVID as a multi-target infection: preventive management strategies. *Epidemiological Surveillance of Actual Infections: New Threats and Challenges: Collection of Scientific Papers of the All-Russian Scientific and Practical Conference with International Participation Dedicated to the 100<sup>th</sup> Anniversary of Academician*

- I.N. Blokhina, Nizhny Novgorod, April 26–27, 2021. Zaitseva N.N., ed. Nizhny Novgorod: Medial; 2021; 55-7. (in Russian)
- Lau S.K., Poon R.W., Wong B.H., Wang M., Huang Y., Xu H. et al. Coexistence of different genotypes in the same bat and serological characterization of Roussetus bat coronavirus HKU9 belonging to a novel Betacoronavirus subgroup. *J. Virol.* 2010 Nov; 84 (21): 11385-94.
- Menachery V.D., Yount B.L. Jr., Debbink K., Agnihothram S., Gralinski L.E., Plante J.A. et al. A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence. *Nat. Med.* 2015 Dec; 21 (12): 1508-13.
- Woo P.C., Huang Y., Lau S.K., Yuen K.Y. Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. *Viruses.* 2010; 2: 1804–1820. DOI: 10.3390/v2081803.
- Romano M., Ruggiero A., Squeglia F., Maga G., Berisio R. A Structural View of SARS-CoV-2 RNA Replication Machinery: RNA Synthesis, Proofreading and Final Capping. *Cells.* 2020; 9: 1267.
- Lu H., Stratton C.W., Tang Y.W. Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan, China: The mystery and the miracle. *J. Med. Virol.* 2020; 92: 401–2. DOI: 10.1002/jmv.25678.
- <https://covid19.who.int/>
- <https://www.rospotrebnadzor.ru/>
- Xu X.W., Wu X.X., Jiang X.G., Xu K.J., Ying L.J., Ma C.L. et al. Clinical findings in a group of patients infected with the 2019 novel coronavirus (SARS-Cov-2) outside of Wuhan, China: retrospective case series. *BMJ.* 2020; 368: m606. DOI: 10.1136/bmj.m606.
- He F., Deng Y., Li W. Coronavirus disease 2019: What we know? *J. Med. Virol.* 2020; 92: 719–25. DOI: 10.1002/jmv.25766.
- Wu Z., McGoogan J.M. Characteristics of and Important Lessons from the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72,314 Cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA.* 2020; 323: 1239–42. DOI: 10.1001/jama.2020.2648.
- Fozouni P., Son S., Diaz de León Derby M., Knott G.J., Gray C.N., D'Ambrosio M.V. et al. Amplification-free detection of SARS-CoV-2 with CRISPR-Cas13a and mobile phone microscopy. *Cell.* 2021 Jan 21; 184 (2): 323-39. DOI: 10.1016/j.cell.2020.12.001.
- Tevfik Dorak M., ed. Real-time PCR School of Clinical Medical Sciences (Child Health). Newcastle University, Newcastle-upon-Tyne (UK); by Taylor & Francis; 2006.
- Khavkina D.A., Ruzhentsova T.A., Chukhlyayev P.V., Garbuzov A.A., Shushakova E.K. The role of detoxification and antioxidant therapy in the treatment of COVID-19: theory and practice. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni. Aktual'nye voprosy.* 2020; 10 (2): 62-9. (in Russian)
- Ruzhentsova T.A., Chukhlyayev P.V., Khavkina D.A., Garbuzov A.A., Ploskireva A.A., Oseshnyuk R.A. et al. Possibilities of etiotropic therapy of coronavirus infection caused by SARS-CoV-2 in outpatients. *Meditsinskiy opponent.* 2020; 1 (9): 48-58. (in Russian)
- Ruzhentsova T.A., Chukhlyayev P.V., Khavkina D.A., Garbuzov A.A., Ploskireva A.A., Oseshnyuk R.A. et al. Efficacy and safety of favipiravir in the complex therapy of mild and moderate COVID-19. *Infeksionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie.* 2020; 4 (35): 26-38. (in Russian)

Штрек С.В.<sup>1,2</sup>, Блох А.И.<sup>1,2</sup>, Самойленко И.Е.<sup>1</sup>, Санников А.В.<sup>1,2</sup>, Боброва О.А.<sup>1</sup>, Шпынов С.Н.<sup>1,2</sup>, Рудаков Н.В.<sup>1,2</sup>

## ВАЛИДАЦИЯ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ОЦЕНКИ КОЛИЧЕСТВА РИККЕТСИЙ В ИССЛЕДУЕМОМ БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

<sup>1</sup>ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора, 644080, Омск, Россия;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 644099, Омск, Россия

На примере клинического штамма *R. sibirica* «Баево 105/87» оценена возможность количественного определения риккетсий в клинических образцах от больных сибирским клещевым тифом методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Культивирование осуществляли в желточных мешках развивающихся куриных эмбрионов (РКЭ), из которых забирали кусочек желточного мешка или хориона. Исследовано 125 образцов. Для ПЦР-РВ использован набор реагентов «RealBest ДНК *Rickettsia species* (комплект 1)». Полученные значения порогового цикла амплификации (Ct) сравнивали с результатами микроскопии препаратов мазков, окрашенных по методу Здродовского, значения которых разбивали на ранги: I ранг – единичные риккетсии в отдельных полях зрения, II ранг – единичные риккетсии в каждом поле зрения, III ранг – от 10 до 25 риккетсий в каждом поле зрения, IV ранг – от 25 до 50 риккетсий в каждом поле зрения. Медианное значение Ct для I ранга составило 17,6 (16,37; 18,58), для II – 16,0 (15,0; 16,41), для III – 15,0 (14,0; 15,1), для IV – 15,0 (13,7; 14,64). Установлена значимая средней силы корреляционная связь между количеством риккетсий в препарате при микроскопии и значением порогового цикла в ПЦР РВ ( $r=-0,4849542$ ;  $p=9,968e-09$ ). При построении ординальной логической регрессии получена модель с помощью, которой по значениям Ct можно определить количество риккетсий в образце. Представляло интерес обнаружение риккетсий в кровеносных сосудах хориона (РКЭ). В 10-ти образцах для исследования забрали желточный мешок и хорион, и параллельно исследовали методом ПЦР-РВ. Применение современных более чувствительных молекулярно-биологических методов позволяет осуществлять количественный анализ ДНК в хорионе, при этом сохраняя объемы наиболее ценного материала – желточного мешка.

Ключевые слова: клещевые риккетсиозы; риккетсии; полимеразная цепная реакция в режиме реального времени.

Для цитирования: Штрек С.В., Блох А.И., Самойленко И.Е., Санников А.В., Боброва О.А., Шпынов С.Н., Рудаков Н.В.

Валидация ПЦР в режиме реального времени для оценки количества риккетсий в исследуемом биологическом материале.

Клиническая лабораторная диагностика. 2022; 67 (11): 668-671. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-11-668-671>

Для корреспонденции: Штрек Сергей Владимирович, канд. мед. наук, зав. лаб. зоонозных инфекций отдела ПОБЗ «Омский НИИ природно-очаговых инфекций»; e-mail: [studi1990@mail.ru](mailto:studi1990@mail.ru)

Финансирование. Исследование выполнено в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 29.08.2022

Принята к печати 27.09.2022

Опубликовано 14.11.2022

Shtrek S.V.<sup>1,2</sup>, Blokh A.I.<sup>1,2</sup>, Samoylenko I.E.<sup>1</sup>, Sannikov A.V.<sup>1,2</sup>, Bobrova O.A.<sup>1</sup>, Shpynov S.N.<sup>1,2</sup>, Rudakov N.V.<sup>1,2</sup>

## REAL-TIME PCR VALIDATION TO ESTIMATE THE NUMBER OF RICKETTSIAS IN THE BIOLOGICAL MATERIAL UNDER STUDY

<sup>1</sup>Omsk Research Institute of Natural Focal Infections, 644080, Omsk, Russia;

<sup>2</sup>Omsk State Medical University, 644099, Omsk, Russia

Using the example of the clinical strain of *R. sibirica* «Bayevo 105/87», the possibility of quantitative determination of rickettsias in clinical samples from patients with Siberian tick-borne typhus by real-time polymerase chain reaction (PCR-RT) was evaluated. Cultivation was carried out in the yolk sacs of developing chicken embryos, from which a piece of the yolk sac or chorion was taken. A total of 125 samples were examined. A set of reagents “RealBest DNA *Rickettsia species* (kit1)” was used for PCR-RT. The obtained values of the threshold amplification cycle (Ct) were compared with the results of microscopy of smear preparations stained by the Zdrodovsky method, the values of which were divided into ranks: the I rank – single rickettsias in individual fields of vision, the II rank – single rickettsias in each field of vision, the III rank – from 10 to 25 rickettsias in each field of vision, the IV rank – from 25 to 50 rickettsias in each field of view. The median Ct value for rank I was 17.6 (16.37; 18.58), for the II – 16.0 (15.0; 16.41), for the III – 15.0 (14.0; 15.1) and for the IV – 15.0 (13.7; 14.64). A significant average correlation was established between the number of rickettsias in the preparation under microscopy and the value of the threshold cycle in PCR RT ( $r=-0,4849542$ ;  $p=9,968e-09$ ). When determining the correlation between the pathomorphological characteristic and the value of the threshold cycle, its absence was established. The detection of rickettsias in the blood vessels of the chorion of developing chicken embryos was of interest. In 10 samples, the yolk sac and chorion were taken for the study, and in parallel they were examined by PCR-RT. The use of modern, more sensitive molecular biological methods allows for quantitative analysis of DNA in the chorion, while preserving the volumes of the most valuable material – the yolk sac.

Key words: tick-borne rickettsioses; rickettsias; polymerase chain reaction real time.

For citation: Shtrek S.V., Blokh A.I., Samoylenko I.E., Sannikov A.V., Bobrova O.A., Shpynov S.N., Rudakov N.V. Real-time PCR validation to estimate the number of rickettsias in the biological material under study. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (11): 668-671 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-11-668-671>

For correspondence: Shtrek Sergey Vladimirovich, PhD, Head of the Zoonotic Infections Laboratory of the Department POBZ Omsk Research Institute of Natural Focal Infections; e-mail: [studi1990@mail.ru](mailto:studi1990@mail.ru)

**Information about authors:**

Shtrek S.V., <https://orcid.org/0000-0002-4509-1212>;  
Blokh A.I., <https://orcid.org/0000-0002-0756-2271>;  
Samoylenko I.E., <https://orcid.org/0000-0002-2819-9280>;  
Sannikov A.V., <https://orcid.org/0000-0003-3377-5374>;  
Bobrova O.A., <https://orcid.org/0000-0003-1880-8908>;  
Shpynov S.N., <https://orcid.org/0000-0002-4550-3459>;  
Rudakov N.V., <https://orcid.org/0000-0001-9566-9214>.

