

ООО Издательская группа
«Медиа Сфера»

Акционерное общество
"ЭКОлаб"

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

Д КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Том 69
10 • 2024

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

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

ОКТАБРЬ

Журнал основан в январе 1955 г.

Учредители:

ООО Издательская группа
«Медиа Сфера» (печатное издание)
127238, г. Москва, Дмитровское ш., 46
кор. 2;

Акционерное общество "ЭКОлаб"
(электронное издание)
142530, Московская область,
г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1

Издатель:
Акционерное общество "ЭКОлаб"

Телефон редакции:
8-916-201-80-47

Зав. редакцией:
Л.А. Шанкина
E-mail: clin.lab@yandex.ru

Технический редактор:
Ч.А. Сафаров
E-mail: klinlab@internet.ru

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

Сдано в набор 19.09.2024.
Подписано в печать 01.10.2024

Формат 60 × 88%
Печать офсетная
Печ. л. 8,00
Уч.-изд. л. 8,95

WWW страница: <https://clinlabdia.ru/>

ПИ № ФС77-37760 от 07.10.2009 г.
ЭЛ № ФС77-80929 от 21.04.2021 г.

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

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

Индекс Ф81645 — для подписчиков
Подписка через Интернет:
[https://www.pressa-rf.ru/cat/1/edition/e81645/Под-
писка_на_электронную_версию:](https://www.pressa-rf.ru/cat/1/edition/e81645/Подписка_на_электронную_версию)
[https://elibrary.ru/title_about_new.asp?id=7849;](https://elibrary.ru/title_about_new.asp?id=7849)
<https://www.pressa-rf.ru/rucont/edition/331548/>

ISSN: 0869-2084 (Print)
ISSN: 2412-1320 (Online)

Клин. лаб. диагностика. 2024. Том 69. № 10.
492-560

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР:

А.Ю. МИРОНОВ, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА:

Харсеева Г.Г., д.м.н., профессор, (Ростов-на-Дону, Россия);

НАУЧНЫЙ РЕДАКТОР:

Чеботарь И.В., д.м.н. (Москва, Россия);

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ:

Андреева И.И., д.м.н., доцент (Ростов-на-Дону, Россия);

ЧЛЕНЫ РЕДАКЦИОННОЙ КОЛЛЕГИИ:

Гильманов А.Ж., д.м.н., профессор (Уфа, Россия);
Добровольский А.Б., д.б.н., профессор (Москва, Россия);
Земсков В.М., д.м.н., профессор (Москва, Россия)
Иванов А.А., д.м.н., профессор (Москва, Россия);
Ипполитов Е.В., д.м.н., профессор (Москва, Россия);
Кочетов А.Г., д.м.н., профессор (Москва, Россия);
Марданлы С.Г., д.м.н., профессор (Электрогорск, Россия);
Тотолян А.А., академик РАН, д.м.н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

Арипов А.Н., д.м.н., профессор (Ташкент, Узбекистан);
Вавилова Т.В., д.м.н., профессор (Санкт-Петербург, Россия);
Горбунов В.А., к.м.н., доцент (Минск, Беларусь);
Долгих Т.И., д.м.н., профессор (Омск, Россия);
Ельчанинова С.А., д.м.н., профессор (Барнаул, Россия);
Керимов С.Г., д.м.н., профессор (Баку, Азербайджан);
Кушлинский Н.Е., академик РАН, д.м.н., профессор (Москва, Россия);
Маматкулов И.Х., д.м.н., профессор (Ташкент, Узбекистан);
Осман Халил Ареф, к.б.н. (Хомс, Сирия)
Сергеев А.Ю., д.м.н., профессор (Томск, Россия);
Талыбов Т.Г., академик НАН, д.б.н., профессор (Нахчыван, Азербайджан);
Тартаковский И.С., д.б.н., профессор (Москва, Россия);
Эмануэль В.Л., д.м.н., профессор (Санкт-Петербург, Россия);
Яровая Г.А., д.б.н., профессор (Москва, Россия)

LLC Publishing Group
"Media Sphera"

Joint Stock Company
"EKOLab"

D KLINICHESKAYA LABORATORNAYA iagnostika

Volume 69
10 • 2024

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

OCTOBER

The Journal is founded in 1955

Founders:

LLC "Publishing Group "Media Sphera"
(print edition)

127238, Moscow, Dmitrovskoe sh., 46 k.
b. 2;

Joint Stock Company "EKOLab"
(electronic edition)

142530, Moscow region, Elektrogorsk,
St. Budyonnogo, 1

Publisher:

Joint Stock Company "EKOLab"

Editorial office phone:
8-916-201-80-47,

Managing editor:

L.A. Shankina
E-mail: clin.lab@yandex.ru

Technical editor:

Ch.A. Safarov
E-mail: klinlab@internet.ru

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

WWW страница: <https://clinlabdia.ru/>

E-mail: klinlab@internet.ru

PI No. FS77-37760 dated 10/07/2009

EL No. FS77-80929 dated 04/21/2021

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 Rus-
sian index of scientific quotation (RiNZ) and in fol-
lowing I&R editions: Abstracts of Micology, Adis
International Ltd Reactions Weekly, Chemical
Abstracts (print), Chemical Titles, EBCOhost Bio-
logical Abstracts (Online), Elsevier BV EMBASE,
Elsevier BV Scopus, Excerpta Medica, Abstract
Journals, Index Medicus, Index to Dental Litera-
ture, OCLC Article First, Reactions Weekly (Print),
Thomson Reuters Biological Abstracts (Online),
Thomson Reuters BIOSIS Previews, VINITI RAN
Referativnyi Zhurnal, Ulrich's International Periodi-
cals Directory

ISSN: 0869-2084 (Print)
ISSN: 2412-1320 (Online)

EDITOR-IN-CHIEF:

A.Yu. MIRONOV, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Moscow, Russia*)

DEPUTIE EDITOR-IN-CHIEF:

Galina G. Kharseeva, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Rostov-on-Don, Russia*);

SCIENTIFIC EDITOR:

Igor V. Chebotar, Dr. Sci. (Med.) (*Moscow, Russia*);

EXECUTIVE SECRETARY:

Irina I. Andreeva, Dr. Sci. (Med.), Associate Professor (*Rostov-on-Don, Russia*);

EDITORIAL BOARD MEMBERS:

Aleksandr Zh. Gilmanov, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Ufa, Russia*);

Anatoliy B. Dobrovolsky, Dr. Sci. (Biol.), Professor (*Moscow, Russia*);

Vladimir M. Zemskov, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Moscow, Russia*);

Evgeny V. Ippolitov, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Moscow, Russia*);

Aleksey A. Ivanov, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Moscow, Russia*);

Anatoliy G. Kochetov, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Moscow, Russia*);

Seifaddin G. Mardanly, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Elektrogorsk, Russia*);

Areg A. Totolian, the RAS Academician, Dr. Sci. (Med.), Professor (*St. Petersburg, Russia*)

EDITORIAL COUNCIL MEMBERS:

Abdumalik N. Aripov, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Tashkent, Uzbekistan*);

Tatiana V. Vavilova, Dr. Sci. (Med.), Professor (*St. Petersburg, Russia*);

Vladimir A. Gorbunov, Cand. Sci. (Med.), Associate Professor (*Minsk, Belarus*);

Tatiana I. Dolgikh, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Omsk, Russia*);

Svetlana A. Elchaninova, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Barnaul, Russia*);

Sanan G. Kerimov, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Baku, Azerbaijan*);

Nikolay E. Kushlinskii, the RAS Academician, Dr. Sci. (Med.), Professor
(*Moscow, Russia*);

Ibrokhim Kh. Mamatkulov, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Tashkent, Uzbekistan*);

Osman Khalil Aref, Cand. Sci. (Biol.), (*Homs, Syria*)

Aleksey Yu. Sergeev, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Tomsk, Russia*);

Tariel G. Talybov, the NAN Academician, Dr. Sci. (Biol.), Professor (*Nakh-
chivan, Azerbaijan*);

Igor S. Tartakovskiy, Dr. Sci. (Biol.), Professor (*Moscow, Russia*);

Vladimir L. Emanuel, Dr. Sci. (Med.), Professor (*St. Petersburg, Russia*);

Galina A. Yarovaya, Dr. Sci. (Biol.), Professor (*Moscow, Russia*)

СОДЕРЖАНИЕ

БИОХИМИЯ

- Алиева А.М., Байкова И.Е., Султангалиева А.Б., Котикова И.А., Рахаев А.М., Никитин И.Г.*
Lox-1 в роли биологического маркера при атеросклерозе (обзор литературы) 496

ГЕМАТОЛОГИЯ

- Суховольский В.Г., Ковалев А.В., Арджевнишвили И.В., Горбенко А.С., Столяр М.А., Бахтина В.И., Ольховский И.А.*
Использование теории фазовых переходов второго рода в анализе возрастной и гендерной зависимости возникновения мутации *V617F/JAK2*: миелопролиферативные новообразования и клональный гемопоэз неопределенного потенциала 504

ИММУНОЛОГИЯ

- Костинов А.М., Конищева А.Ю., Протасов А.Д., Костинов М.П., Ястребова Н.Е., Харсеева Г.Г., Полищук В.Б., Андреева Н.П.*
Лабораторные маркёры врождённого иммунитета, как показатели эффективности вакцинации ПКВ13 больных с бронхиальной астмой. 513

- Ротанов С.В., Акиншина Ю.А. Гашенко Т.Ю.*
Технология определения карбапенемаз у патогенов человека иммунохроматографическим методом 520

- Кузьмич Е. В., Павлова И. Е., Хамаганова Е. Г., Кузьминова Е. П., Кудинова Э. Е., Бубнова Л. Н.*
Применение программы NhaploStats для прогнозирования HLA-генотипа 530

- Ротанов С.В., Марданлы С.Г., Акиншина Ю.А., Марданлы А.Г.*
Дифференцированное качественное определение у человека антигенов коронавируса и вирусов гриппа А и В на основе технологии иммунохроматографического анализа 536

МИКРОБИОЛОГИЯ

- Борисова О.Ю., Андриевская И.Ю., Гадуа Н.Т., Пименова А.С., Чагина И.А., Миронов А.Ю., Кафарская Л.И.*
Анализ лабораторной диагностики коклюшной инфекции в России в 2023 году 548

- Теслова О.Е., Муталинова Н.Е., Рудакова С.А., Кузьменко Ю.Ф., Рудаков Н.В.*
Анализ геновидовой структуры заболеваний населения иксодовыми клещевыми боррелиозами с использованием иммуноблоттинга 456

ВНИМАНИЮ АВТОРОВ И ЧИТАТЕЛЕЙ!