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

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

Received 29.08.2022

Accepted 27.09.2022

Published 00.11.2022

**Введение.** По уровню заболеваемости клещевые риккетсиозы (КР) входят в тройку наиболее распространённых трансмиссивных клещевых инфекций на территории Российской Федерации [1-5]. Система эпидемиологического надзора за КР включает информационный поток о популяции инфекционного агента. Для изучения его видового и генотипического разнообразия необходимо изолировать штаммы риккетсий, циркулирующих на различных очаговых территориях [4]. Существуют три биологические модели для выделения и культивирования штаммов риккетсий от больных КР и иксодовых клещей: лабораторные животные (преимущественно морские свинки, самцы), линии чувствительных культур клеток, РКЭ [3-7]. В процессе культивирования важную роль играет количественный контроль накопления риккетсий в биологических материалах (подсчёт риккетсий в образце). Общеприняты методы микроскопии препаратов мазков риккетсий, не позволяющие, однако, дифференцировать вид риккетсий [8, 9]. В данных методах присутствует субъективный характер, во многом зависящий от опыта исследователя. Имеются молекулярно-биологические методы, позволяющие определять наличие ДНК риккетсий в исследуемом биологическом материале [5, 10, 11]. Полимеразная цепная реакция с детекцией в электрофоретическом геле – качественная реакция, не позволяющая оценить количество копий ДНК. В РФ зарегистрированы наборы реагентов ПЦР-РВ для молекулярно-биологической диагностики КР: для детекции ДНК *Rickettsia species* – «РеалБест ДНК *Rickettsia species* (комплект 1)» и для детекции ДНК *R. sibirica/ R. heilongjiangensis* – «РеалБест ДНК *Rickettsia sibirica/Rickettsia heilongjiangensis* (комплект 1)» (АО «Вектор-Бест», Новосибирск). Наборы успешно апробированы для лабораторной диагностики КР [12-15]. Имеются отдельные публикации о применении указанных наборов для мониторинга природных очагов КР, которые не содержат анализа эффективности применения данных наборов для количественной оценки риккетсий в исследуемом биологическом материале.

**Цель исследования:** оценить возможность количественного определения риккетсий в клинических образцах от больных сибирским клещевым тифом методом ПЦР-РВ, используя в качестве модели биологический материал, полученный из желточных мешков и хориона РКЭ.

**Материал и методы.** Использован лиофильно высушенный клинически значимый штамм *R. sibirica* «Баево 105/87», выделенный в 1987 г., и используемый для получения диагностических препаратов для выявления

антител к *R. sibirica* у больных сибирским клещевым тифом людей. Культивирование осуществляли в желточных мешках 5-6-ти дневных РКЭ, которые вскрывали на 5-7 день после заражения, забирали кусочек желточного мешка или хориона, содержащего кровеносный сосуд для экстракции ДНК. Исследовано 125 образцов (6-7 пассаж).

**Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ПЦР-РВ).** Использован набор реагентов для выявления ДНК *Rickettsia* spp. «РеалБест ДНК *Rickettsia species* (комплект 1)» (Кат. № D-5391). Результаты ПЦР-РВ представлены в виде значений порогового цикла амплификации (Ct), в образцах, где рост сигнала отсутствовал, пороговое значение цикла приняли за 40.

Для исключения контаминации проверена стерильность образцов. Отсутствие контаминации контролировали путём высева в сахарный бульон, который инкубировали в термостате при 37°С. Проводился ежедневный мониторинг роста с окончательным учётом результатов через 96 часов. Во всех образцах отмечено отсутствие роста посторонней микрофлоры.

**Микроскопия препаратов мазков, окрашенных по методу Здродовского.** Заражённые РКЭ вскрывали и готовили препарат-мазок из стенки желточного мешка на обезжиренных предметных стёклах. В полях зрения препарата подсчитывали количество риккетсий, значения которых разбивали на ранги, где I ранг соответствовал единичным риккетсиям в отдельных полях зрения (табл. 1).

**Описание патоморфологической характеристики желточного мешка РКЭ.** При воспроизведении риккетсиозной инфекции на РКЭ, для желточных мешков характерны следующие патоморфологические признаки: средний или небольшой размер, выраженный сосудистый рисунок.

Для описания полученных данных применены стандартные приёмы описательной статистики по схеме Ме (Q1; Q3),

где: Ме – медиана вариационного ряда, Q1 и Q3 – нижний и верхний квартили вариационного ряда соответственно.

Проведена оценка корреляционных связей методом Пирсона. Построена ординальная логическая регрессия, обратная логит-трансформация выполнена по стандартной формуле:

$$P(Y) = \frac{\text{logit}(Y)}{1 - \text{logit}(Y)} .$$

Обработка данных выполнялась в программе R.4.0.3.

**Результаты.** При определении корреляционной связи между патоморфологической характеристикой и значением порогового цикла, установлено её отсутствие. В 83% желточные мешки имели малый размер. Распределение по характеру рисунка стенки желточного мешка следующее: в 49% – умеренно выраженный сосудистый рисунок, в 28% – слабовыраженный, в 23% – выраженный.

Представлял интерес обнаружение риккетсий в кровеносных сосудах хориона РКЭ. В 10-ти образцах для исследования забрали желточный мешок и хорион, и параллельно исследовали методом ПЦР-РВ. Медиана порогового цикла при исследовании желточного мешка – 16,85 (15,43; 18,48), хориона – 18,50 (17,00; 19,48). В одном из образцов желточного мешка выявлен отрицательный результат (при расчёте медианы не учитывался), при исследовании хориона результат положительный (Ct 18,50). Проблема может быть связана с взятием материала, так как не всегда удаётся точно взять ту часть желточного мешка, в которой находится кровеносный сосуд.

Характеристика распределений всех значений порогового цикла в различных группах отображена в диаграмме размаха (см. рисунок). Медианное значение Ct в первой группе с единичными риккетсиями в отдельных полях

зрения, составило 17,6 (16,37; 18,58). Медианное значение Ct в группе с единичными риккетсиями в каждом поле зрения, составило 16,0 (15,0; 16,41). Медианное значение Ct в группе, где в каждом поле зрения от 10-ти до 25-ти риккетсий, составило 15,0 (14,0; 15,1). Медианное значение Ct в группе, где в каждом поле зрения от 25-ти до 50-ти риккетсий, составило 15,0 (13,7; 14,64).

Установлена значимая средней силы корреляционная связь между количеством риккетсий в препарате при микроскопии и значением порогового цикла в ПЦР РВ ( $r=-0,4849542$ ;  $p=9.968e-09$ ).

При построении ординальной логической регрессии получена следующая модель:

$$\begin{cases} \text{logit}(P(Y \leq 1)) = -10.3202 + 0.4963Ct; \\ \text{logit}(P(Y \leq 2)) = -7.5193 + 0.4963Ct; \\ \text{logit}(P(Y \leq 3)) = -5.1413 + 0.4963Ct. \end{cases}$$

Фактические результаты сопоставлены с результатами, полученными при использовании полученной модели (табл. 2). Из 125 образцов, совпало 65: в I ранге совпало 4 образца, во II – 38 образцов, в III – 23 образца, в IV ранге нет совпадений, что обусловлено малыми различиями по Ct между III и IV рангами. Точность полученной модели составляет 52,0%. Аналогичным образом рассчитаны верхние и нижние значения Ct для предполагаемых рангов.

**Выводы:**

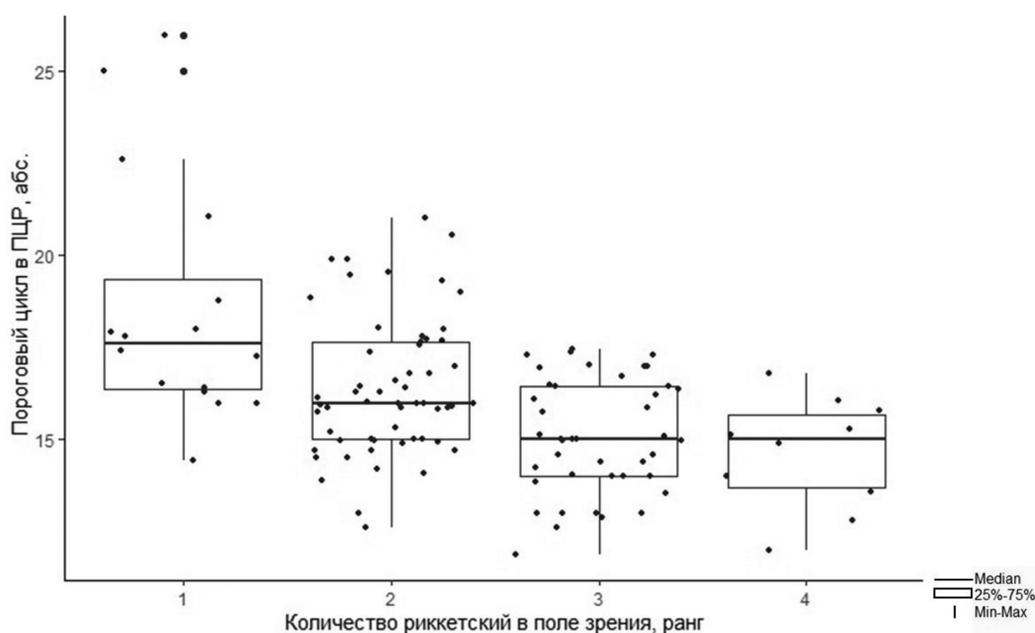
1. Отсутствует корреляционная связь между патоморфологической характеристикой заражённого желточного мешка и значением порогового цикла. Концентрация риккетсий в образце не влияют на размер и сосудистый рисунок желточного мешка.

2. Применение современных более чувствительных молекулярно-биологических методов позволяет осуществлять количественный анализ ДНК в хорионе, при этом сохраняя объёмы наиболее ценного материала – желточного мешка. Уменьшение количества манипуляций с материалом снижает риск контаминации.

Таблица 1

**Распределение по рангам в зависимости от количества риккетсий в препаратах мазках окрашенных по Здродовскому**

Ранг	Количество риккетсий в препарате	Количество исследованных желточных мешков
I	Единичные риккетсии в отдельных полях зрения	16
II	Единичные риккетсии в каждом поле зрения	57
III	От 10 до 25 риккетсий в каждом поле зрения	42
IV	От 25 до 50 риккетсий в каждом поле зрения	10



Распределение значений порогового цикла в группах, содержащих различное количество риккетсий по данным микроскопии.

Таблица 2

**Сопоставление фактического ранга образцов с предсказанным рангом, рассчитанным при использовании полученной модели, интервалы значений Ct для каждого ранга**

	Предсказанный ранг				
	1	2	3	4	
Фактический ранг	1	4*	11	1	0
	2	2	38*	17	0
	3	0	19	23*	0
	4	0	5	5	0
Интервалы значений Ct	>20.54	15.00-20.53	10.78-14.99	<10.77	

Примечание. \* – Количество результатов, совпавших при фактическом исследовании и рассчитанные при использовании полученной модели.

3. Доказана значимая средней силы корреляционная связь между значением порогового цикла амплификации в ПЦР-РВ и количеством риккетсий в препаратах-мазках, окрашенных по методу Здродовского. С использованием полученной модели для подсчёта бактерий в образце по значениям Ct, определены границы рангов.

4. Разработанный подход позволяет проводить количественную оценку риккетсий в клинических образцах от больных сибирским клещевым тифом с использованием тест-системы «РеалБест ДНК Rickettsia species». Использование комплекса методов, основанных на молекулярной индикации и микроскопии перспективно для совершенствования методики изоляции от больных КР и иксодовых клещей и культивирования штаммов риккетсий на различных биологических моделях.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 6, 7, 9, 10, 14 см. REFERENCES)

1. Рудаков Н.В., Пенъевская Н.А., Кумпан Л.В., Блох А.И., Шпынов С.Н., Транквилевский Д.В., Штрек С.В. Эпидемиологическая ситуация по риккетсиозам группы клещевой пятнистой лихорадки в Российской Федерации в 2012-2021 гг. и прогноз на 2022-2026 гг. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 1: 54-63.
2. Рудаков Н.В., Шпынов С.Н., Пенъевская Н.А., Блох А.И., Решетникова Т.А., Самойленко И.Е. и др. Особенности эпидемиологической ситуации по клещевым риккетсиозам в Российской Федерации в 2010-2020 гг. и прогноз на 2021 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 1: 73-80.
3. Рудаков Н.В., Ястребов В.К., Рудакова С.А. Трансмиссивные клещевые инфекции в Российской Федерации. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. 2015; 27: 6-9.
4. Рудаков Н.В. Риккетсии и риккетсиозы: руководство для врачей. Омск: Омский научный вестник; 2016.
5. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: Учебник для студентов медицинских вузов. 3-е изд., исправленное. Воробьев А.А., Быков А.С., Бойченко М.Н., ред. М.: Медицинское информационное агентство; 2022. ISBN 978-5-9986-0478-2.
6. Еремеева М.Е., Шпынов С.Н., Токаревич Н.К. Современные подходы к лабораторной диагностике риккетсиозов. *Инфекция и иммунитет*. 2014; 4(2): 113-34.
7. Бесхлебцова О.В., Гранитов В.М., Дедков В.Г. Лабораторная диагностика клещевых инфекций с природной очаговостью (клещевой риккетсиоз, иксодовый клещевой боррелиоз). *Бюллетень медицинской науки*. 2017; 8 (4): 50-5.
8. Гафарова М.Т., Бондаренко Е.И., Малий К.Д., Алиева Э.Э., Евстафьев И.Л., Товпинец Н.Н., Малая Н.К., Кубышкин А.В. Распространённость возбудителей трансмиссивных клещевых риккетсиозов на Крымском полуострове. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67(3): 170-6.

13. Щучинова Л.Д., Бондаренко Е.И., Ечешева А.В., Швалов А.Н., Злобин В.И. Клещевой риккетсиоз, вызываемый *Rickettsia heilongjiangensis*, и его лабораторная диагностика в Республике Алтай. *Современные проблемы науки и образования*. 2020; 4: 143.
15. Сильченко Е.В., Ошорова Л.М., Балжинимаева И.Ц., Бондаренко Е.И., Дашеева Н.А., Балданов Б.В., Сымбелова Т.А. Выявление возбудителей клещевых инфекций с помощью ПЦР-анализа, проводимого в рамках клинических исследований на базе «Республиканской клинической инфекционной больницы», г. Улан-Удэ. *Acta Biomedica Scientifica (East Siberian Biomedical Journal)*. 2018; 4 (3): 138-42.

REFERENCES

1. Rudakov N.V., Penyevskaya N.A., Kumpan L.V., Blokh A.I., Shpynov S.N., Trankvilevsky D.V., Shtrek S.V. Epidemiological Situation on Tick-Borne Spotted Fever Group Rickettsioses in the Russian Federation in 2012-2021, Prognosis for 2022-2026. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2022; 1: 54-63. (in Russian)
2. Rudakov N.V., Shpynov S.N., Pen'evskaya N.A., Blokh A.I., Reshetnikova T.A., Samoylenko I.E. et al. Features of the epidemiological situation on tick-borne rickettsioses in the Russian Federation in 2010-2020 and prognosis for 2021. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2021; 1: 73-80. (in Russian)
3. Rudakov N.V., Yastrebov V.K., Rudakova S.A. Transmissible tick-borne infections in Russian Federation. *Dal'nevostochnyi zhurnal infektsionnoy patologii*. 2015; 27: 6-9. (in Russian)
4. Rudakov N.V. Rickettsias and rickettsioses: a guide for doctors. Omsk: Omskiy nauchnyi vestnik; 2016. (in Russian)
5. Medical microbiology, virology and immunology: Textbook for students of medical universities. A. A. Vorobyov, A. S. Bykov, M. N. Boychenko, eds. 3<sup>rd</sup> ed. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo; 2022. ISBN 978-5-9986-0478-2. (in Russian)
6. Segura F., Pons I., Sanfeliu L., Nogueras M. Shell-vial culture, coupled with real-time PCR, applied to *Rickettsia conorii* and *Rickettsia massiliae*-Bar29 detection, improving the diagnosis of the Mediterranean spotted fever. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2016.
7. Ammerman N.C., Beier-Sexton M., Azad A.F. Laboratory Maintenance of *Rickettsia rickettsii*. *Current protocols microbiology*. 2008; Chapter 3; Unit 3A.5.
8. Eremeeva M.E., Shpynov S.N., Tokarevich N.K. Modern approaches to laboratory diagnosis of rickettsiosis. *Infektsiya i immunitet*. 2014; 4(2): 113-34. (in Russian)
9. Brouqui P., Bacellar F., Baranton G., Birtles R. J., Bjoer'sdorff A., Blanco J. R. et al. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*. 2004; 10(12):1108-32.
10. Kissenkötter J., Hansen S., Böhlken-Fascher S., Ademowo O.G., Oyinloye O.E., Bakarey A.S. et al. Development of a pan-rickettsial molecular diagnostic test based on recombinase polymerase amplification assay. *Analytical Biochemistry*. 2018; 544: 29-33.
11. Beskhlebцова О.В., Гранитов В.М., Дедков В.Г. Лабораторная диагностика клещевых инфекций с природной очаговостью (клещевой риккетсиоз, иксодовый клещевой боррелиоз). *Бюллетень медицинской науки*. 2017; 8 (4): 50-5. (in Russian)
12. Gafarova M.T., Bondarenko E.I., Maliy K.D., Alieva E.E., Evstafiev I.L., Tovpinets N.N., Malaya N.K., Kubyshekin A.V. Prevalence of causative agents of transmissible tick-borne rickettsioses in the Crimean Peninsula. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2022; 67(3):170-6. (in Russian)
13. Shchuchinova L.D., Bondarenko E.I., Echesheva A.V., Shvalov A.N., Zlobin V.I. Tick-borne rickettsiosis caused by *Rickettsia heilongjiangensis*, and its laboratory diagnostics in the Altai Republic. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2020; 4: 143. (in Russian)
14. Alieva E.E., Bondarenko E.I., Maliy K.D., Gafarova M.T., Shvalov A.N., Verbenets E.A. The role of Rhipicephalus sanguineus ticks parasitizing dogs in the spread of tick-borne rickettsial pathogens in the city of Sevastopol. *New microbes and new infections*. 2020; 36: 100704.
15. Sil'chenko E.V., Oshorova L.M., Balzhinimaeva I.Ts., Bondarenko E.I., Dasheeva N.A., Baldanov B.V., Symbelova T.A. Detection of causative agents of tick-borne infections by polymerase chain reaction assay carried out as a part of clinical studies in the "Republican clinical infectious diseases hospital" of Ulan-Ude. *Acta biomedica scientifica*. 2018; 3(4): 138-42. (in Russian)

## ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Жигалева О.Н.<sup>1</sup>, Ермолаев И.И.<sup>1,2</sup>, Марданлы С.Г.<sup>1,2</sup>, Гашенко Т.Ю.<sup>1,2</sup>

### АНАЛИЗ ОТЕЧЕСТВЕННОГО РЫНКА НАБОРОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ COVID-19 МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

<sup>1</sup>ЗАО «ЭКОлаб», 142530, Электрогорск, Россия;

<sup>2</sup>ГОУВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет», 142611, Орехово-Зуево, Россия

*COVID-19 — заболевание, вызываемое новым коронавирусом SARS-CoV-2. Первые сообщения о вспышках болезни появились в Китае 31 декабря 2019 г. Ровно через месяц ВОЗ объявила эту вспышку чрезвычайной ситуацией в области общественного здравоохранения, имеющей международное значение, а 11 марта — пандемией. В феврале инфекция начала быстро распространяться по разным странам, центром была объявлена Европа. К 17 апреля 2020 г. случаи заболевания были подтверждены во всех субъектах Российской Федерации. На начало сентября 2020 г. число случаев заболевания превысило 1 миллион, на 19 ноября — 2 млн; на 26 декабря — 3 млн. На 10 февраля 2021 г. — 4 млн; на 23 мая — 5 млн; на 20 июля — 6 млн, на 5 сентября — 7 млн, на 18 октября — 8 млн; на 13 ноября — 9 млн и десять млн в на 12 декабря 2021 г. Быстрое распространение вируса сопровождалось значительным увеличением числа инфицированных и смертей. Всего на конец первого полугодия 2022 г в России зафиксировано порядка 18,6 млн случаев заболеваний. Общее количество смертей от коронавируса в России на этот момент составило 382 313 человек (2,06% от всех заболевших). Количество сделанных тестов, выполненных различными методами анализа, составило более 274, 5 млн, т.е. 1,9 млн на 1 млн населения.*

*В связи с быстрым распространением и увеличением случаев нового заражения, вызванные вирусом SARS-CoV-2, появилась необходимость в использовании новых эпидемиолого-диагностических подходов, основанных на быстрой, точной и надежной технологии обнаружения инфекционного агента. Одним из таких методов обнаружения вируса является полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией и детекцией результатов в реальном времени. В обзоре представлены предложения отечественного рынка по ПЦР-диагностикам, даются их сравнительные потребительские характеристики.*

**Ключевые слова:** обзор; COVID-19; SARS-CoV-2; полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в реальном времени; петлевая изотермическая амплификация, наборы.

Для цитирования: Жигалева О.Н., Ермолаев И.И., Марданлы С.Г., Гашенко Т.Ю. Анализ отечественного рынка наборов для диагностики COVID-19 методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (11): 672-677. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-11-672-677>

**Для корреспонденции:** Жигалева Ольга Николаевна, руководитель научно-производственного отдела НПО ПЦР ЗАО «ЭКОлаб»; e-mail: [jigon@mail.ru](mailto:jigon@mail.ru)

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

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

Поступила 17.08.2022

Принята к печати 25.08.2022

Опубликовано 14.11.2022

*Zhigaleva O.N.<sup>1</sup>, Ermolaev I.I.<sup>1,2</sup>, Mardanly S.G.<sup>1,2</sup>, Gashenko T.Yu.<sup>1,2</sup>*

#### ANALYSIS OF THE DOMESTIC MARKET FOR COVID-19 DIAGNOSTIC KITS BY REAL-TIME REVERSE-TRANSCRIPTION POLYMERASE CHAIN REACTION

<sup>1</sup>JSC «EKOLab», 142530, Elektrogosk, Russia,

<sup>2</sup>State educational institution of higher education of the Moscow region «State Humanitarian University of Technology» (GGTU), 142611, Orekhovo-Zuyevo, Russia;

*COVID-19 is a disease caused by the new coronavirus SARS-CoV-2. Outbreaks were first reported in China on December 31, 2019. Exactly one month later, the WHO declared the outbreak a public health emergency of international concern, and on March 11, it was declared a pandemic. In February, the infection began to spread rapidly to various countries, with Europe declared the center. By April 17, 2020, cases had been confirmed in all subjects of the Russian Federation. At the beginning of September 2020, the number of cases exceeded one million; at November 19, two million; at December 26, three million. At February 10, 2021, four million; at May 23, five million; at July 20, six million; at September 5, seven million; at October 18, eight million; at November 13, nine million; and at December 12, 2021, ten million.*

*The rapid spread of the virus, accompanied by a significant increase in the number of infections and deaths. A total of about 18.6 million cases were recorded at the end of the first half of 2022. The total number of deaths from coronavirus in Russia at that time was 382,313 (2.06% of all cases). The number of tests performed by various analytical methods amounted to over 274, 5 million, i.e. 1.9 million per 1 million population.*

*The rapid spread and the increase in new infections caused by SARS-CoV-2 made it necessary to use new epidemiological and diagnostic approaches based on fast, accurate and reliable technology for detecting the infectious agent. One such virus detection*

*method is polymerase chain reaction with reverse transcription and real-time detection of the results. The review presents the domestic market offerings of PCR diagnostic kits and provides their comparative consumer characteristics.*

**Key words:** *review, COVID-19 (SARS-CoV-2), real-time reverse transcription – polymerase chain reaction, loop-mediated isothermal amplification, kits.*

**For citation:** Zhigaleva O.N., Ermolaev I.I., Mardanly S.G., Gashenko T.Yu. Analysis of the domestic market for COVID-19 diagnostic kits by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (11): 672-677 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-11-672-677>

**For correspondence:** *Zhigaleva Ol'ga Nikolaevna*, specialist of the Innovative Development Department CJSC «EKOlab»; e-mail: [jjigon@mail.ru](mailto:jjigon@mail.ru)

**Information about authors:**

Zhigaleva O.N., <https://orcid.org/0000-0002-5003-1089>;  
Ermolaev I.I., <https://orcid.org/0000-0003-0982-3970>;  
Mardanly S.G., <https://orcid.org/0000-0002-4556-135X>;  
Gashenko T.Yu., <https://orcid.org/0000-0001-6768-2251>.