Журнал «Клиническая лабораторная диагностика» входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы результаты диссертаций на соискание учёной степени доктора и кандидата наук

CONTENTS

BIOCHEMISTRY

- Alieva A.M., Baykova I.E., Sultangalieva A.B., Kotikova I.A., Rakhaev A.M., Nikitin I.G.*
Lox-1 as a biological marker in atherosclerosis (review of literature) 496

HEMATOLOGY

- Soukhovolsky V.G., Kovalev A.V., Ardzhevnishvili I.V., Gorbenko A.S., Stolyar M.A., Bakhtina V.I., Olkhovsky I.A.*
Using the theory of phase transitions of the second type in the analysis of age and gender dependence of the occurrence of the V617F JAK2 mutation: myeloproliferative neoplasms and clonal hematopoiesis of uncertain potential. 504

IMMUNOLOGY

- Kostinov A.M., Konishcheva A.Yu., Protasov A.D., Kostinov M.P., Yastrebova N.E., Kharseeva G.G., Polishchuk V.B., Andreeva N.P.*
Laboratory markers of innate immunity as indicators of the effectiveness of PCV13 vaccination in patients with bronchial asthma 513

- Rotanov S.V., Akinshina Yu.A., Gashenko T.Yu.*
Technology for determining carbapenemases in human pathogens using the immunochromatographic method. 520

- Kuzmich E.V., Pavlova I.E., Khamaganova E.G., Kuzminova E.P., Kudinova E.E., Bubnova L.N.*
Application of the Haplostats program for HLA-genotype prediction. 530

- Rotanov S.V., Mardanly S.G., Akinshina Yu.A. Mardanly A.G.*
Differentiated qualitative determination of coronavirus and influenza A and B virus antigens in humans based on immunochromatographic analysis technology 536

MICROBIOLOGY

- Borisova O. Yu., Andrievskaya I. Yu., Gadua N.T., Pimenova A.S., Chagina I.A., Mironov A. Yu., Kafarskaya L.I.*
Analysis of laboratory diagnostics of pertussis infection in Russia in 2023 548

- Teslova O.E., Mutalinova N.E., Rudakova S.A., Kuzmenko J.F., Rudakov N.V.*
Analysis of the gene species structure of ixodid tick-borne borreliosis diseases using immunoblotting. 556

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Алиева А.М.¹, Байкова И.Е.¹, Султангалиева А.Б.¹, Котикова И.А.¹, Рахаев А.М.², Никитин И.Г.¹

LOX-1 В РОЛИ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАРКЕРА ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

¹ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава РФ, 117997, Москва, Россия;

²ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х.М. Бербекова» Министерства науки и высшего образования России, 360004, Нальчик, Россия

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) представляют собой глобальную медицинскую, социальную и экономическую проблему. В настоящее время продолжается поиск и изучение новых биологических маркеров, способных обеспечить раннюю диагностику ССЗ, служить лабораторным инструментом оценки эффективности проводимого лечения или использоваться в качестве прогностических маркеров и критериев стратификации риска. Интерес ученых сосредоточен на изучении лектиноподобного рецептора 1-го типа для окисленных липопротеинов низкой плотности (ox-LDL) (LOX-1) в качестве диагностического и прогностического маркера при ССЗ. В этом обзоре освещены последние научные открытия, связанные с LOX-1, его лигандами и их ролью при атеросклерозе. Также описаны результаты актуальных фундаментальных исследований, очерчена их ценность и обсужден потенциал LOX-1 в качестве новой мишени для диагностики и лечения атеросклеротических ССЗ. Получены убедительные доказательства того, что ox-LDL и LOX-1 являются ключевыми игроками в патогенезе атеросклероза. Согласно данным проведенных клинических исследований, LOX-1 является перспективной молекулой, обладающей диагностическим, прогностическим и лечебным потенциалом при атеросклеротических ССЗ.

Ключевые слова: сердечно-сосудистые заболевания; атеросклероз; ишемическая болезнь сердца; биологический маркер; LOX-1

Для цитирования: Алиева А.М., Байкова И.Е., Султангалиева А.Б., Котикова И.А., Рахаев А.М., Никитин И.Г. Lox-1 в роли биологического маркера при атеросклерозе (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69(10): 496-503.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-10-496-503>

Для корреспонденции: Алиева Амина Магомедовна, канд. мед. наук, доц. каф. госпитальной терапии им. академика Г.И. Сторожакова; e-mail: amisha_alieva@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 31.08.2024

Принята к печати 12.09.2024

Опубликовано 01.10.2024

Alieva A.M.¹, Baykova I.E.¹, Sultangalieva A.B.¹, Kotikova I.A.¹, Rakhaev A.M.², Nikitin I.G.¹

LOX-1 AS A BIOLOGICAL MARKER IN ATHEROSCLEROSIS (LITERATURE REVIEW)

¹Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov of the Ministry of Health of Russia, 117997, Moscow, Russia;

²Kabardino-Balkarian State University named after Kh. M. Berbekov of the Ministry of Science and Higher Education of Russia, 360004, Nalchik, Russia

Cardiovascular disease (CVD) is a global health, social and economic problem. Currently, there is an active search for new biological markers and therapeutic targets in order to develop effective approaches to risk stratification and secondary prevention of cardiovascular pathology. Of particular interest to researchers is retinol binding protein 4 (RBP4). The purpose of this article is to review studies examining the role of RBP4 as a diagnostic and prognostic laboratory marker in CVD. According to the results of the studies, RBP4 is a molecule with promising diagnostic and prognostic potential in CVD.

Key words: cardiovascular diseases; coronary heart disease; laboratory biological marker; retinol binding protein 4

For citation: Alieva A.M., Baykova I.E., Sultangalieva A.B., Kotikova I.A., Rakhaev A.M., Nikitin I.G. Lox-1 as a biological marker in atherosclerosis (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69(10): 496-503 (in Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-10-496-503>

For correspondence: Alieva Amina Magomedovna, M.D., Associate Professor of the department of Hospital Therapy named after academician G.I. Storozhakov; e-mail: amisha_alieva@mail.ru

Information about authors:

Alieva A.M., <https://orcid.org/0000-0001-5416-8579>;
Baykova I.E., <https://orcid.org/0000-0003-0886-6290>;
Sultangalieva A.B., <https://orcid.org/0009-0008-4194-8486>;
Kotikova I.A., <https://orcid.org/0000-0001-5352-8499>;
Rakhaev A.M., <https://orcid.org/0000-0001-9601-1174>;
Nikitin I.G., <https://orcid.org/0000-0003-1699-0881>.

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

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

Received 00.00.2024

Accepted 12.09.2024

Published 00.10.2024

Введение. Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются основной причиной заболеваемости и смертности как в развивающихся, так и в развитых странах мира [1, 2]. В 2016 году ССЗ привели к смерти 17,9 миллионов человек по всему миру (31% всех смертей), число заболевших ССЗ увеличилось с 257 миллионов в 1990 году до 550 миллионов в 2019 году [1, 2]. Ишемическая болезнь сердца (ИБС) занимает ведущее место среди ССЗ [1-3]. Основной причиной ИБС является атеросклероз, который часто протекает без симптомов на ранних стадиях [3]. Опасность ИБС заключается в том, что у половины пациентов она начинается с инфаркта миокарда (ИМ) или даже внезапной сердечной смерти [3].

Одной из важных задач кардиологии является поиск и изучение новых биологических маркеров для ранней диагностики ССЗ, оценки эффективности лечения, прогнозирования неблагоприятных клинических исходов и определения риска [4-6]. Врачи широко применяют кардиоспецифические маркеры, такие как мозговой натрийуретический пептид (BNP), его предшественник (proBNP) и высокочувствительные тропонины (hsTn), в то же время существует большое число других биомаркеров, которые гипотетически могли бы составить конкуренцию традиционным, но доказательств для их использования недостаточно [4-6]. В настоящее время интерес ученых сосредоточен на изучении лектиноподобного рецептора 1-го типа для окисленных липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) (ox-LDL) (LOX-1) в качестве диагностического и прогностического биомаркера при сердечно-сосудистой патологии [7-9]. LOX-1 представляет собой трансмембранный гликопротеин, который связывает и интернализирует ox-LDL [7-9]. LOX-1 является основным рецептором для ox-LDL, ключевой молекулы в патогенезе атеросклероза [7-9]. Базальная экспрессия LOX-1 низкая, но индуцируется под влиянием провоспалительных и прооксидативных стимулов в эндотелиальных клетках сосудов, сосудистых гладкомышечных клетках (СГМК), макрофагах, тромбоцитах и кардиомиоцитах [8-10]. Исследования *in vitro* и *in vivo* предоставили убедительные доказательства того, что LOX-1 способствует эндотелиальной дисфункции и атерогенезу, индуцированному ox-LDL [7-12].

Цель представленного обзора литературы – анализ актуальных экспериментальных и клинических исследований, посвященных изучению LOX-1 в качестве диагностического и прогностического маркера при ССЗ.

Методология поиска источников. В статье представлен обзор актуальных публикаций. Мы провели

анализ литературных источников, включавший все релевантные публикации до 27.07.2024 г., в базах данных PubMed, РИНЦ, MedLine, Google Scholar, Science Direct. При поиске статей использовали следующие ключевые слова: биологические маркеры, сердечно-сосудистые заболевания, лектиноподобный рецептор 1-го типа для окисленных липопротеинов низкой плотности, biological markers, cardiovascular diseases, LOX-1, OLR1, CLEC8A, SCARE1, oxidized low-density lipoprotein receptor 1, C-type lectin domain family 8 member A, lectin-like oxidized LDL receptor 1, lectin-type oxidized LDL receptor 1. В обзор включено 50 источников: актуальные экспериментальные, лабораторные, клинические исследования и обзоры.

Биологические и лабораторные аспекты LOX-1.

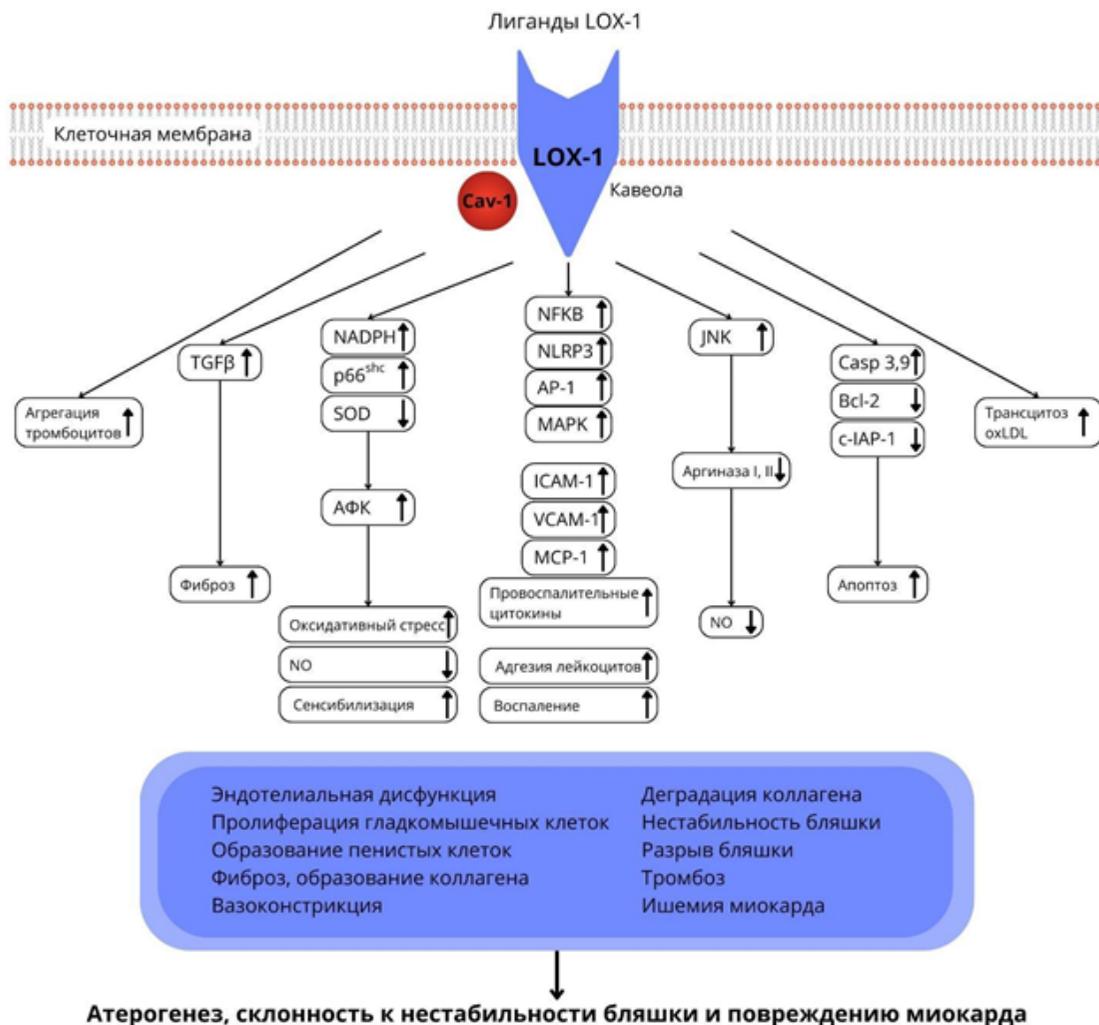
Лектиноподобный рецептор 1-го типа для окисленных липопротеинов низкой плотности (LOX-1, OLR1, CLEC8A, SCARE1, oxidized low-density lipoprotein receptor 1, C-type lectin domain family 8 member A, lectin-like oxidized LDL receptor 1, lectin-type oxidized LDL receptor 1) представляет собой трансмембранный гликопротеин с молекулярной массой 50 кДа; его структура высоко консервативна у всех видов млекопитающих [5]. LOX-1 относится к суперсемейству лектинов С-типа и состоит из 273 аминокислот [6]. LOX-1 включает четыре домена: короткий N-концевой цитоплазматический домен, трансмембранный домен, шейный домен и лектин-подобный внеклеточный С-концевой домен CTLD [4, 5]. CTLD, соединяясь с ox-LDL, образует дисульфид-связанный сердцевидный гомодимер и создает более крупные функциональные олигомеры за счет нековалентного взаимодействия [7-9]. LOX-1 экспрессируется в макрофагах, СГМК, кардиомиоцитах, тромбоцитах и фибробластах [8, 9]. LOX-1 кодируется геном OLR1, расположенным в области p12.3-p13 на коротком плече хромосомы 12 [7].

Экспрессия LOX-1 индуцируется фактором некроза опухоли альфа (TNF- α), интерлейкином (IL)-1, IL-6, интерфероном гамма (IFN- γ), ангиотензином II (Ang II), эндотелином-1 (ET-1), С-реактивным белком (CRP), липополисахаридами (ЛПС), модифицированными липопротеидами (ЛП), высокой концентрацией глюкозы, гомоцистеином и свободными радикалами [9]. LOX-1 принимает участие в трансцитозе ox-LDL, приводящем к трансформации макрофагов в пенные клетки и пролиферации СГМК [9].

Связывание лиганда с LOX-1 стимулирует различные нисходящие сигнальные пути (см. рисунок) [13]. Связывание ox-LDL с LOX-1 стимулирует RhoA (семей-

ство клеточных сигнальных белков, «малых» G-белков, относящихся к суперсемейству Ras)-зависимое подавление эндотелиальной синтетазы оксида азота (eNos) и Rac (внутриклеточный белок из суперсемейства GTPases (большое семейство ферментов гидролаз, которые связывают и гидролизуют гуанозинтрифосфат), относится к «малым» G-белкам)-опосредованную активацию никотинамид-β-аденин динуклеотида фосфата (NADPH) и продукцию активных форм кислорода (АФК) [13]. Активация LOX-1 увеличивает фосфорилирование p66Shc (одна из изоформ адаптерного белка SHC1, участвующая в регуляции клеточного уровня АФК, индукции апоптоза и продолжительности жизни), что приводит к увеличению окислительного стресса и выработке АФК [13]. Супероксид является мощным поглотителем оксида азота (NO), который необходим для NO-опосредованной вазодилатации [13]. Активированный LOX-1 стимулирует JNK C- (Jun N-концевая

киназа)-зависимую активацию аргиназы-I (ARG-I), которая подавляет L-аргинин, еще больше снижая доступность NO [13]. Активация LOX-1 также стимулирует воспалительные пути, моделируя активность ядерного фактора «каппа-би» (NF-κB), активирующего белка-1 (AP-1) и Nod-подобные рецепторы (класс цитоплазматических клеточных рецепторов, относящихся к так называемым образраспознающим рецепторам), криопирин (NLRP3), что приводит к увеличению продукции IL-1β и усилению воспалительной реакции [13]. Все это в свою очередь стимулирует экспрессию LOX-1, что приводит к дальнейшему усилению передачи сигналов LOX-1 [13]. Дополнительные сигнальные пути, индуцированные активацией LOX-1, включают митоген-активируемую протеинкиназу (MAPK), протеинкиназу C, октамер-связывающий белок-1 (Oct-1) и PI3K (фосфоинозитид-3-киназа)/Akt (протеинкиназа В альфа) [13].



Сигнальные пути LOX-1.

АФК – активные формы кислорода; NO – оксид азота; ox-LDL – окисленные липопротеины низкой плотности; LOX-1 – лектиноподобный рецептор 1-го типа для окисленных липопротеинов низкой плотности;

NFκB – ядерный фактор «каппа-би»; NLRP3 – криопирин; AP-1 – активирующий белок-1; MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа; ICAM-1 – молекула межклеточной адгезии 1; VCAM-1 – васкулярная молекула

клеточной адгезии 1; NADPH – никотинамид-β-аденин динуклеотида фосфат; p66Shc – одна из изоформ адаптерного белка SHC1, участвующая в регуляции клеточного уровня АФК, индукции апоптоза и продолжительности жизни; SOD – супероксиддисмутаза; MCP-1 – моноцитарный хемотаксический белок 1; TGFβ – трансформирующий фактор роста бета; Casp – каспаза; Bcl-2 – регулятор апоптоза; c-IAP – клеточные ингибиторы белков апоптоза; JNK – N-концевая киназа c-Jun.

В нашей стране для определения уровней LOX-1 используют набор RayBio Human LOX-1 ELISA Kit (США), предназначенный для количественного определения LOX-1 в образцах сыворотки, плазмы и супернатанта клеточных культур человека методом иммуноферментного анализа (ИФА). Диапазон измерения: 2-500 пг/мл; чувствительность: 2 пг/мл.

LOX-1 и атеросклероз: данные экспериментальных исследований. Доказано, что LOX-1 гиперэкспрессируется при атеросклеротических поражениях [7-9]. Одним из первых K. Inoue и соавторы [14] показали гиперэкспрессию LOX-1 при атеросклерозе у грызунов. Ox-LDL, который распознается и функционирует как лиганд LOX-1, индуцирует пролиферацию и кальцификацию СГМК [13].

Согласно данным D. Schaeffer и соавт. [15], LOX-1 индуцирует несколько сигнальных путей, что приводит к активации протеинкиназ, транскрипционных факторов, регуляции генов апоптоза. LOX-1, по крайней мере, частично ответственен за ингибирующее действие ox-LDL на миграцию макрофагов, и в этом процессе участвуют кальпаин (CAPN1)-1 и -2 [16]. H. Li и соавт. [17] продемонстрировали, что недостаточность 2-подобного ядерного фактора эритроидного происхождения 2 (Nrf2) связана с уменьшением выраженности атеросклероза и может подавить патологический процесс за счет притупления LOX-1-опосредованной пролиферации и миграции СГМК. Согласно данным R. Catar и соавт. [18], в артериальных эндотелиальных клетках ox-LDL сигнализируют главным образом через LOX-1 и задействует киназы ERK1/2 и p38, AP-1, NF-κB.