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

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

Received 17.08.2022  
Accepted 25.08.2022  
Published 14.11.2022

**Введение.** Быстрое распространение заболевания COVID-19 актуализировало важность лабораторной диагностики новой инфекции. Одним из методов лабораторной диагностики является тест обратной транскрипции в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ). Российский рынок молекулярной диагностики быстро оснастился относительно большим количеством ПЦР-наборов в различных вариациях по исполнению теста, скорости, чувствительности, специфичности, стоимости и воспроизводимости анализа.

Коронавирусы представляют собой РНК-вирусы с положительной цепью. Гены вируса ORF1ab, E, N и S являются мишенями, наиболее часто используемыми для обнаружения SARS-CoV-2 с помощью ОТ-ПЦР [1, 2].

Вирусную РНК можно выявить методом ПЦР из различных биологических материалов. Разнообразие биобразцов для исследования обосновано тропизмом вируса. Исследуемый биоматериал в ПЦР-анализе: мазки из носоглотки, жидкость из нижних дыхательных путей, мокрота, кровь, слюна и т.д. При острой респираторной инфекции ОТ-ПЦР обычно используется для выявления вируса из рото/носоглоточных мазков и в выделениях дыхательных путей [2]. Применение ПЦР анализа различных биологических материалов во время лечения пациентов с диагнозом COVID-19 является важным фактором оценки эффективности проводимой терапии, оценки клинического прогноза [3,4].

Традиционный метод проведения анализа для ОТ-ПЦР-РВ включает в себя предварительный этап очистки и экстракции РНК непосредственно перед этапом амплификации. В настоящее время наборы для выделения нуклеиновых кислот различных производителей также широко представлены на рынке.

Цель исследования – изучение рынка предложений коммерческих доступных диагностических наборов в различном формате их исполнения, используемых для проведения ПЦР при диагностике COVID-19, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, и приведение сравнительных данных выбранных наборов.

**Материал и методы.** В настоящее время на отечественном рынке ПЦР-наборов присутствует более 20 на-

боров реагентов различных фирм и стран производителей (Россия, Корея, Китай, США). Коммерчески доступные ОТ-ПЦР-РВ наборы для выявления SARS-CoV-2 были идентифицированы через веб-сайт Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения [5]. Перспективные коммерческие наборы были отобраны на основании:

- действующей регистрации;
- доступной информации (инструкции, реклама и др.).

Все наборы представляют собой классический формат изготовления наборов для ПЦР исследований и подходят под задачи проведения ускоренной и качественной диагностики коронавирусной инфекции SARS-CoV-2.

**Результаты и обсуждение.** Все медицинские изделия для обнаружения SARS-CoV-2 сравнивали по следующим характеристикам:

вариант технологии медицинского изделия, включающий способ проведения амплификации, экстракции, анализируемые биологические образцы. Выделены две основные технологии ПЦР-наборов – ОТ-ПЦР-РВ и петлевая изотермическая ПЦР; два основных способа экстракции РНК – преципитационная и магнитная сорбции. Перечень зарегистрированных МИ, выбранных нами, и их характеристики (табл. 1).

Как видно из табл.1, все медицинские изделия выполнены в современном формате проведения ПЦР, который используется как в изотермической амплификации LAMP, так и в широко используемом методе ПЦР с детекцией результатов в реальном времени. Выделены два основных широко используемых метода экстракции РНК с магнитной адсорбцией и на основе преципитата.

**Петлевая изотермическая амплификация (LAMP).** LAMP – метод амплификации нуклеиновых кислот, известный с 2000 г., который в настоящее время занимает всё большее место в диагностике инфекционных заболеваний, что во многом вызвано пандемией COVID-19 и необходимостью масштабного скрининга населения в максимально сжатые сроки. Этот процесс является реакцией автоциклируемого синтеза ДНК, катализируемой ферментом ДНК-полимеразы с высокой актив-

**Наборы реагентов различных фирм и стран производителей для диагностики SARS-CoV-2 в различном исполнении**

Организация держатель удостоверения, производитель медицинского изделия	Наименование медицинского изделия	Метод исполнения ПЦР	Биоматериал
ООО «Современные лабораторные технологии», Россия	Набор реагентов для выделения РНК коронавируса SARS-CoV-2 из клинического материала на магнитных частицах « <b>SLT-NAMg-SARS-96</b> »	Классическая ОТ-ПЦР в реальном времени Магнитная адсорбция	Мазок рото/носоглоточный, кровь, фекалии
ЗАО «ЭКОлаб» Ручной и автоматический вариант, Россия	Набор реагентов « <b>КовидЭк</b> » для выделения и выявления РНК вируса SARS-CoV-2 в клиническом материале методом ОТ-ПЦР-РВ		Мазок эпителиальных клеток, полученных из носа, носоглотки и/или ротоглотки
АО «Вектор-Бест», Россия	Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени <b>RealBest РНК SARS-CoV-2</b>		Мазок со слизистой носа и задней стенки глотки, мокрота, бронхоальвеолярный лаваж
ЗАО «ЭКОлаб», Россия	Набор реагентов « <b>КовидЭк Магнит</b> » для выделения и выявления РНК вируса SARS-CoV-2 в клиническом материале методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени		Мазок эпителиальных клеток, полученных из носа, носоглотки и/или ротоглотки
ООО «Биолабмикс», Россия	Набор реагентов для выделения РНК коронавируса SARS-CoV-2 из мазка/соскоба эпителиальных клеток на магнитных частицах « <b>M-SARS-CoV-2-100</b> »	Петлевая изотермическая амплификация	Мазок или соскоб эпителиальных клеток, полученных из носоглотки и/или ротоглотки
ООО НПФ «Литех», Россия	Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом изотермической амплификации с обратной транскрипцией IsoAmp SARS-CoV-2, Вариант исполнения: <b>IsoAmp SARS-CoV-2</b>		Мазок эпителиальных клеток, полученных из носа, носоглотки и/или ротоглотки
ООО «ТестГен», Россия	Набор реагентов для выявления РНК вируса SARS-CoV-2 методом колориметрической петлевой изотермической амплификации <b>CoV-2-COLOR-мечт</b>		Мазок эпителиальных клеток, полученных из носоглотки и/или ротоглотки
ООО «ЭВОТЭК-МИРАЙ ГЕНОМИКС», Россия	Набор для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 в биологическом материале методом изотермической амплификации в режиме реального времени в вариантах исполнения		Мазок эпителиальных клеток, полученных из носоглотки и/или ротоглотки
ЗАО «ЭКОлаб», Россия	Набор реагентов « <b>КовидЭк Экстракт</b> » для выделения и выявления РНК вируса SARS-CoV-2 в клиническом материале методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени	Классическая ОТ-ПЦР в реальном времени на основе преципитации	Мазок эпителиальных клеток, полученных из носа, носоглотки и/или ротоглотки
OSANG Healthcare Co., Ltd., «ОСАНГ Хэлскеа Ко., Лтд.», республика Корея	Набор реагентов выявления РНК коронавируса SARS/COVID-19 методом ПЦР <b>GeneFinder COVID-19 Plus RealAmp Kit (IFMR-45)</b>		Мазок из носоглотки, ротоглотки, передней части носа и средней носовой раковины, бронхоальвеолярный лаваж и мокроты
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия	Набор реагентов для выявления и количественного определения РНК SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР <b>АмплиСенс® COVID-19-FL</b>		Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки, аспират из зева, бронхоальвеолярный лаваж /промывные воды бронхов, плазма крови, фекальный/ректальный мазок, аутопсийный материал

ностью смещения цепи, проходящей при постоянной температуре 60–65 °С. При такой температуре одно- и двухцепочечная формы ДНК находятся в динамическом равновесии, поэтому для инициации реакции не требуется нагрев до полной денатурации. Для протекания реакции достаточно присутствия в смеси единственного

фермента – ДНК-полимеразы, обладающей способностью вытеснять цепь ДНК [6].

**Преимущества.** Одним из них является высокая скорость исследования – подтверждение результатов для типичной процедуры RT-LAMP происходит в несколько раз быстрее, чем при ОТ-ПЦР-РВ. Отсутствие стадии

денатурирования и возможное объединение процессов амплификации и детекции позволяют провести анализ с коротким временем получения результатов. Другим достоинством является простота применения, поскольку изотермический характер амплификации не требует использования дорогостоящего оборудования. Визуализация результатов либо по индикатору, можно использовать рН зависимые красители, либо по степени помутнения раствора визуально [6].

**Недостатки.** Технологию LAMP пока проблематично использовать в режиме мультиплекса для выявления сразу нескольких патогенов в одной пробирке, что важно при диагностике острых респираторных инфекций. Но, пожалуй, одним из основных недостатков тестов на базе LAMP является относительная сложность дизайна праймеров, так как требуется подобрать сразу 6–8 участков на достаточно коротком фрагменте ДНК и избежать при этом амплифицирования других (нежелательных) её последовательностей, особенно в геноме хозяина, что существенно ограничивает выбор целевых участков [7, 8, 9].

Данный метод детекции часто приводит к ложнонегативным результатам [6].

**Классическая ОТ-ПЦР-РВ с экстракцией.** Наборы классической ОТ-ПЦР-РВ с экстракцией нашли широкое применение в лабораторной практике благодаря высокой чувствительности анализа, удобства исполнения и интерпретации результатов анализа.

Наборы ПЦР, представленные на рынке, предлагают несколько способов экстракции РНК. Одним из наиболее востребованных является магнитная адсорбция РНК.

**Магнитная абсорбция.** Использование магнитной адсорбции доказало свой большой потенциал для ускорения, упрощения проведения анализа. Таким образом, она преимущественно используется в автоматизированных процедурах проведения анализа на специальных автоматических станциях или, при полуавтоматическом анализаторе, также предусматривает проведение экстракции ручным способом на магнитных штативах.

Использование магнитных твердых носителей имеет ряд преимуществ:

Для процесса выделения используются магнитные носители (синтетические полимеры, биополимеры, пористое стекло, оксид железа с модифицированной поверхностью и другие) с высокой аффинностью к конкретной нуклеиновой кислоте. Используя их можно выделять как ДНК, так и РНК с высоким выходом продукта из образцов.

В целом сорбентные методы обеспечивают высокую степень очистки нуклеиновых кислот, но могут быть сопряжены с потерями (особенно в случае низкого содержания в образце – «низкокопийный образец») вследствие необратимой адсорбции на носителе или в процессе нескольких промывок. Кроме того, остаточное количество сорбента в конечном растворе ДНК может ингибировать ферментативные реакции ПЦР. Поэтому широко используют метод экстракции нуклеиновых кислот на основе преципитации (спиртовом осаждении), который используют в основном при ручном выделении.

**Биологические образцы.** Наборы отличаются еще между собой и по исследованию разного вида биологического материала. Большая часть наборов предназначена для исследования только мазков эпителиальных клеток, полученных из носоглотки и/или ротоглотки. Несколько наборов предлагают возможность поиска вирусной РНК в расширенном списке биоматериалов, таких, как мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки, аспират из зева, бронхоальвеолярный лаваж/промывные воды бронхов, плазма крови, фекальный/рктальный мазок, аутопсийный материал.

Все представленные наборы от компаний производителей в различном варианте исполнения имеют свои аналитические и диагностические характеристики. Перечень рассматриваемых МИ и их характеристики представлены в табл. 2.