G. Cimmino и соавторы [19] установили, что ox-LDL индуцируют функциональную экспрессию ТФ (функциональный тканевой фактор в Т-лимфоцитах) *in vitro* посредством взаимодействия с LOX-1. Атеросклеротические бляшки сонных артерий человека содержат CD3+/CD8+ клетки, которые экспрессируют как ТФ, так и LOX-1 [19]. Гиперэкспрессия кавеолина-1 (Cav-1) приводит к усилению атеросклеротического поражения; ось ox-LDL/LOX-1 реципрокно потенцирует экспрессию кавеолина-1 [13]. Электроотрицательный липопротеин низкой плотности (ЛПНП-) способствует дифференцировке моноцитов человека в провоспалительные макрофаги M1 через LOX-1-зависимый путь [20]. Дефицит LOX-1, обусловленный аденоассоциированным вирусом (AAV), уменьшал выраженность атеросклероза у мышей с нокаутом LKB1 (печеночная киназа B1) [21]. LOX-1 усиливает активность инфламмосомы NLRP3 и продукцию АФК в активных макрофагах [22]. Активированный LOX-1 ингибирует кальпаин-1 (CAPN1), повышает концентрацию ионизированного кальция (Ca²⁺), нарушает миграцию макрофагов при атеросклеротических поражениях [23]. Активация ox-LDL/LOX-1 и усиление NADPH-оксидазы

может привести к увеличению продукции и активации митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК) и NF-κB, которые в последующем повышают выработку АФК и снижают выработку NO [9]. У мышей апополипротеин E (ApoE)-/- при участии LOX-1, никотинамидадениндинуклеотидфосфатоксидаза (NOX) 1 и NOX2 развивается эндотелиальная дисфункция в аорте из-за повышенного окислительного стресса [24].

ЛПНП, окисленные миелопероксидазой (Mox-LDL), увеличивают экспрессию LOX-1 в эндотелиальных клетках аорты человека (НАЕС), усиливая воспаление и одновременно уменьшая тубулогенез в клетках [25]. Mox-LDL способствует дисфункции эндотелия через LOX-1 [25]. LOX-1 может индуцировать повышение регуляции проапоптотического Bcl-2-ассоциированного X-белка (Bax) [9]. В уязвимых каротидных бляшках отмечено большое количество макрофагов, усиленная экспрессия матриксной металлопротеиназы 9 (MMP 9) и LOX-1 [26].

TM6SF2, преимущественно экспрессирующийся в печени и кишечнике, тесно связан с липидным обменом. T. Li и соавт. [27] продемонстрировали присутствие TM6SF2 в атеросклеротических бляшках человека; TM6SF2 снижает накопление липидов в стимулированных ox-LDL СГМК, вероятно, за счет регуляции экспрессии LOX-1 и CD36 (мембранный белок, экспрессированный на поверхности клеток нескольких типов, особенно макрофагах; относится к классу В сквенджер-рецепторов).

У мышей, подвергшихся хронической ишемии, вызванной окклюзией левой коронарной артерии (КА), экспрессия LOX-1 была увеличена в 2 раза [28]. У мышей, лишенных LOX-1, наблюдалось улучшенное восстановление миокарда и уменьшение размера инфаркта по сравнению с мышами дикого типа [29]. В экспериментах по ишемическому и реперфузионному повреждению ингибирование LOX-1 уменьшало активацию проапоптотической каспазы 3 (CASP3) и продуктов перекисного окисления липидов, что приводило к уменьшению местной воспалительной реакции и размеру инфаркта [30].

Связывание ox-LDL с тромбоцитами индуцирует тромбообразование, способствуя аденозиндифосфат (АДФ)-индуцированной активации фибриногенных рецепторов [31]. Обработка эндотелиальных клеток ингибиторами LOX-1 подавляет адгезию тромбоцитов вдвое и значительно снижает выраженность эндотелиальной дисфункции [13]. Связывание активированных тромбоцитов с LOX-1 обуславливает секрецию ET-1, который индуцирует сужение сосудов и эндотелиальную дисфункцию. В последующем образуются АФК и происходит инактивация NO [13]. Вероятно, LOX-1 индуцирует атеросклероз путем связывания с ox-LDL и активированными тромбоцитами [13]. Кроме того, взаимодействие LOX-1/ox-LDL может вызывать дестабилизацию бляшек за счет высвобождения внеклеточного индуктора MMP CD147 [13].

LOX-1 при атеросклеротических ССЗ: данные клинических исследований. В проспективной когорте с 2437 участниками, за которыми наблюдали в течение 11 лет, те, кто находился в самом высоком квинтиле LOX-1, имели в 1,7 раза более высокий риск инсульта и в 2 раза более высокий риск ИБС по сравнению с самым низким

квартилем [32]. Результаты исследования, включившего 4703 человека, показали, что у тех, кто находился в самом высоком тертиле LOX-1, риск инсульта был на 75% выше, чем в самом низком тертиле [33].

В исследование М. Sheikh и соавт. [34] были включены 226 пациентов со стабильной ИБС, 138 пациентов с нестабильной ИБС и 75 здоровых участников. Экспрессия LOX-1 в плазме крови была значительно повышена у пациентов со стабильной ИБС (в 4,5 раза) и пациентов с нестабильной ИБС (в 5,8 раза) по сравнению с таковой у здоровых участников-добровольцев. Более того, между стабильными и нестабильными группами пациентов концентрации LOX-1 также статистически значимо различались ($p < 0,001$).

В исследовании N. Kobayashi и соавт. [35] сравнивали LOX-1, креатинкиназу-МВ (СК-МВ) и тропонин Т (TnT) в отношении диагностической точности у пациентов с острым коронарным синдромом (ОКС). Используя валидированное пороговое значение 91 нг/мл, LOX-1 выявлял инфаркт миокарда с подъемом сегмента ST (ИМпСТ) с чувствительностью 89,6% и специфичностью 82,4%, а инфаркт миокарда без элевации ST (NSTEMI) с чувствительностью 79,5% и специфичностью 82,4%. Чувствительность LOX-1 была выше, чем у других маркеров (93% против 56% против 33% для LOX-1, TnT и СК-МВ соответственно) в начале госпитализации, но не через 24 часа после индексного события (89% против 100% против 93% для LOX-1, TnT и СК-МВ, соответственно).

Работа К. Kim и соавторов [36] заключалась в изучении связи между уровнем ox-LDL в плазме крови и нестабильностью атеросклеротических бляшек у пациентов с заболеваниями периферических артерий. В исследование были включены 48 пациентов с поражением бедренно-подколенной артерии (БПА), перенесших эндоваскулярную атерэктомия ($n=20$), хирургическую эндартерэктомию ($n=9$), шунтирование ($n=19$). Из 48 пациентов у 26 (54%) были нестабильные бляшки. Группа пациентов с нестабильными бляшками была моложе, имела меньше полных окклюзий, меньшую кальцификацию и больше CD68 (кластер дифференцировки 68, макросиалин)-позитивных и LOX-1-позитивных клеток, чем в группе пациентов со стабильными бляшками. Уровни ox-LDL в плазме крови были значительно выше в группе с нестабильными бляшками, чем в группе со стабильными бляшками ($57,4 \pm 13,9$ против $47,2 \pm 13,6$ Ед/л, $p=0,014$). Уровень ox-LDL в плазме крови, курение, нетотальная окклюзия и отсутствие приема статинов были независимыми предикторами нестабильности бляшек. Согласно данным S. Kraler и соавт. [37], устойчиво высокий уровень LOX-1 связан с нестабильностью бляшек КА.

В исследовании Y. Jiao и соавт. [38] 302 пациента с бессимптомными атеросклеротическими бляшками сонных артерий (СА) были разделены на 3 группы: группа атеросклеротических нестабильных бляшек, группа атеросклеротических стабильных бляшек и контрольная группа без бляшек. Выявлено, что высокие уровни MMP-9, LOX-1 и хитиназы-3-подобного белка 1 (CHI3L1, YKL-40) являются независимыми факторами риска образования нестабильных бляшек. Площадь под кривой (AUC) сывороточных маркеров составила 0,850 при чувствительности 87,67%, специфичности

81,13% и диагностической точности 84,92%. В исследовании X. Li и соавт. [39] показано, что уровни LOX-1 можно использовать для оценки тяжести инсульта и степени стеноза внутричерепных артерий.

В исследование Q. Lin и соавт. [40] были включены 94 пациента с субарахноидальным кровоизлиянием (САК) и 94 здоровых человека из контрольной группы. Медианные значения LOX-1 в сыворотке крови у пациентов с САК были значительно выше, чем в контрольной группе (1,5 против 0,4 нг/мл, $p < 0,001$). Тридцать пациентов (31,9%) имели неблагоприятный исход через 6 месяцев после САК. LOX-1 был сильным предиктором неблагоприятного исхода (отношение шансов (OR) 5,20, 95% доверительный интервал (CI) 1,25–22,04). Концентрации LOX-1 демонстрировали значительную дискриминационную способность (AUC 0,811, 95% CI 0,717–0,884). Прогностическая сила оценок Всемирной федерации неврологических хирургов, шкалы Ханта-Хесса, модифицированной шкалы Фишера и концентраций LOX-1 в сыворотке крови была сопоставима. Таким образом, сывороточный LOX-1, по-видимому, может стать многообещающим прогностическим предиктором у пациентов с САК.

Целью исследования Q. Zhang и соавт. [41] было изучение однонуклеотидного полиморфизма (SNP) LOX-1. Полиморфизм LOX-1 (rs1050286) был идентифицирован и генотипирован у 215 пациентов с бляшками СА и у 252 контрольных пациентов. LOX-1 (rs1050286) AA был значимо связан с повышенным риском образования бляшек СА. P. Salehipour и соавт. [42] обнаружили значительную связь между полиморфизмами OLR1 в блоке гаплотипов, особенно rs1050283 и rs3736235, с ИБС.

R. Hussein и соавт. [43] анализировали уровни LOX-1 у 30 пациентов с ОКС (группа контроля – 30 здоровых человек). Средний уровень LOX-1 в группе ИМ составил 476,17 пг/мл (90,88–675,4 пг/мл), что было значительно выше, чем у пациентов с нестабильной стенокардией (медиана = 289,1 пг/мл (62,74–585,43 пг/мл)) и в контрольной группе (медиана = 144,52 пг/мл (79,17–283,83 пг/мл)). Медианное соотношение LOX-1/ox-LDL у пациентов с ИМ составило 64,6 (диапазон 15,17–100,15), что было значительно выше, чем у пациентов с нестабильной стенокардией (медиана = 37,6 (7,06–88,65)) и контрольной группой (медиана = 25,29 (12,7–43,04)). Таким образом, при ОКС отмечены повышенные уровни LOX-1.

A. Schioppa и соавт. [44] исследовали связь LOX-1 с риском развития ИМ. Количество участников – 4658, частота сердечно-сосудистых событий контролировалась в течение $19,5 \pm 4,9$ лет наблюдения. Пациенты верхнего тертиля LOX-1 имели повышенный риск ИМ (отношение рисков (HR) 95% CI 1,76 (1,40–2,21)) по сравнению с пациентами из нижнего тертиля. Наличие сердечно-сосудистых факторов риска было связано с повышенным уровнем LOX-1, связь между LOX-1 и риском ИМ оставалась значимой с поправкой на факторы риска. Таким образом, в этом проспективном популяционном исследовании была обнаружена связь между повышенным уровнем LOX-1, наличием заболеваний СА и риском возникновения первого ИМ.

В исследовании A. Lee и соавт. [45] внутрикoronарные тромбы аспирировали путем интервенционной тромбоаспирации у пациентов с ИМпСТ ($n=32$) и у па-

циентов с NSTEMI ($n=12$). Уровень LOX-1 были выше в тромбах у пациентов с ИМпST, чем у пациентов с NSTEMI. Во всех аспирированных тромбах LOX-1 локализовался совместно с аполипопротеином B100 (APOB100). Концентрация LOX-1 в плазме крови была выше у пациентов с ИМпST ($n=33$), чем у пациентов с NSTEMI ($n=25$).

Целью работы Т. Stankova и соавт. [46] была оценка возможной роли циркулирующих ox-LDL и LOX-1 как потенциальных биомаркеров метаболического синдрома (МС), а также ИБС у пациентов с МС. В исследование были включены 30 пациентов с МС без ИБС, 30 пациентов с МС + ИБС и 30 здоровых людей из контрольной группы. У пациентов с МС наблюдались значительно более высокие уровни как ox-LDL, так и LOX-1 в сыворотке крови, чем у здоровых людей из контрольной группы, но ниже по сравнению с пациентами с МС + ИБС. Концентрация LOX-1 в сыворотке крови достоверно коррелировала с уровнем глюкозы крови натощак ($r_s=0,414$, $p=0,001$) и холестерином липопротеинов высокой плотности (ХС-ЛПВП) ($r_s=-0,273$, $p=0,035$) у всех пациентов с МС. Уровень LOX-1 коррелировал с ox-LDL только в подгруппе МС + ИБС ($r_s=0,396$, $p=0,030$). Карбамилированные липопротеины низкой плотности (кЛПНП) и LOX-1 для диагностики МС имели значения AUC 0,761 и 0,692 соответственно. Значения AUC кЛПНП и LOX-1 для диагностики ИБС среди пациентов с МС составили 0,811 и 0,739. Повышенные уровни ox-LDL и LOX-1 в сыворотке крови были связаны с более высоким риском развития МС (OR 24,28, 95% CI: 5,86–104,61, $p<0,001$ и OR 4,75; 95% CI: 1,58–14,25, $p=0,009$), а также с наличием ИБС среди пациентов с МС (OR 11,23; 95% CI: 3,10–40,71, $p<0,001$ и OR 4,03; 95% CI: 1,73–11,84, $p=0,019$ соответственно). Таким образом, согласно результатам данного исследования, отмечен серьезный потенциал ox-LDL и LOX-1 в качестве многообещающих биомаркеров у пациентов с МС.

Z. Zhao и соавт. [47] изучали предсказательную роль LOX-1 в отношении долгосрочных серьезных неблагоприятных сердечно-сосудистых и цереброваскулярных событий (МАССЕ) у пациентов с ИБС, перенесших первичное чрескожное коронарное вмешательство (ЧКВ). Всего были включены 1011 пациентов, пациенты наблюдались в течение двух лет. Двухлетние МАССЕ были связаны с концентрациями LOX-1 в сыворотке крови (HR 1,278, 95% CI 1,019–1,604, $p=0,034$), поражением ствола левой КА (HR 2,938, 95% CI 1,246–6,925, $p=0,014$), небольшим калибром используемых стентов (HR 2,207, 95% CI 1,189–4,095, $p=0,012$) и общей длиной стентов (HR 1,057, 95% CI 1,005–1,112, $p=0,030$). Концентрация LOX-1 в сыворотке $\geq 1,10$ нг/мл имела максимальную чувствительность и специфичность в прогнозировании возникновения 2-летних МАССЕ ($p<0,001$). У пациентов с более высокими концентрациями LOX-1 в сыворотке крови наблюдалась значительно более высокая частота МАССЕ ($p<0,001$). Таким образом, высокая исходная концентрация LOX-1 в сыворотке крови предсказывает 2-летние МАССЕ и демонстрирует дополнительную прогностическую ценность по сравнению с традиционными факторами риска у пациентов после первичного ЧКВ. Также определение LOX-1 может играть дополнительную роль в стратификации риска па-

циентов с ИБС, подвергшихся ЧКВ.

О. Liu и соавторы [48] определяли уровни LOX-1 у пациентов с рестенозом стента (РС) после ЧКВ. В исследование были включены три группы пациентов: группа РС ($n=99$), группа пациентов со стенозом КА менее 50% ($n=87$) и контрольная группа, состоящая из 96 человек без ИБС. Уровни LOX-1 были значительно выше в группе РС, чем в двух других группах ($p<0,001$). Уровни LOX-1 коррелировали с уровнями мочевой кислоты ($r=0,289$, $p=0,007$), креатинина ($r=0,316$, $p=0,003$) и ХС-ЛПВП ($r=-0,271$, $p=0,012$) в крови. Чувствительность и специфичность LOX-1 составила 81,5% и 55,7% соответственно, при оптимальном пороге (5,04 мкг/л). AUC LOX-1 составляла 0,720, и LOX-1 имел самую высокую AUC по сравнению с мочевой кислотой, креатинином и ХС-ЛПВП как по отдельности, так и в комбинации. Таким образом, высокий уровень LOX-1 в раннем периоде после ЧКВ имеет определенную прогностическую силу и диагностическую ценность для РС.

Н. Taskin и соавт. [49] исследовали влияние рукавной гастрэктомии (РГ) на LOX-1 и ox-LDL у пациентов с морбидным ожирением. Период наблюдения составил 12 месяцев. Значения LOX-1 и ox-LDL в хирургической ($n=20$) и контрольной ($n=20$) группах достоверно различались на исходном уровне ($p<0,001$). Через 12 месяцев после операции отмечено достоверное снижение индекса массы тела (ИМТ) ($-11,8\pm 9,0$, $p<0,001$). Было обнаружено, что ox-LDL и LOX-1 значительно снизились через 12 месяцев после РГ. Таким образом, исследуемые биомаркеры, повышенные исходно, значительно снизились после потери веса. Эти результаты позволяют предположить, что LOX-1 может функционировать, как маркер атеросклероза, у пациентов с морбидным ожирением и что бариатрическая хирургия может играть значимую роль в профилактике сердечно-сосудистой патологии.

LOX-1 как потенциальная мишень для клинических исследований. Данные вышеуказанных исследований свидетельствуют в пользу того, что блокада LOX-1 является потенциально привлекательной при лечении атеросклероза. Исследование А. Favere и соавт. [50] было направлено на оценку эффективности и безопасности MEDI6570, высокоаффинного моноклонального блокирующего антитела к LOX-1. Это первое плацебо-контролируемое исследование фазы 1 на людях (NCT03654313). Рандомизированы 88 пациентов с сахарным диабетом (СД) 2 типа для получения однократных возрастающих доз (10, 30, 90, 250 или 500 мг) или многократных возрастающих доз (90, 150 или 250 мг один раз в месяц в течение 3 месяцев) MEDI6570 или плацебо. Основной конечной точкой была безопасность. Вторичные и исследовательские конечные точки включали фармакокинетику, иммуногенность, уровни LOX-1 в крови и изменение объема коронарных бляшек. Средний возраст составил 57,6/58,1 года в группах однократного и многократного возрастания доз, 31,3%/62,5% составляли женщины, а средняя продолжительность диабета 2 типа составила 9,7/8,7 лет. Частота нежелательных явлений была одинаковой среди когорт. MEDI6570 продемонстрировал нелинейную фармакокинетику, при этом терминальный период полувыведения увеличился с 4,6 дня (30 мг) до 11,2 дня (500 мг). Наблюдалось дозозависимое снижение уров-

ней LOX-1 в крови по сравнению с исходным уровнем (>66% через 4 недели и 71,61–82,96% через 10 недель в группах однократного и многократного повышения доз соответственно). После 3 доз MEDI6570 ассоциировался с незначимой регрессией объема некальцинированных бляшек по сравнению с плацебо (-13,45 мм³ по сравнению с -8,25 мм³). Исследователи пришли к выводу, что MEDI6570 хорошо переносится и демонстрирует дозозависимое подавление LOX-1.

Заключение. В настоящее время мы имеем высокие технологии для идентификации новых биологических маркеров, вследствие чего необходимо создание мультибиомаркерной модели диагностики и прогнозирования течения ССЗ. В представленном обзоре литературы проведен анализ работ, посвященных изучению LOX-1 при атеросклерозе. Согласно данным этих исследований, LOX-1 является перспективной молекулой, обладающей диагностическим и прогностическим потенциалом при атеросклеротических ССЗ. Регуляция концентрации и экспрессии LOX-1, возможно, окажется многообещающей стратегией для лечения атеросклероза.

ЛИТЕРАТУРА (ПП. 1-3, 7-50 СМ.
 REFERENCES)

4. Алиева А.М., Теплова Н.В., Батов М.А., Воронкова К.В., Валиев Р.К., Шнахова Л.М. и др. Пентраксин-3 – перспективный биологический маркер при сердечной недостаточности: литературный обзор. *Consilium Medicum*. 2022; 24 (1): 53-9. DOI: 10.26442/20751753.2022.1.201382.
5. Алиева А.М., Резник Е.В., Пинчук Т.В., Аракелян Р.А., Валиев Р.К., Рахаев А.М. и др. Фактор дифференцировки роста-15 (GDF-15) как биологический маркер при сердечной недостаточности. *Архивъ внутренней медицины*. 2023; 13 (1): 14-23. DOI: 10.20514/2226-6704-2023-13-1-14-23.
6. Алиева А.М., Теплова Н.В., Кисляков В.А., Воронкова К.В., Шнахова Л.М., Валиев Р.К. и др. Биомаркеры в кардиологии: микроРНК и сердечная недостаточность. *Терапия*. 2022; 1: 60-70. DOI:10.18565/therapy.2022.1.60-70.