Из данных табл. 2 следует, что общее время исследования с набором «КовидЭк Магнит», занимает 75 мин (с учетом времени на пробоподготовку и обратную транскрипцию), а у наборов «SLT-NAMg-SARS-96» – от 80 мин, «M-SARS-CoV-2-100» – от 60 минут, при использовании автоматизированных станций. Минимальное количество биологического материала, необходимое для его идентификации в наборе «КовидЭк Магнит», составляет  $5 \times 10^2$  ГЭ/мл, в наборе «M-SARS-CoV-2-100» – это  $1,0 \times 10^4$  ГЭ/мл [10].

При анализе рынка наборов в исполнении петлевой изотермической амплификации ДНК / РНК, в табл. 2 рассматриваются такие наборы: IsoAmp SARS-CoV-2, «Набор для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 (компания ЭВОТЭК-МИРАЙ ГЕНОМИКС)», CoV-2-COLOR-тест. CoV-2-COLOR-тест. Общее время исследования 23- 40 минут.

Быстрота этого варианта ПЦР существенно отличает его от наборов для проведения классической ОТ-ПЦР-РВ, но имеет свои недостатки. А именно: низкую чувствительность и неудобство учета результатов проведенного анализа. IsoAmp SARS-CoV-2 и набор компании «ЭВОТЭК-МИРАЙ ГЕНОМИКС» составляет  $10^4$  ГЭ/мл, в наборе CoV-2-COLOR-тест – это  $2,5 \times 10^4$  ГЭ/мл при использовании в амплификации выделенной РНК и  $10^5$  ГЭ/мл при использовании нативного материала, а чувствительность набора от ООО «ЭВОТЭК-МИРАЙ ГЕНОМИКС» составляет  $10^4$  ГЭ/мл. Диагностическая специфичность и чувствительность у всех наборов составляет 100%. [10].

ПЦР-наборы, описанные в методе классической ОТ-ПЦР в реальном времени на основе преципитации, позволяют провести амплификацию от 90 до 120 мин, и только с набором «КовидЭк Экстракт» время проведения амплификации составляет 70 минут. Минимальное количество биологического материала, необходимое для его идентификации у наборов «КовидЭк Экстракт», РеалБест РНК SARS-CoV-2, АмплиСенс® COVID-19-FL одинаковое, и составляет  $10^3$  ГЭ/мл. Самой низкой чувствительностью обладает набор для ОТ-ПЦР-РВ Gene-Finder COVID-19 Plus RealAmp Kit (IFMR-45) –  $1,8 \times 10^5$  ГЭ/мл. Способность определять наличие в образце только тот объект, для выявления которого был разработан ПЦР-набор, у всех представленных наборов составляет 100%, особенностью является набор для ОТ-ПЦР-

**Основные аналитические/диагностические характеристики, рассматриваемых наборов в различном варианте исполнения ОТ-ПЦР**

Метод исполнения ПЦР	Характеристики наборов	Наименование медицинского изделия			
		«SLT-NAMg-SARS-96»	«КовидЭк Магнит»	«M-SARS-CoV-2-100»	
Классическая ОТ-ПЦР в реальном времени Магнитная адсорбция	Аналитическая чувствительность	Нет данных	5x10 <sup>2</sup> ГЭ/мл	1,0x10 <sup>4</sup> копий/мл	
	Аналитическая специфичность	Нет данных	100%	100%	
	Диагностическая специфичность	Нет данных	100%	Нет данных	
	Диагностическая чувствительность	Нет данных	100%	Нет данных	
	Время экстракции и амплификации	От 23 мин – экстракция От 60 мин – амплификация	От 15 мин – экстракция От 60 мин – амплификация	От 20 мин – экстракция От 40 мин – амплификация	
		<i>IsoAmp SARS-CoV-2</i>	ЭВОТЭК-МИРАЙ ГЕНОМИКС	<i>CoV-2-COLOR-мест</i>	
	Аналитическая чувствительность	10 <sup>4</sup> ГЭ/мл	1x10 <sup>4</sup> копий/мл	2,5x10 <sup>4</sup> ГЭ/мл	
	Аналитическая специфичность	100%	100%	Проведена <i>in silico</i>	
Петлевая изотермическая амплификация	Диагностическая специфичность	100%	100%	Мазок из ротоглотки без выделения РНК	100%
				Мазок из ротоглотки с выделением РНК	100%
				Мазок из носоглотки без выделения РНК	100%
				Мазок из носоглотки с выделением РНК	100%
	Диагностическая чувствительность	100%	100%	Мазок из ротоглотки без выделения РНК	96,6%
				Мазок из ротоглотки с выделением РНК	100%
				Мазок из носоглотки без выделения РНК	93,3%
				Мазок из носоглотки с выделением РНК	100%
	Время экстракции и амплификации	От 40 мин	От 40 мин	От 25 мин	
			«КовидЭк Экстракт»	<i>GeneFinder COVID-19 Plus RealAmp Kit (IFMR-45)</i>	<i>RealBectm РНК SARS-CoV-2</i>
Классическая ОТ-ПЦР в реальном времени на основе преципитации	Аналитическая чувствительность	10 <sup>3</sup> ГЭ/мл	1,8x10 <sup>5</sup> ГЭ/мл	1x10 <sup>3</sup> копий/мл	от 5x10 <sup>2</sup> до 1x10 <sup>3</sup> ГЭ/мл (различный биологический материал)
	Аналитическая специфичность	100%	100%	100%	100%
	Диагностическая специфичность	100%	Проведена <i>in silico</i>	100%	100% (различный биологический материал)
	Диагностическая чувствительность	100%	Проведена <i>in silico</i>	100%	100% (различный биологический материал)
	Время амплификации	~70 мин	~90 мин	От 70 мин	От 90 мин

PВ GeneFinder COVID-19 Plus RealAmp Kit (IFMR-45), у которого данный показатель был проверен методом *in silico*.

Таким образом, полимеразная цепная реакция (ПЦР) имеет множество разнообразных технологий исполнения, охватывающих научные исследования, медицину. На сегодняшний день на рынке присутствует огромное количество компаний-производителей, готовых предложить различные варианты проведения ОТ-ПЦР-РВ для диагностики вируса SARS-COV-2. Среди рассмотренных различных вариантов исполнения ПЦР, классическая ОТ-ПЦР-РВ с экстракцией стала незаменимой и поистине революционной, она имеет меньше недостатков, чем петлевая изотермическая амплификация.

**Заключение.** В то время как рынок ПЦР- наборов настроен на постепенный рост в обозримом будущем, недавняя вспышка COVID-19, которая превратилась в глобальную пандемию, оказала влияние на рынок ПЦР-технологий. Рынок ПЦР-наборов для обнаружения COVID-19 делится на наборы в исполнении различных вариантов проведения анализа. Такое разнообразие различных методов связано с увеличением выпуска передовых продуктов благодаря технологическим достижениям в таких областях как биохимия, биофизика. Ключевыми игроками на рынке ПЦР-наборов на территории Российской Федерации являются: ЗАО «ЭКОлаб», ООО НПФ «Литех», ООО «ДНК-Технология ТС», ФГУ ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, ООО «НекстБио», АО «Вектор-Бест» и др. Ключевые игроки отрасли внедряют передовые технологии в ПЦР-наборы для тестирования на COVID-19. Кроме того, следует отметить, что данная технология ОТ-ПЦР-РВ из-за их высокой специфичности и чувствительности является «золотым стандартом» при обнаружении SARS-COV-2.

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 2, 8, 9 см. REFERENCES)

3. Методическое пособие Основы Полимеразной Цепной Реакции (ПЦР) / ООО «ДНК-Технология ТС». Систем. требования: Adobe Acrobat Reader. URL: [https://www.dna-technology.ru/sites/default/files/pcr\\_a5\\_083-4.pdf](https://www.dna-technology.ru/sites/default/files/pcr_a5_083-4.pdf) (дата обращения: 11.07.2022).
4. Марданлы С.Г. Роль лабораторных исследований в системе эпидемиологического надзора за инфекциями. *Медицинский алфавит*. 2017; 4(28): 61-3.
5. Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения: государственный реестр медицинских изделий и организаций (индивидуальных предпринимателей), осуществляющих производство и изготовление медицинских изделий. URL: <https://roszdravnadzor.gov.ru/services/misearch> (дата обращения 05.07.2022).
6. Хафизов К.Ф., Петров В.В., Красовитов К.В., Золкина М.В., Акимкин В.Г. Экспресс-диагностика новой коронавирусной

инфекции с помощью реакции петлевой изотермической амплификации. *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(1): 17-28. DOI: 10.36233/0507-4088-42.

7. Зубик А.Н., Рудницкая Г.Е., Евстапов А.А. Изотермическая петлевая амплификация LAMP в формате микроустройств (обзор). *Научное приборостроение*. 2021; 31(1): 3-43. URL: <http://iairas.ru/mag/2021/full1/Art1.pdf> (дата обращения: 24.07.2022).
10. ГОСТ Р 57175-2016. Требования к качеству и безопасности ПЦР-наборов, проведению исследований и испытаний с использованием метода ПЦР при идентификации целевых таксонов микрофлоры, растений и генетически модифицированных организмов. М.: Стандартиформ; 2016.

#### REFERENCES

1. Garg A., Ghoshal U., Patel S. S., Singh D. V., Arya A. K., Vasanth S. et al. Evaluation of seven commercial RT-PCR kits for COVID-19 testing in pooled clinical specimens. *Journal of Medical Virology*. 2021; 93(4), 2281–6. DOI: 10.1002/jmv.26691.
2. van Kasteren P. B., van der Veer B., van den Brink S., Wijsman L., de Jonge J., van den Brandt A. et al. (2020). Comparison of seven commercial RT-PCR diagnostic kits for COVID-19. *Journal of Clinical Virology*. 2020; 128: 1-5. DOI: 10.1016/j.jcv.2020.104412.
3. Manual on Polymerase Chain Reaction (PCR) Basics / LLC «DNA-Technology TS». System requirements: Adobe Acrobat Reader. URL: [https://www.dna-technology.ru/sites/default/files/pcr\\_a5\\_083-4.pdf](https://www.dna-technology.ru/sites/default/files/pcr_a5_083-4.pdf) (accessed 11 July 2022). (in Russian)
4. Mardany S.G. Role of laboratory research in the system of epidemiological surveillance of infections. *Meditinskiiy alfavit*. 2017; 4(28): 61-3. (in Russian)
5. Federal Service for Surveillance in Healthcare (Roszdravnadzor): state register of medical devices and organizations (individual entrepreneurs) engaged in the production and manufacture of medical devices. URL: <https://roszdravnadzor.gov.ru/services/misearch> (accessed 05 July 2022). (in Russian)
6. Khafizov K.F., Petrov V.V., Krasovitov K.V., Zolкина M.V., Akimkin V.G. Rapid diagnostics of novel coronavirus infection by loop-mediated isothermal amplification. *Problems of Virology. Voprosy virusologii*. 2021; 66(1): 17-28. DOI: 10.36233/0507-4088-42. (in Russian)
7. Zubik A. N., Rudnitskaya G. E., Evstrapov A. A. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique in microdevice format (review). *Nauchnoe priborostroenie*. 2021; 31(1): 3-43. URL: <http://iairas.ru/mag/2021/full1/Art1.pdf> (accessed 24 July 2022). (in Russian)
8. Zhang Y., Ren G., Buss J., Barry A. J., Patton G. C., Tanner N. A. Enhancing colorimetric loop-mediated isothermal amplification speed and sensitivity with guanidine chloride. *BioTechniques*. 2020; 69(3): 179–85. DOI: 10.2144/btn-2020-0078.
9. Lu R., Wu X., Wan Z., Li Y., Zuo L., Qin J. et al. Development of a Novel Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Detection of SARS-CoV-2. *Virologica Sinica. Science Press*. 2020; 35(3), 344-7. DOI: 10.1007/s12250-020-00218-1.
10. State Standard 57175-2016. Requirements for the quality and safety of PCR kits, research and testing using the PCR method in the identification of the target taxa of microorganisms, plants and genetically modified organisms. Moscow: Standartinform; 2016. (in Russian)