REFERENCES

1. Roth G.A., Mensah G.A., Johnson C.O., Addolorato G., Ammirati E., Baddour L.M. et al. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update from the GBD 2019 Study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2020; 76 (25): 2982-3021. DOI: 10.1016/j.jacc.2020.11.010.
2. Deng P., Fu Y., Chen M., Wang D., Si L. Temporal trends in inequalities of the burden of cardiovascular disease across 186 countries and territories. *Int. J. Equity Health*. 2023; 22 (1): 164. DOI: 10.1186/s12939-023-01988-2.
3. Silva S., Fatumo S., Nitsch D. Mendelian randomization studies on coronary artery disease: a systematic review and meta-analysis. *Syst. Rev.* 2024; 13 (1): 29. DOI: 10.1186/s13643-023-02442-8.
4. Alieva A.M., Teplova N.V., Batov M.A., Voronkova K.V., Valiev R.K., Shnakhova L.M. et al. Pentraxin-3 – a promising biological marker in heart failure: literature review. *Consilium Medicum*. 2022; 24 (1):53–9. DOI: 10.26442/20751753.2022.1.201382. (in Russian)
5. Alieva A.M., Reznik E.V., Pinchuk T.V., Arakelyan R.A., Valiev R.K., Rakhaev A.M. et al. Growth Differentiation Factor-15 (GDF-15) is a Biological Marker in Heart Failure. *Архивъ внутренней медицины*. 2023; 13 (1): 14-23. DOI: 10.20514/2226-6704-2023-13-1-14-23. (in Russian)
6. Alieva A.M., Teplova N.V., Kislyakov V.A., Voronkova K.V., Shnakhova L.M., Valiev R.K. et al. Biomarkery v kardiologii: mikroRNK i serdechnaya nedostatochnost'. *Terapiya*. 2022; 1: 60-70. DOI: 10.18565/therapy.2022.1.60-70. (in Russian)

7. Lubrano V., Balzan S., Papa A. LOX-1 variants modulate the severity of cardiovascular disease: state of the art and future directions. *Mol. Cell Biochem*. 2023. DOI: 10.1007/s11010-023-04859-0.
8. Sánchez-León M.E., Loeza-Reyes K.J., Matias-Cervantes C.A., Mayoral-Andrade G., Pérez-Campos E.L., Pérez-Campos-Mayoral L. et al. LOX-1 in Cardiovascular Disease: A Comprehensive Molecular and Clinical Review. *Int. J. Mol. Sci.* 2024; 25 (10): 5276. DOI: 10.3390/ijms25105276.
9. Bagheri B., Khatibiyan Feyzabadi Z., Nouri A., Azadfallah A., Mahdizade Ari M., Hemmati M. et al. Atherosclerosis and Toll-Like Receptor4 (TLR4), Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein-1 (LOX-1), and Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type9 (PCSK9). *Mediators Inflamm.* 2024; 2024: 5830491. DOI: 10.1155/2024/5830491.
10. Truthe S., Klassert T.E., Schmelz S., Jonigk D., Blankenfeldt W., Slevogt H. Role of Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1 in Inflammation and Pathogen-Associated Interactions. *J. Innate Immun.* 2024; 16 (1): 105-32. DOI: 10.1159/000535793.
11. Pyryris N., Dimitriadis K., Beneki E., Iliakis P., Soulaïdopoulos S., Tsioufis P., et al. LOX-1 Receptor: A Diagnostic Tool and Therapeutic Target in Atherogenesis. *Curr. Probl. Cardiol.* 2024; 49 (1 Pt C): 102117. DOI: 10.1016/j.cpcardiol.2023.102117.
12. Munno M., Mallia A., Greco A., Modafferi G., Banfi C., Eligini S. Radical Oxygen Species, Oxidized Low-Density Lipoproteins, and Lectin-like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor 1: A Vicious Circle in Atherosclerotic Process. *Antioxidants (Basel)*. 2024; 13 (5): 583. DOI: 10.3390/antiox13050583.
13. Barreto J., Karathanasis S.K., Remaley A., Sposito A.C. Role of LOX-1 (Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor 1) as a Cardiovascular Risk Predictor: Mechanistic Insight and Potential Clinical Use. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2021; 41 (1): 153-66. DOI: 10.1161/ATVBAHA.120.315421.
14. Inoue K., Arai Y., Kurihara H., Kita T., Sawamura T. Overexpression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 induces intramyocardial vasculopathy in apolipoprotein E-null mice. *Circ. Res.* 2005; 97 (2): 176-84. DOI: 10.1161/01.RES.0000174286.73200.d4.
15. Schaeffer D.F., Riazzy M., Parhar K.S., Chen J.H., Duronio V., Sawamura T., Steinbrecher U.P. LOX-1 augments oxLDL uptake by lysoPC-stimulated murine macrophages but is not required for oxLDL clearance from plasma. *J. Lipid Res.* 2009; 50 (8): 1676-84. DOI: 10.1194/jlr.M900167-JLR200.
16. Wang X., Ding Z., Lin J., Guo Z., Mehta J.L. LOX-1 in macrophage migration in response to ox-LDL and the involvement of calpains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015; 467 (1): 135-9. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.09.100.
17. Li H., Zhuang W., Xiong T., Park W.S., Zhang S., Zha Y. et al. Nrf2 deficiency attenuates atherosclerosis by reducing LOX-1-mediated proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 2022; 347: 1-16. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2022.02.025.
18. Catar R., Chen L., Zhao H., Wu D., Kamhieh-Milz J., Lücht C. et al. Native and Oxidized Low-Density Lipoproteins Increase the Expression of the LDL Receptor and the LOX-1 Receptor, Respectively, in Arterial Endothelial Cells. *Cells*. 2022; 11 (2): 204. DOI: 10.3390/cells11020204.
19. Cimmino G., Cirillo P., Conte S., Pellegrino G., Barra G., Maresca L. et al. Oxidized low-density lipoproteins induce tissue factor expression in T-lymphocytes via activation of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1. *Cardiovasc. Res.* 2020; 116 (6): 1125-35. DOI: 10.1093/cvr/cvz230.
20. Chang S.F., Chang P.Y., Chou Y.C., Lu S.C. Electronegative LDL Induces M1 Polarization of Human Macrophages Through a LOX-1-Dependent Pathway. *Inflammation*. 2020; 43 (4): 1524-35. DOI: 10.1007/s10753-020-01229-6.
21. Deng Q., Li H., Yue X., Guo C., Sun Y., Ma C. et al. Smooth muscle liver kinase B1 inhibits foam cell formation and atherosclerosis via direct phosphorylation and activation of SIRT6. *Cell Death Dis.* 2023; 14 (8): 542. DOI: 10.1038/s41419-023-06054-x.
22. Ding Z., Liu S., Wang X., Dai Y., Khaidakov M., Deng X. et al. LOX-1, mtDNA damage, and NLRP3 inflammasome activation in macrophages: implications in atherogenesis. *Cardiovasc. Res.* 2014; 103 (4): 619-28. DOI: 10.1093/cvr/cvu114.
23. Wang X., Ding Z., Lin J., Guo Z., Mehta J.L. LOX-1 in macrophage migration in response to ox-LDL and the involvement of calpains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015; 467 (1): 135-9. DOI:

- 10.1016/j.bbrc.2015.09.100.
24. Buonfiglio F., Xia N., Yüksel C., Manicam C., Jiang S., Zadeh J.K. et al. Studies on the Effects of Hypercholesterolemia on Mouse Ophthalmic Artery Reactivity. *Diseases*. 2023; 11 (4): 124. DOI: 10.3390/diseases11040124.
 25. El-Hajjar L., Hindieh J., Andraos R., El-Sabban M., Daher J. Myeloperoxidase-Oxidized LDL Activates Human Aortic Endothelial Cells through the LOX-1 Scavenger Receptor. *Int. J. Mol. Sci.* 2022; 23 (5): 2837. DOI: 10.3390/ijms23052837.
 26. Lu H., Xu Y., Zhao H., Xu X. A novel rabbit model of atherosclerotic vulnerable plaque established by cryofluid-induced endothelial injury. *Sci. Rep.* 2024; 14 (1): 9447. DOI: 10.1038/s41598-024-60287-0.
 27. Li T.T., Cui Y.T., Li T.H., Xiang Q., Chen Y.Y., Zheng X.L. et al. TM6SF2 reduces lipid accumulation in vascular smooth muscle cells by inhibiting LOX-1 and CD36 expression. *Exp. Cell Res.* 2023; 429 (2): 113666. DOI: 10.1016/j.yexcr.2023.113666.
 28. Lu J., Wang X., Wang W., Muniyappa H., Hu C., Mitra S. et al. LOX-1 abrogation reduces cardiac hypertrophy and collagen accumulation following chronic ischemia in the mouse. *Gene Ther.* 2012; 19 (5): 522-31. DOI: 10.1038/gt.2011.133.
 29. Lu J., Wang X., Wang W., Muniyappa H., Hu C., Mitra S et al. LOX-1 abrogation reduces cardiac hypertrophy and collagen accumulation following chronic ischemia in the mouse. *Gene Ther.* 2012; 19 (5): 522-31. DOI: 10.1038/gt.2011.133.
 30. Li D., Williams V., Liu L., Chen H., Sawamura T., Romeo F. et al. Expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptors during ischemia-reperfusion and its role in determination of apoptosis and left ventricular dysfunction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2003; 41 (6): 1048-55. DOI: 10.1016/s0735-1097(02)02966-2.
 31. Kattoor A.J., Goel A., Mehta J.L. LOX-1: Regulation, Signaling and Its Role in Atherosclerosis. *Antioxidants (Basel)*. 2019; 8 (7): 218. DOI: 10.3390/antiox8070218.
 32. Inoue N., Okamura T., Kokubo Y., Fujita Y., Sato Y., Nakanishi M. et al. LOX index, a novel predictive biochemical marker for coronary heart disease and stroke. *Clin. Chem.* 2010; 56 (4): 550-8. DOI: 10.1373/clinchem.2009.140707.
 33. Markstad H., Edsfieldt A., Yao Mattison I., Bengtsson E., Singh P., Cavalera M. et al. High Levels of Soluble Lectinlike Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1 Are Associated With Carotid Plaque Inflammation and Increased Risk of Ischemic Stroke. *J. Am. Heart Assoc.* 2019; 8 (4): e009874. DOI: 10.1161/JAHA.118.009874.
 34. Sheikh M.S.A. Circulatory soluble LOX-1 is a novel predictor for coronary artery disease patients. *Cardiovasc. J. Afr.* 2023; 34 (2): 104-8. DOI: 10.5830/CVJA-2022-038.
 35. Kobayashi N., Hata N., Kume N., Seino Y., Inami T., Yokoyama S. et al. Soluble lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 as an early biomarker for ST elevation myocardial infarction: time-dependent comparison with other biomarkers: time-dependent comparison with other biomarkers. *Circ. J.* 2011; 75 (6): 1433-9. DOI: 10.1253/circj. cj-10-0913.
 36. Kim K., Lim C., Kim G., Chung J.H., Cho Y.S., Cho J.H. et al. Association of Plasma Marker of Oxidized Lipid with Histologic Plaque Instability in Patients with Peripheral Artery Disease. *Ann. Vasc. Surg.* 2020; 66: 554-65. DOI: 10.1016/j.avsg.2019.11.004.
 37. Kraler S., Wenzl F.A., Georgiopoulos G., Obeid S., Liberale L., von Eckardstein A. et al. Soluble lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 predicts premature death in acute coronary syndromes. *Eur. Heart J.* 2022; 43 (19): 1849-60. DOI: 10.1093/eurheartj/ehac143.
 38. Jiao Y., Qin Y., Zhang Z., Zhang H., Liu H., Li C. Early identification of carotid vulnerable plaque in asymptomatic patients. *BMC Cardiovasc. Disord.* 2020; 20 (1): 429. DOI: 10.1186/s12872-020-01709-5.
 39. Li X.M., Jin P.P., Xue J., Chen J., Chen Q.F., Luan X.Q. et al. Role of sLOX-1 in intracranial artery stenosis and in predicting long-term prognosis of acute ischemic stroke. *Brain Behav.* 2017; 8 (1): e00879. DOI: 10.1002/brb3.879.
 40. Lin Q., Ba H.J., Dai J.X., Sun J., Lu C., Chen M.H. et al. Serum soluble lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 concentrations and prognosis of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Clin. Chim. Acta.* 2020; 500: 54-8. DOI: 10.1016/j.cca.2019.09.017.
 41. Zhang Q., Chu Y., Jin G., Dai J., Kang H. Association Between LOX-1, LAL, and ACAT1 Gene Single Nucleotide Polymorphisms and Carotid Plaque in a Northern Chinese Population. *Genet. Test Mol. Biomarkers.* 2020; 24 (3): 138-44. DOI: 10.1089/gtmb.2019.0209.
 42. Salehipour P., Rezagholizadeh F., Mahdiannasser M., Kazerani R., Modarresi M.H. Association of OLR1 gene polymorphisms with the risk of coronary artery disease: A systematic review and meta-analysis. *Heart Lung.* 2021; 50 (2): 334-43. DOI: 10.1016/j.hrtlng.2021.01.015.
 43. Hussein R.A., Abdul-Rasheed O.F., Basheer M. Evaluation of soluble lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (sLOX-1) and sLOX-1/oxidized LDL ratio as novel biomarkers of acute coronary syndrome. *Acta Biochim. Pol.* 2022; 69 (2): 309-14. DOI: 10.18388/abp.2020_5735.
 44. Schiopu A., Björkbacka H., Narasimhan G., Loong B.J., Engström G., Melander O. et al. Elevated soluble LOX-1 predicts risk of first-time myocardial infarction. *Ann. Med.* 2023; 55 (2): 2296552. DOI: 10.1080/07853890.2023.2296552.
 45. Lee A.S., Wang Y.C., Chang S.S., Lo P.H., Chang C.M., Lu J. et al. Detection of a High Ratio of Soluble to Membrane-Bound LOX-1 in Aspirated Coronary Thrombi from Patients With ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction. *J. Am. Heart Assoc.* 2020; 9 (2): e014008. DOI: 10.1161/JAHA.119.014008.
 46. Stankova T., Delcheva G., Maneva A., Vladeva S. Serum Levels of Carbamylated LDL and Soluble Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1 Are Associated with Coronary Artery Disease in Patients with Metabolic Syndrome. *Medicina (Kaunas)*. 2019; 55 (8): 493. DOI: 10.3390/medicina55080493.
 47. Zhao Z.W., Xu Y.W., Li S.M., Guo J.J., Sun J.M., Hong J.C. et al. Baseline Serum sLOX-1 Concentrations Are Associated with 2-Year Major Adverse Cardiovascular and Cerebrovascular Events in Patients after Percutaneous Coronary Intervention. *Dis. Markers.* 2019; 2019: 4925767. DOI: 10.1155/2019/4925767.
 48. Liu J., Liu Y., Jia K., Huo Z., Huo Q., Liu Z., et al. Clinical analysis of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in patients with in-stent restenosis after percutaneous coronary intervention. *Medicine (Baltimore)*. 2018; 97 (17): e0366. DOI: 10.1097/MD.0000000000010366.
 49. Taskin H.E., Kocael A., Kocael P., Zengin K., Al M., Sozer V. et al. Original contribution: sleeve gastrectomy reduces soluble lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (sLOX-1) levels in patients with morbid obesity. *Surg. Endosc.* 2022; 36 (4): 2643-52. DOI: 10.1007/s00464-021-08989-8.
 50. Vavere A.L., Sinsakul M., Ongstad E.L., Yang Y., Varma V., Jones C. et al. Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor 1 Inhibition in Type 2 Diabetes: Phase 1 Results. *J. Am. Heart Assoc.* 2023; 12 (3): e027540. DOI: 10.1161/JAHA.122.027540.

ГЕМАТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Суховольский В.Г.¹, Ковалев А.В.¹, Арджевнишвили И.В.², Горбенко А.С.¹, Столяр М.А.¹, Бахтина В.И.^{3,4},
Ольховский И.А.^{1,5}

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕОРИИ ФАЗОВЫХ ПЕРЕХОДОВ ВТОРОГО РОДА В АНАЛИЗЕ ВОЗРАСТНОЙ И ГЕНДЕРНОЙ ЗАВИСИМОСТИ ВОЗНИКНОВЕНИЯ МУТАЦИИ V617F/JAK2: МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫЕ НОВООБРАЗОВАНИЯ И КЛОНАЛЬНЫЙ ГЕМОПОЭЗ НЕОПРЕДЕЛЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА

¹ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный Центр Сибирского отделения РАН», 660036, Красноярск, Россия;

²КГБУЗ Красноярский краевой клинический онкологический диспансер им. А. И. Крыжановского, 660133, Красноярск, Россия;

³КГБУЗ Красноярская краевая клиническая больница, 660022, Красноярск, Россия;

⁴ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава РФ, 660022, Красноярск, Россия;

⁵Красноярский филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, 660036, Красноярск, Россия

Соматическая мутация V617F в гене янускиназы-2 (JAK2) служит важным критерием диагностики Ph-негативных миело-пролиферативных новообразований (МПН). При этом ее выявляемость в популяции увеличивается с возрастом, сопровождающая развитие синдрома «клонального гемопоэза неопределенного потенциала» (КГНП). Как правило, аллельная нагрузка JAK2 V617F менее 2% характерна для синдрома КГНП, а при МПН существенно выше. Соотношение частоты выявления КГНП и МПН в разных возрастных группах в российской популяции ранее не исследовалось. Известные математические модели зависимости заболеваемости от возраста не всегда позволяют с достаточной точностью выполнять вычисления и интерпретировать биологическую значимость их параметров. Целью настоящего исследования стало использование модели фазового перехода второго рода для физических систем для анализа встречаемости мутации JAK2 V617F. Выборка из базы данных включала пол, возраст и результаты тестирования 6641 пациентов, направленных гематологами для выполнения молекулярно-генетического тестирования в связи с подозрением на МПН и 3381 человек, обследованных в рамках скрининга среди доноров крови и пациентов без признаков онкогематологического заболевания. Определение мутации JAK2 V617F проводили методом ПЦР-РВ с использованием набора «Миелоскрин» ООО «Формула гена» (Красноярск, Россия). Рассчитывалась зависимость квадрата парциальной частоты встречаемости мутации в отдельной возрастной когорте от величины обратного возраста. Среди обследованных пациентов с МПН, в отличие от группы скрининга, частота выявления мутации JAK2 V617F у женщин (33,8%) была выше ($p < 0,01$) чем у мужчин (22,3%). Возрастная зависимость частоты выявления мутации JAK2 V617F у пациентов с высокой, но не с низкой (менее 2%) аллельной нагрузкой статистически достоверно описывается с использованием модели фазового перехода второго рода, что предполагает пороговое появление качественно новых взаимодействий в клональном гемопоэзе с вероятным вовлечением возрастных эпигенетических механизмов нарушения иммунологического надзора. Линейные участки уравнений и критические точки их перелома позволяют сравнивать разные выборки данных, прогнозировать заболеваемость и необходимый бюджет медико-социальных расходов исходя из конкретной демографической ситуации региона.

Ключевые слова: мутация JAK2 V617F; возрастные и гендерные различия; миелопролиферативные новообразования; клональный гемопоэз неопределенного потенциала; модель фазовых переходов второго рода

Для цитирования: Суховольский В.Г., Ковалев А.В., Арджевнишвили И.В., Горбенко А.С., Столяр М.А., Бахтина В.И., Ольховский И.А. Использование теории фазовых переходов второго рода в анализе возрастной и гендерной зависимости возникновения мутации V617F/JAK2: миелопролиферативные новообразования и клональный гемопоэз неопределенного потенциала. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69 (10): 504-512.
DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-10-504-512>

Для корреспонденции: Ольховский Игорь Алексеевич, канд. мед. наук, директор Красноярского филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России; e-mail: krashemcenter@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Благодарность. Авторы выражают благодарность д-ру мед. наук, зав. кафедрой лабораторной медицины ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава РФ профессору А.Ж. Гильманову за полезный критический анализ и участие в обсуждении полученных результатов.