Назарова В.В.<sup>1</sup>, Николаев Н.С.<sup>1,2</sup>, Тарасова Т.С.<sup>1</sup>, Добровольская Н.Ю.<sup>1</sup>, Преображенская Е.В.<sup>1</sup>

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОПЫТА РАБОТЫ В ПЕРИОД ПАНДЕМИИ COVID-19 ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ КАЧЕСТВА ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЙ

<sup>1</sup>ФГБУ «Федеральный центр травматологии, ортопедии и эндопротезирования» Минздрава РФ, 428020, г. Чебоксары, Россия;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И. Н. Ульянова», 428015, г. Чебоксары, Россия

*Вопросы лабораторной диагностики актуальны с первых дней пандемии SARS-CoV-2 и играют ключевую роль в борьбе с распространением новой коронавирусной инфекции. Прямым методом этиологической диагностики возбудителя COVID-19 является детекция РНК SARS-CoV-2 с применением метода амплификации нуклеиновых кислот. В условиях пандемии и массового обращения пациентов за медицинской помощью актуальными становятся вопросы обеспечения качества проводимых молекулярно-биологических исследований на всех этапах (преаналитическом, аналитическом, постаналитическом), поскольку результаты и сроки выполнения исследования влияют не только на постановку диагноза и тактику лечения конкретного пациента, но и являются основанием для введения противоэпидемических мероприятий, принятия мер организационного характера. Цель исследования - обобщить опыт по созданию эффективной и надёжной системы управления качеством молекулярно-биологических исследований в условиях пандемии на примере федерального бюджетного учреждения здравоохранения. Проанализирован опыт работы лаборатории ФБУЗ в условиях пандемии COVID-19, проведён анализ ошибок на преаналитическом, аналитическом и постаналитическом этапах ПЦР-исследований с выделением критериев качества, воздействие на которые значимо ведёт к улучшению качества. В основу системы контроля качества ПЦР-исследований положены разработка регламентирующих документов и инструкций для пациента и сотрудников лаборатории, регистрация всех документов в единой информационной системе с доступом к информации всех структурных подразделений, с возможностью выгрузки данных в личный кабинет пациента на сайте учреждения. Выделены индикаторы качества всех этапов ПЦР-исследований и мероприятия, достоверно влияющие на качество лабораторных исследований; определены меры, позволяющие снизить время оборота теста для ПЦР: распределение потоков биоматериала, оптимизация работы операторов, закупка дополнительного оборудования, система обратной связи с пациентами, система информирования органов инфекционного контроля. Полученные результаты позволяют создать надёжную систему контроля качества, свести к минимуму риск получения ошибочных результатов исследований, оптимизируя работу клинико-диагностической лаборатории и повышая её производительность.*

**Ключевые слова:** ПЦР-диагностика; индикаторы качества ПЦР-исследований; время оборота лабораторного теста.

**Для цитирования:** Назарова В.В., Николаев Н.С., Тарасова Т.С., Добровольская Н.Ю., Преображенская Е.В. Использование опыта работы в период пандемии COVID-19 для обеспечения качества ПЦР-исследований. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (11): 678-684. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-11-678-684>

**Для корреспонденции:** Назарова Валентина Валентиновна, врач клин. лаб. диагностики; e-mail: Nazira0313@yandex.ru

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

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

Поступила 31.08.2022

Принята к печати 23.09.2022

Опубликовано 14.11.2022

*Nazarova V.V.<sup>1</sup>, Nikolaev N.S.<sup>1,2</sup>, Tarasova T.S.<sup>1</sup>, Dobrovolskaya N.Yu.<sup>1</sup>, Preobrazhenskaya E.V.<sup>1</sup>*

USING EXPERIENCE DURING THE COVID-19 PANDEMIC TO ENSURE THE QUALITY OF PCR STUDIES

<sup>1</sup>Federal State Budgetary Institution «Federal Center for Traumatology, Orthopedics and Arthroplasty» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 428020, Cheboksary, Russian Federation;

<sup>2</sup>Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Chuvash State University named after I.N. Ulyanov», 428015, Cheboksary, Russia

*The issues of laboratory diagnostics have been relevant since the first days of the SARS-CoV-2 pandemic and play a key role in the fight against the spread of a new coronavirus infection. A direct method for the etiological diagnosis of the causative agent of COVID-19 is the detection of SARS-CoV-2 RNA using the nucleic acid amplification method. In the context of a pandemic and the mass appeal of patients for medical care, the issues of ensuring the quality of ongoing molecular biological studies at all stages (preanalytical, analytical, postanalytical) become the most relevant. The results and timing of the study not only affect the diagnosis and treatment tactics of a particular patient, but are also the basis for the introduction of anti-epidemic measures, the adoption of organizational measures. The study is to summarize the experience in creating an effective and reliable system for managing the quality of molecular biological research in a pandemic using the example of a federal budgetary healthcare institution. The experience of the laboratory of a federal healthcare institution in the context of the COVID-19 pandemic was analyzed, errors were analyzed at the preanalytical, analytical and postanalytical stages of PCR studies with the identification of quality criteria, the impact on which significantly leads to quality improvement. The quality control system for PCR studies is based on the development of regulatory documents and instructions for the patient and laboratory staff, registration of all documents in a single information system with access to information from all structural divisions, with the possibility of uploading data to the patient's personal account on the institution's website. Quality indicators of all stages of PCR studies and measures that significantly affect the quality of laboratory studies were identified; Measures have been identified to reduce the turnaround time of a PCR test: distribution of biomaterial flows, optimization of operators' work, purchase of additional equipment, a patient feedback system, and an infection control information system. The obtained results make it possible to create a reliable quality*

*control system, minimize the risk of obtaining erroneous research results, optimizing the work of the clinical diagnostic laboratory and increasing its productivity.*

**Key words:** *PCR diagnostics; indicators of the quality of PCR studies; laboratory test turnaround time.*

**For citation:** Nazarova V.V., Nikolaev N.S., Tarasova T.S., Dobrovol'skaya N.Yu., Preobrazhenskaya E.V. Using experience during the COVID-19 pandemic to ensure the quality of PCR studies. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (11): 678-684. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-11-678-684>

**For correspondence:** *Nazarova V.V.*, clinical laboratory diagnostics doctor; e-mail: [Nazira0313@yandex.ru](mailto:Nazira0313@yandex.ru)

**Information about authors:**

Nazarova V.V., <https://orcid.org/0000-0002-8872-4040>;

Nikolaev N.S., <https://orcid.org/0000-0002-1560-470X>;

Tarasova T.S., <https://orcid.org/0000-0002-0207-6581>;

Dobrovol'skaya N.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-8786-4316>;

Preobrazhenskaya E.V., <https://orcid.org/0000-0003-3556-145X>.

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

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

Received 31.08.2022

Accepted 23.09.2022

Published 14.11.2022

**Введение.** Распространение новой коронавирусной инфекции привело к глобальным изменениям во всех сферах деятельности человека, переросло в пандемию, ставшую одной из самых смертоносных в истории человечества и заставившую системы здравоохранения всех стран работать с огромными перегрузками.

Вопросы лабораторной диагностики актуальны с первых дней пандемии SARS-CoV-2 и играют ключевую роль в борьбе с распространением новой коронавирусной инфекции. Прямым методом этиологической диагностики возбудителя COVID-19 является детекция РНК SARS-CoV-2 с применением метода амплификации нуклеиновых кислот (МАНК) [1]. Согласно «Временным методическим рекомендациям» (15 версия) подтвержденным считается случай COVID-19 при положительном результате лабораторного исследования на наличие РНК SARS-CoV-2 с применением МАНК или антигена SARS-CoV-2 с применением иммунохроматографического анализа (ИХА) вне зависимости от клинических проявлений [1]. ПЦР - высокочувствительный тест, широко применяющийся для лабораторной диагностики вирусных инфекций, - является «золотым стандартом» для специфической лабораторной диагностики COVID-19 [2].

В условиях пандемии и массового обращения пациентов за медицинской помощью актуальными становятся вопросы обеспечения качества проводимых молекулярно-биологических исследований на всех этапах (преаналитическом, аналитическом, постаналитическом), поскольку достоверность результатов и сроки выполнения исследования влияют не только на постановку диагноза и тактику лечения конкретного пациента, но и являются основанием для введения противоэпидемических мероприятий, принятия мер организационного характера.

Внедрение системы контроля качества не только способствует соблюдению всех нормативных требований, но повышает достоверность результатов и эффективность работы лаборатории, сводит к минимуму бюджетные траты и упрощает лабораторные процедуры [3]. Лаборатория должна установить индикаторы качества, чтобы отслеживать и оценивать качество выполнения в отношении критических аспектов всех этапов исследования [4].

Цель работы - представить опыт по созданию эффективного и надёжного управления качеством молекулярно-биологических исследований в условиях пандемии на примере федерального бюджетного учреждения здравоохранения.

**Материал и методы.** ФГБУ «Федеральный центр травматологии, ортопедии и эндопротезирования» Минздрава России (г. Чебоксары), далее - Центр, - лидер по артропластике крупных суставов в России (в 2021 г. проведено 8657 оперативных вмешательств), оказывающий медицинскую помощь жителям 55 из 85 субъектов РФ. Клинико-диагностическая лаборатория (КДЛ) Центра наряду с гематологическими, биохимическими, коагулологическими, бактериологическими, общеклиническими, цитологическими исследованиями с 2014 г. проводит исследования методом ПЦР. Если до 2020 г. молекулярно-биологические исследования проводились в основном с целью диагностики инфекций как наиболее грозных осложнений после протезирования крупных суставов, то с началом пандемии COVID-19 основную массу составляют исследования клинического материала на наличие SARS-CoV-2.

На основании распоряжения Правительства Российской Федерации с 14 мая 2020г. Центр был перефилирован в стационар инфекционного профиля для лечения пациентов с новой коронавирусной инфекцией [5]. В таком режиме клиника работала в течение 3 месяцев, затем вернулась к профильной деятельности. Основной задачей при госпитализации пациентов в период работы по профильной деятельности служило недопущение в Центр больных COVID-19, выявление бессимптомных носителей инфекции, максимальное разобщение потоков пациентов на его территории.

В период 2020-2022 гг. в КДЛ Центра ежедневно поступает до 450 образцов биоматериала для детекции РНК SARS-CoV-2 методом ПЦР как из клинических отделений Центра, так и из медицинских организаций города и республики, и до 50 - на обнаружение антигена SARS-CoV-2 ИХА.

ПЦР-исследования проводятся на современных лабораторных анализаторах QuantStudio 5 (Thermo Fisher

Scientific, США) и Rotor-Gene Q (Qiagen GmbH, Германия) с применением аналитических систем «Ампли-Прайм SARS-CoV-2DUO» (ООО «НекстБио» г. Москва), «Изотерм SARS-CoV-2 РНК-скрин» («Generium», Владимирская обл.), «Вектор-ПЦР-2019-nCoV-RG» («БЕК-ТОР», Новосибирская обл.), «Интифика SARS-CoV-2-топо» («Алкор Био», г. Санкт-Петербург), «АмплиСенс CoV-Bat-FL» (г. Москва), «ИМБИАН-SARS-CoV-2-ПЦР» (ООО «Имбиан Лаб», Новосибирская обл.).

Более 90% лабораторных процессов автоматизировано, весь расходный материал, участвующий в лабораторных исследованиях, одноразовый. Работа по диагностике SARS-CoV-2 с первых дней пандемии строится в соответствии с действующими нормативными документами [6-10]. Лаборатория имеет допуск на работу с микроорганизмами I-IV групп патогенности.

В распоряжении специалистов имеется лабораторная информационная система (ЛИС), интегрированная в медицинскую информационную систему (МИС) «Меддиалог» с модулем внутрилабораторного контроля качества, технические возможности для выхода в республиканскую медицинскую информационную сеть (РМИС) и на портал «Госуслуги» ([www.gosuslugi.ru](http://www.gosuslugi.ru)).

Со времени открытия Центра его руководство и коллектив стремились быть признанными как организация, соответствующая мировым стандартам качества [11]. В Центре внедрена система менеджмента качества, соответствующая международному стандарту ISO 9001, разработаны алгоритм процесса «Клинические лабораторные исследования» и карта процесса «Диагностические услуги клиничко-лабораторной диагностики».

Главной целью мероприятий по управлению качеством молекулярно-биологических исследований является не только получение достоверных результатов тестирования в максимально короткие сроки, но и доступность результатов как специалистам клинического звена и противоэпидемиологической службы, так и пациентам. Мероприятия по обеспечению качества ПЦР-исследований начинаются задолго до попадания биоматериала в лабораторию и заключаются в создании эффективной системы управления качеством. Согласно нормативным документам, именно сотрудники лабораторий отвечают за весь процесс производства лабораторного исследования, начиная с назначения врачом необходимого теста, процедуры взятия и транспортировки биоматериала и заканчивая интерпретацией результата и принятием адекватных мер [11].

**Результаты.** Проблемы и трудности, которые испытывали сотрудники лабораторной службы на ранних этапах борьбы с COVID-19, связаны с огромным потоком проб из разных ЛПУ и большим числом ошибок преаналитического этапа, отсутствием достаточного количества обученных сотрудников, дефицитом лабораторного пластика и тест-систем.

Ключевым моментом в системе контроля качества на всех этапах является выделение индикаторов качества, на которые достоверно могут влиять сотрудники лабораторной службы для повышения качества лабораторных исследований. Ценный опыт работы в качестве лаборатории инфекционного стационара и большой опыт обслуживания муниципальных медицинских организаций

позволил сотрудникам КДЛ Центра выработать важнейшие индикаторы качества при проведении молекулярно-биологических исследований (см. таблицу).

Работа по обеспечению качества исследований на преаналитическом этапе началась с разработки инструкции для пациентов по правилам подготовки к взятию назофарингеального мазка и повышения компетентности персонала. Если в начале пандемии взятие биоматериала производилось средним медицинским персоналом отделений, что вело к большому количеству ошибок из-за нарушения техники взятия пробы (отсутствие биоматериала в образце, контаминация из-за применения ножниц и несоблюдения условий стерильности транспортной среды, нарушение техники взятия материала), то вскоре было принято решение проводить взятие проб только специалистами КДЛ. Фельдшер-лаборант, прошедший специальный инструктаж, производит взятие биоматериала с тщательным соблюдением алгоритма взятия назофарингеального мазка (каждый мазок берут с помощью двух разных стерильных зондов со слизистой оболочки нижнего носового хода и ротоглотки, объединяют в пробирку объемом 1,5-2,0 мл с 0,5 мл транспортной среды и исследуют как один образец для повышения чувствительности исследования).

В период 2020-2022 гг. для взятия биоматериала выделено специальное помещение в отдельно стоящем здании, что предотвращало контакт лиц, явившихся для обследования на COVID-19, с посетителями и сотрудниками Центра. Планировка позволяла разделить потоки пациентов (наличие отдельных входов и выходов), выделив кабинет регистрации, кабинет взятия биоматериала.

В КДЛ выработаны критерии отказа в приеме материала на исследование. При поступлении материала фельдшер-лаборант проверяет соответствие информации на контейнере и направлении, состояние проб, отмечает время поступления пробы в лабораторию, каждой пробе присваивается лабораторный номер, замечания вносятся в журнал регистрации дефектов в работе отделений.

Стандартизация процесса транспортировки проб заключается в использовании специального герметичного бокса, время доставки проб в лабораторию из отделений Центра минимально (10-20 мин) благодаря налаженной работе курьеров. Доставленная проба хранится в холодильниках для биологического материала в стандартных условиях до очередной постановки.

Контаминация биоматериала - основная причина ошибок аналитического этапа. Контактная (перекрестная) контаминация возникает при нарушении технологии проведения лабораторных процедур на этапе выделения и внесения образца в реакционную смесь, связана с переносом вирусных частиц из других проб или загрязнённого лабораторного инструментария. Эффективными мерами, снижающими число случаев контаминации, являются следующие мероприятия контроля качества: создание стандартных операционных процедур (СОП) и исполнение его требований, строгое соблюдение правил зонирования этапов ПЦР, наличие герметичного окна для передачи проб из зоны выделения в зону амплификации, использование СИЗ и одноразового лабораторного пластика, регулярный инструктаж персонала по профилактике контаминаций.

**Мероприятия, влияющие на качество лабораторных исследований**

Индикатор качества	Выявляемый дефект	Мероприятия, влияющие на качество	Результат
<b>Преаналитический этап</b>			
Ошибки в подготовке пациента к исследованию	Несоблюдение правил подготовки (приём пищи перед взятием материала, применение антисептических средств)	Разработка памятки для пациентов о правилах подготовки к отбору проб	Снижение числа ложноотрицательных результатов
Дефекты взятия биоматериала	Взятие материала с языка и ротовой полости; Использование ножниц; Взятие материала только из зева или только из носа; Контаминация в процессе взятия	Взятие биоматериала производится только сотрудниками КДЛ; Использование только одноразового лабораторного пластика и зондов; Запрет на применение многоразовых инструментов (ножницы)	Снижение числа отбракованных образцов; Снижение числа ложноотрицательных и ложноположительных образцов
Ошибки в идентификации проб	Неправильная маркировка пробирок с биоматериалом; Отсутствие данных либо неправильные данные о пациенте; Несоответствие данных на направлении и пробирке; Отсутствие направления на исследование; Невозможность прочесть направление	Штрих-кодирование образцов; Использование МИС; Разработка критериев отказа в приёме проб	Снижение числа отбракованных проб; Снижение числа ошибок идентификации пациентов
Нарушение сроков и условий транспортировки биоматериала	Превышение сроков доставки; Транспортировка при неправильной температуре	Использование специального герметичного бокса; Разработка инструкций по транспортировке образцов для иных МО	Снижение числа ложноотрицательных результатов
<b>Аналитический этап</b>			
Дефекты выделения и переноса образцов	Деградация образцов РНК; Перекрестная контаминация проб в процессе переноса и выделения образцов; Тотальная контаминация; Потеря РНК в процессе выделения	Строгое соблюдение температурного режима и технологии проведения исследования; Использование наконечников с фильтрами; Строгий производственный контроль (смыть); Использование аналитических систем с ВКО (внутренний контрольный образец)	Снижение числа ложноположительных и ложноотрицательных результатов
Ошибки процедур аналитического этапа	Контаминация ампликонами; Контроль правильности; Неправильная обработка результатов считывания	Участие в системах межлабораторных сличений	Обеспечение качества проведенного исследования
<b>Постаналитический этап</b>			
Ошибки при регистрации результата	Внесение неверных результатов	Валидация результата врачом лабораторной диагностики	Снижение числа ошибок при выдаче результата
Интерпретация результатов	Неверная интерпретация результата лечащим врачом	Консультирование врачей по аналитической надёжности методов диагностики, принятию мер реагирования	Выбор оптимальных дополнительных методов диагностики Определение сроков и частоты дополнительных исследований
Формирование бланка результата	Отсутствие на бланке информации о методе исследования, примененной аналитической системе	Использование возможностей МИС	Снижение числа ошибок при передаче данных в бланк лабораторного исследования
Время выдачи результата	Увеличение сроков выдачи результатов исследования	Использование возможностей МИС; Использование возможностей РМИС; Личный кабинет пациента; Использование интернет-ресурсов	Доступ врачей всех МО республики к результатам в кратчайшие сроки; Доступ пациента к результатам исследования в личном кабинете (ЛК) на сайте Центра без повторного посещения Центра

Тотальная контаминация является основной проблемой при использовании ПЦР-анализа в лабораторной диагностике. Процесс амплификации носит цепной характер, при его завершении образуется миллиардное количество продуктов - ампликонов, являющихся вторичной матрицей для амплификации. При их разнесении возникает опасность контаминации, образцы РНК попадают в исследуемые пробы из загрязнённого воздуха, с рабочих поверхностей кабинетов, с рук, одежды персонала.

Меры по предотвращению контаминации из воздуха, применяемые в КДЛ Центра: работа только в ламинарном боксе 2А класса, перекрёстное ультрафиолетовое облучение двумя рециркуляторами ДЕЗАР-3 во время амплификации и по завершении работы, одновременный строгий контроль времени работы бактерицидных установок. Для минимизации случаев тотальной контаминации используются тщательная обработка рабочих поверхностей дезинфицирующими средствами до и после этапа амплификации с последующим УФО-обеззараживанием, регулярная смена перчаток оператором, использование только одноразовых наконечников к дозаторам с фильтром. Немаловажным моментом является загрязнение рабочих зон продуктами амплификации, содержащимися в отходах. В лаборатории Центра принято утилизировать отходы после каждой постановки в пакеты класса В с дальнейшей переработкой в собственном автоклаве.

К комплексу мер по предотвращению контаминации относится и производственный лабораторный контроль, охватывающий все этапы движения пробы: ежемесячно берутся смывы из 18 контрольных точек, производится анализ на загрязнение помещений лаборатории продуктами ПЦР. В случае обнаружения в смывах образцов РНК работа в лаборатории прекращается, принимаются меры быстрого реагирования: повторная генеральная уборка поверхностей с последующим смывом до получения отрицательных результатов. Существует практика исследования смывов во внешней лаборатории ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Чувашской Республике - Чувашии».

Отрицательный контрольный образец (ОКО), входящий в большинство тест-систем, позволяет оценить чистоту выделительной части ПЦР и необходим для проверки компонентов реакции на отсутствие в них РНК SARS-CoV-2 вследствие контаминации и исключения учёта ложноположительных результатов.

Важнейшим условием повышения качества работы КДЛ является участие в программах межлабораторных сличительных испытаний. Участвуя во внешних системах оценки качества лабораторных исследований, совершенствуя собственную систему управления качеством в КДЛ, медицинская организация решает вопрос повышения качества предоставляемых медицинских услуг, повышает доверие и конкурентоспособность медицинского учреждения [12].

В России системой внешней оценки качества молекулярно-биологических исследований является Федеральная система внешней оценки качества (ФСВОК), которая с 2020 г. предлагает программу «Выявление РНК SARS-COV-2 методом ПЦР». Несомненным пока-

зателем актуальности и ценности данного ресурса в деле повышения качества молекулярно-биологических исследований является рост числа участников от 68 в 2021 г. до 169 в 2022 г. Абсолютное большинство лабораторий-участниц программы выдают правильный результат контрольного измерения.

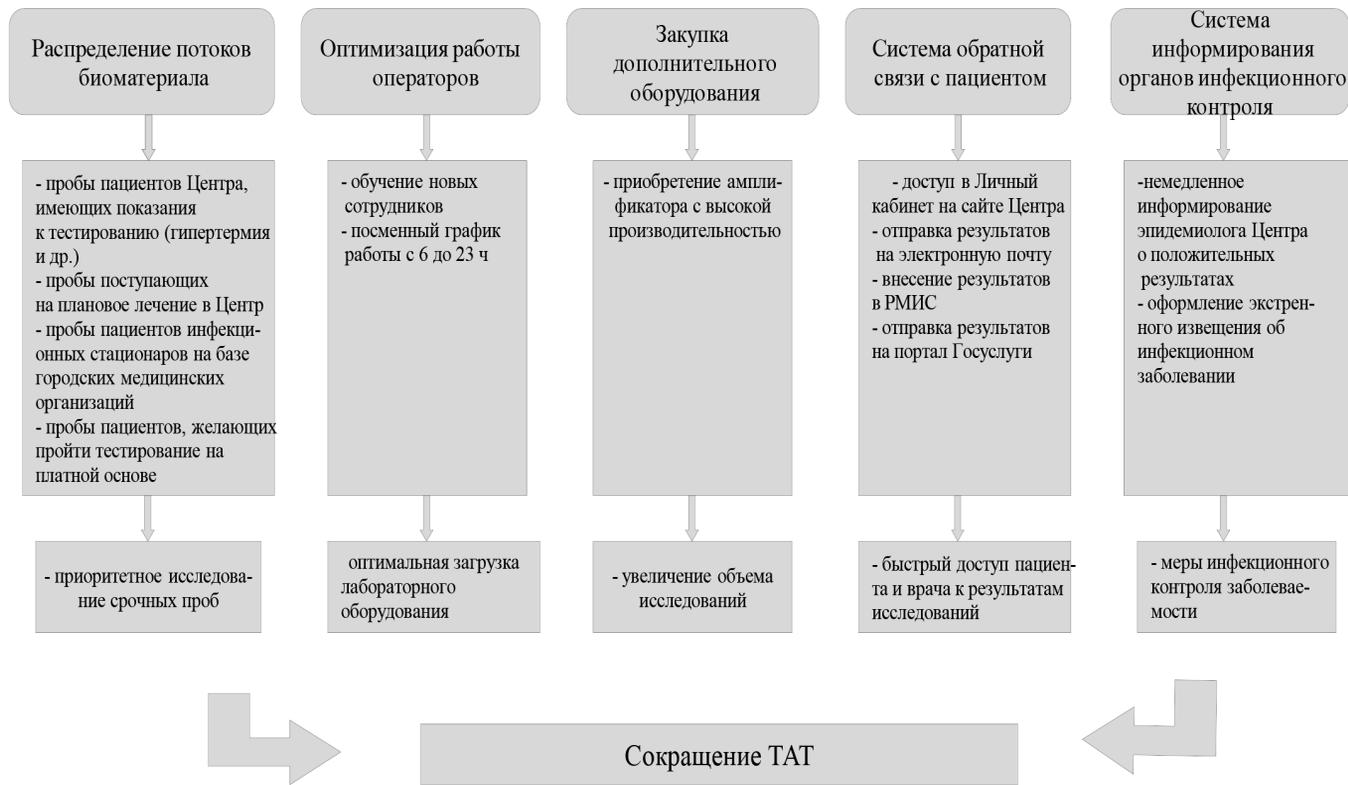
Главной целью мероприятий по управлению качеством на постаналитическом этапе ПЦР-исследований является своевременная выдача результатов тестирования врачу-клиницисту на правильно оформленном бланке с указанием метода, примененной тест-системы и интерпретацией полученного результата. В период пандемии SARS-CoV-2 одним из ключевых критериев качества лабораторных исследований становится временной параметр эффективности лабораторных процессов, охватывающий преаналитический, аналитический и постаналитический этапы - ТАТ (turn around time), или время оборота теста, период времени между двумя специфицированными точками - назначением исследования и выдачей его результата [4].

Увеличение ТАТ для ПЦР-исследований в период массового тестирования ведёт к глобальным последствиям: позднее введение мер эпидемиологического надзора, позднее начало лечения, удлинение сроков пребывания пациентов в стационаре, высокие риски осложнений заболевания и пр. Удлинение времени ожидания результатов ведёт к снижению уровня доверия к лаборатории и к КДЛ медицинской организации. Практика показала, что минимальное ТАТ, наряду с высоким аналитическим уровнем проведённого тестирования, является одним из ключевых моментов, обеспечивающих качество ПЦР-исследования в период пандемии. Оба критерия позволяют обеспечить потребности клиницистов и обеспечить медицинской организации возможность стать конкурентоспособной в плане качественной диагностики.

Мероприятия по снижению ТАТ проводятся на всех этапах лабораторного процесса, имеют целью минимизировать временные потери, носят системный характер. С этой целью в КДЛ Центра проведены следующие мероприятия (см. рисунок).

Закупка дополнительного оборудования (прибор для количественного обнаружения продуктов (ПЦР) в режиме реального времени QuantStudio 5 (ThermoFisherScientific, США)) производительностью 96 тестов за один цикл позволила увеличить объёмы исследований и сократить сроки выдачи результатов.

Использование возможностей ЛИС, интегрированной в МИС, с регистрацией данных пациента в модуле «Электронная медицинская карта», предотвращает возникновение на всех этапах ошибок, связанных с ручным вводом и переносом информации (каждой пробе присваивается уникальный штрих-код), позволяет создать направление при самостоятельном обращении за услугой, контролировать время назначения лечащим врачом, сопоставить результаты исследования с состоянием пациента, сформировать бланк результата исследования с интерпретацией результата. Принятая в нашем Центре индикация строки с положительным результатом тестирования (красным цветом) позволяют врачу-клиницисту в кратчайшие сроки получить



Мероприятия по снижению времени оборота теста TAT (turn around time).

сведения из лаборатории и принять меры экстренного реагирования.

Созданная в Центре система обратной связи в виде личного кабинета на сайте позволяет пациенту в кратчайшие сроки без дополнительного посещения Центра узнать результаты исследования и, при необходимости, получить бумажный вариант. Отправка на электронную почту пациента бланка с результатом тестирования, подтвержденного цифровой электронной подписью специалиста КДЛ, сокращает время ожидания, позволяет за одно посещение Центра получить полный спектр услуг, минимизирует вероятные контакты и вероятность заражения.

Доступ специалистов КДЛ к РМИС обеспечивает внесение результатов исследования в электронные медицинские карты пациентов других медицинских организаций в кратчайшие сроки, что значительно сокращает время ожидания, позволяет врачам первичного звена оперативно использовать результаты тестирования.

Разработанная в Центре система информирования предполагает немедленное направление эпидемиологу Центра сведений обо всех случаях обнаружения вируса SARS-CoV-2, оформление экстренного извещения об инфекционном заболевании с отправкой его в медицинскую организацию, к которой прикреплен пациент. Результаты тестирования вносятся в программу, интегрированную в Госуслуги, пациент имеет доступ к результатам тестирования из любой точки страны.

**Заключение.** Создание и совершенствование системы контроля качества молекулярно-биологических исследований является основополагающей в работе каждой лаборатории. Использование опыта работы ПЦР-лаборатории в условиях пандемии с выделением актуальных критериев, воздействие на которые достоверно ведёт к улучшению качества, позволяет свести к минимуму число ошибок на всех этапах исследований, снизить время оборота теста в лаборатории и сделать её конкурентоспособной в современных реалиях. Сформированная в условиях медицинской организации федерального уровня система контроля качества лабораторной диагностики обеспечивает эффективную работу клинико-диагностической лаборатории, позволяя оперативно реагировать на вызовы времени и получать результаты на высоком аналитическом уровне в минимально короткие сроки.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» Версия 15 (22.02.2022). Минздрав Российской Федерации.
2. Волынкина А.С., Рязанова А.Г., Русанова Д.В., Куличенко А.Н. Проблемы ДНК (РНК)-контаминации в лаборатории при проведении диагностики COVID-19 методом ПЦР. *Здоровье населения и среда обитания*. 2021; 29(7):76-81.
3. Колупаев В.Е. Контроль аналитического качества молекулярно-генетических исследований в современной лаборатории в условиях пандемии COVID-19. *Справочник заведующего КДЛ*. 2021;10:27-32.

ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

4. ГОСТ Р ИСО 15189-2015 «Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетенции».
5. Николаев Н.С., Андреева В.Э., Белова Н.В., Карпукхин А.С. Опыт работы Федерального центра травматолого-ортопедического профиля в условиях распространения новой коронавирусной инфекции COVID-19. *Вестник Росздравнадзора*. 2020;5(2):18-25.
6. Временные рекомендации ВОЗ «Диагностическое тестирование для определения вируса SARS-CoV-2» от 11.09.2020.
7. Методические рекомендации «Лабораторная диагностика COVID-19». МР 3.1.-0169-20.
8. Методические указания МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» [дата обращения 29.08.2022; [https://www.rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT\\_ID=4801](https://www.rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=4801)].
9. Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
10. ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».
11. Николаев Н.С., Назарова В.В., Добровольская Н.Ю., Орлова А.В., Пчелова Н.Н. Управление качеством в клинико-диагностической лаборатории в условиях ФГБУ «Федеральный центр травматологии, ортопедии и эндопротезирования» Минздрава России (г. Чебоксары). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014;10:59-64.
12. Николаев Н.С., Назарова В.В., Добровольская Н.Ю., Андреева В.Э., Никифорова В.И. Опыт участия клинико-диагностической лаборатории во внешних системах контроля качества на примере Федерального центра травматологии, ортопедии и эндопротезирования (ФГБУ «Федеральный центр травматологии, ортопедии и эндопротезирования» Минздрава РФ, г. Чебоксары, Россия; ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет им. И.Н.Ульянова», г. Чебоксары, Россия). *Менеджер здравоохранения*. 2017;(9): 51-8.
2. Volynkina A.S., Ryazanova A.G., Rusanova D.V., Kulichenko A.N. Problems of DNA (RNA) contamination in the laboratory during the diagnosis of COVID-19 by PCR. *Zdorov'ye naseleniya i sreda obitaniya*. 2021; 29(7):76-81. (in Russian)
3. Kolupaev V.E. Analytical quality control of molecular genetic studies in a modern laboratory during the COVID-19 pandemic. *Spravochnik zaveduyushchego KDL*. 2021;10:27-32. (in Russian)
4. GOST R ISO 15189-2015 «Medical laboratories. Particular requirements for quality and competence». (in Russian)
5. Nikolaev N.S., Andreeva V.E., Belova N.V., Karpukhin A.S. Experience of the federal center of traumatological and orthopedic profile in the context of the spread of a new coronavirus infection COVID-19. *Vestnik Roszdravnadzora*. 2020;5(2):18-25. (in Russian)
6. Interim guidelines «Diagnostic testing to identify the SARS-CoV-2 virus» (11.09.2020). World Health Organization. (in Russian)
7. Guidelines «Laboratory diagnostics of COVID-19». МР 3.1.-0169-20. (in Russian)
8. Guidelines MU 1.3.2569-09 «Organization of laboratory work using nucleic acid amplification methods when working with examination, detection of microorganisms of pathogenicity groups I-IV» [date of access 29.08.2022; [https://www.rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT\\_ID=4801](https://www.rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=4801)]. (in Russian)
9. Sanitary and epidemiological rules SP 1.3.2322-08 «Safety of working with microorganisms of III - IV groups of pathogenicity (danger) and pathogens of parasitic diseases». (in Russian)
10. GOST R 52905-2007 «Medical Laboratories. Safety requirements». (in Russian)
11. Nikolaev N.S., Nazarova V.V., Dobrovol'skaya N.Yu., Orlova A.V., Pchelova N.N. Quality management in the clinical diagnostic laboratory in the conditions of the Federal Center for Traumatology, Orthopedics and Arthroplasty of the Ministry of Health of Russia (Cheboksary). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2014;10:59-64. (in Russian)
12. Nikolaev N.S., Nazarova V.V., Dobrovol'skaya N.Yu., Andreeva V.E., Nikiforova V.I. Experience of participation of a clinical diagnostic laboratory in external quality control systems on the example of the Federal Center for Traumatology, Orthopedics and Arthroplasty (Federal State Budgetary Institution «Federal Center for Traumatology, Orthopedics and Arthroplasty» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Cheboksary, Russia; Federal State Budgetary Educational Institution higher professional education «Chuvash State University named after I.N. Ulyanov», Cheboksary, Russia). *Menedzher zdravookhraneniya*. 2017;(9): 51-8. (in Russian)

REFERENCES

1. Interim guidelines «Prevention, diagnosis and treatment of new coronavirus infection (COVID-19)» Version 9 (10/26/2020). Ministry of Health of the Russian Federation. (in Russian)