Поступила 22.03.2024
Принята к печати 03.09.2024
Опубликовано 00.10.2024

Soukhovolsky V.G.¹, Kovalev A.V.¹, Ardzhevishvili I.V.², Gorbenko A.S.¹, Stolyar M.A.¹, Bakhtina V.I.^{3,4}, Olkhovsky I.A.^{1,5}

USING THE THEORY OF PHASE TRANSITIONS OF THE SECOND TYPE IN THE ANALYSIS OF AGE AND GENDER DEPENDENCE OF THE OCCURRENCE OF THE V617F JAK2 MUTATION: MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS AND CLONAL HEMATOPOIESIS OF UNCERTAIN POTENTIAL

¹ Federal Research Center Krasnoyarsk Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russia;

² Krasnoyarsk Regional Clinical Oncology Center named after A.I. Kryzhanovskiy, Krasnoyarsk, Russia;

³ Krasnoyarsk regional clinic Hospital, Krasnoyarsk, Russian Federation;

⁴ Prof. V. F. Voyno-Yasenetskiy Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation;

⁵ Krasnoyarsk branch of the "National Medical Research Center for Hematology", Krasnoyarsk, Russia

The somatic mutation V617F in the Janus kinase 2 (JAK2) gene is an important criterion of the Ph-negative myeloproliferative neoplasms (MPN) diagnosis. Moreover, its detection in the population increases with age, accompanying the development of "clonal hematopoiesis syndrome of undetermined potential" (CHIP). As a rule, the JAK2 V617F allele load of less than 2% is characteristic of CHIP, and in MPN it is significantly higher. Polynomial equations of mathematical models of the dependence of morbidity on age do not always allow calculations and interpretation of the biological significance of their parameters to be performed with sufficient accuracy. The purpose of this study was to use the second-order phase transition model for physical systems to analyze the occurrence of the JAK2 V617F mutation.

The database sample included sex, age and test results of 6641 patients referred by hematologists for suspected MPN and 3381 people examined as part of screening programs. The JAK2 V617F mutation was determined by RT-PCR using the "Myeloskrin kit" from Formula of the Gene LLC. The dependence of the square of the partial frequency of occurrence of a mutation in a separate age cohort on the reciprocal age was calculated. Among the examined patients with MPN, in contrast to the screening group, the frequency of detection of the JAK2 V617F mutation in women (33.8%) was higher ($p > 0.01$) than in men (22.3%). The age dependence of the frequency of detection of the JAK2 V617F mutation in patients with high, but not with low (less than 2%) allele load is statistically reliably described using the second-order phase transition model, which suggests a threshold appearance of qualitatively new interactions in the process of clonal hematopoiesis with the probable involvement of age-related epigenetic mechanisms violations of immunological surveillance. The linear sections of the equations and their critical turning points make it possible to compare different data samples, predict morbidity and the required budget for medical and social expenses based on the specific demographic situation of the region.

Key words: mutation JAK2 V617F; age and gender differences; myeloproliferative neoplasms; clonal hematopoiesis of uncertain potential; model of second-order phase transitions

For citation: Soukhovolsky V.G., Kovalev A.V., Ardzhevishvili I.V., Gorbenko A.S., Stolyar M.A., Bakhtina V.I., Olkhovsky I.A. Using the theory of phase transitions of the second type in the analysis of age and gender dependence of the occurrence of the V617F JAK2 mutation: myeloproliferative neoplasms and clonal hematopoiesis of uncertain potential. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (10): 504-512 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-10-504-512>

For correspondence: Olkhovskiy I.A., PhD, docent, director of Krasnoyarsk branch of the «National Research Center for Hematology» Department of Health, research fellow of the Krasnoyarsk Scientific Center SB RAS; e-mail: krashemcenter@mail.ru

Information about authors:

Soukhovolsky V.G., <https://orcid.org/0000-0003-0407-2290>;

Kovalev A.V., <https://orcid.org/0000-0002-9744-768X>;

Ardzhevishvili I.V., <https://orcid.org/0009-0007-3639-4522>;

Gorbenko A.S., <https://orcid.org/0000-0001-8756-2660>;

Stolyar M.A., <https://orcid.org/0000-0002-8037-9844>;

Bakhtina V.I., <https://orcid.org/0000-0002-6465-9942>;

Olkhovskiy I.A., <https://orcid.org/0000-0003-2311-2219>.

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

Financing. The study had no sponsor support.

Acknowledgment. Authors express their gratitude to Doctor of Medical Sciences, Head of the Department of Laboratory Medicine of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Bashkir State Medical University" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Professor A.Zh. Gilmanov for a serious analysis and participation in the discussion of the obtained results.

Received 22.03.2024

Accepted 03.09.2024

Published 00.10.2024

Введение. Оценка зависимости онкологической заболеваемости от возраста и пола представляет интерес как с точки зрения изучения биологических механизмов канцерогенеза, так и с точки зрения планирования бюджет-

та здравоохранения и социальных служб на территориях с различной демографической структурой населения.

Выявление соматической мутации V617F в гене янускиназы-2 (JAK2) - один из ключевых критериев диа-

гностики Ph-негативных миелопролиферативных новообразований (МПН). Среди пациентов с МПН частота выявления мутации *JAK2 V617F* достигает 95-97% при истинной полицитемии и более 50-60% при других нозологических вариантах МПН: эссенциальной тромбоцитемии и первичном миелофиброзе [1-4]. Вместе с тем, это одна из наиболее частых соматических мутаций кроветворных клеток человека с популяционной частотой выявления среди населения разных регионов мира 0,1-0,8% [4-12]. Вероятность выявления данной мутации увеличивается с возрастом и часто ассоциирована с развитием незлокачественного синдрома «клонального гемопоэза неопределенного потенциала» (КГНП) [1,3,4,8-15]. По современным данным, синдром КГНП тесно связан с хроническими воспалительными процессами, патогенезом атеросклеротического поражения сосудов и риском развития тромбозов и инсультов [1,4,8,10,12,14]. Однако менее чем у 1% пациентов с *JAK2V617F*-позитивным КГНП в течение года жизни происходит трансформация в МПН, а риск развития онкогематологического заболевания зависит от наличия сопутствующих генетических полиморфизмов, других соматических мутаций и внешних факторов [4,8,16-19]. Вместе с тем, молекулярные механизмы, определяющие различия между МПН и КГНП, изучены недостаточно.

Отдельное диагностическое значение имеет показатель, отражающий количество циркулирующих клеток крови с мутацией – уровень аллельной нагрузки, выражающийся в процентной доле ДНК мутантного аллеля к суммарной ДНК данного гена в лейкоцитарных клетках крови. При этом, как правило, аллельная нагрузка *JAK2 V617F* 1-3% характерна для синдрома КГНП, а при МПН довольно часто она значительно выше 50% в результате потери гетерозиготности опухолевыми клетками. Выявление низкой аллельной нагрузки у пациентов может приводить к гипердиагностике МПН, поскольку неспецифические симптомы гематологического заболевания потенциально могут сочетаться с сопутствующим возраст-зависимым КГНП, не оказывающим критического влияния на течение и прогноз болезни.

Обычно при математическом анализе возрастная динамика онкологической заболеваемости q описывается многочленным выражением (полиномом) $q(T) = a_0 + a_1T + a_2T^2 + \dots$ [20]. Вместе с тем, такие модели не всегда позволяют с достаточной точностью оценить значимость отличий при анализе в разных возрастных когортах пациентов или при разных патологических состояниях [21]. Также часто затруднительна биологическая интерпретация расчетных параметров этих уравнений. В качестве альтернативы полиномиального описания возрастной динамики онкозаболеваний ранее была предложена модель [21], аналогичная моделям фазового перехода второго рода для физических систем [22, 23]. Под фазовым переходом второго рода в физике понимают переход сложной системы из одного устойчивого состояния в другое за счет внутренней перестройки взаимодействия элементов системы без выделения или поглощения энергии. Использование математической модели фазовых переходов позволяет определить точку перехода фаз анализируемой системы при достижении некоторого критического значения её изменяющихся параметров. Линейные участ-

ки уравнений и критические точки перелома графиков этих уравнений позволяют сравнивать разные выборки данных, а также прогнозировать заболеваемость и необходимый бюджет медико-социальных расходов исходя из конкретной демографической ситуации.

Поскольку мутация *JAK2 V617F* ассоциирована с развитием большинства случаев МПН, представляет интерес использование данного подхода и к анализу распределения возрастных парциальных частот встречаемости этой мутации в разных диапазонах её аллельной нагрузки.

Цель работы - оценка распространенности мутации *JAK2 V617F* в зависимости от возраста и пола обследованных пациентов с использованием модели фазового перехода второго рода.

Материал и методы. В работе использовали выборку из базы данных результатов лабораторных исследований Красноярского филиала ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России с 01.01.2012 по 25.12.2023 г. Были собраны сведения о возрастной и половой структуре взрослых пациентов, которым было проведено исследование на выявление соматической мутации *V617F* в гене *JAK2*. Из них 6457 пациентов (3259 женщин и 3198 мужчин) были направлены врачами-гематологами в связи с подозрением на МПН в соответствии с клиническими рекомендациями [2], а 3381 человек (1612 женщин и 1769 мужчин) были обследованы в рамках программы оценки распространенности мутации среди разных категорий здоровых людей или пациентов без онкогематологического заболевания [9-11]. В выборку не включались случаи повторного обследования пациентов, а также случаи выявления других драйверных мутаций МПН в генах *CALR* или *MPL*. Обследованные пациенты подписывали добровольное информированное согласие на исследование.

Выделение ДНК из лейкоцитов крови пациентов и определение мутации *JAK2 V617F* проводили методом аллель-специфической ПЦР в реальном времени с использованием набора реагентов «Миелоскрин» (ООО «Формула гена», Россия) с уровнем аналитической чувствительности до 0,04% аллельной нагрузки [24].

В расчетах математической модели фазового перехода второго рода в качестве характеристики частоты встречаемости мутации *JAK2 V617F* использовался так называемый параметр порядка $q(T)$ - парциальная частота встречаемости мутации в отдельной возрастной когорте T . Зависимость квадрата парциальной частоты q^2 от величины обратного возраста $1/T$ описывается следующим уравнением:

$$q^2 = \begin{cases} 0, 1/T > 1/T_c \\ a - b/T, 1/T \leq 1/T_c \end{cases} \quad (1)$$

График предлагаемой модели в координатах $\{1/T, q^2\}$ характеризуется двумя линейными участками и

точкой перегиба T_c . Коэффициент $b = \frac{\partial(q^2)}{\partial(\frac{1}{T})}$ наклона

прямой (1) после достижения критического значения T_c характеризует скорость нарастания доли пациентов с мутациями в возрастных когортах. Более подробно применяемые математические методы описаны в работе [23]. Статистический анализ выполняли с использованием таблиц Excel и пакета Statistica10. Для сравне-

ния частот использовали критерий χ^2 .

Результаты. У 1870 (28%) из всех направленных гематологами пациентов и у 18 (0,53%) пациентов из группы скрининга уровень мутантного аллеля был равен или выше 2%. У 167 (0,25%) пациентов с симптомами гематологического заболевания и у 30 (1,29%) человек, обследованных в скрининге, аллельная нагрузка определялась ниже 2%.

В таблице представлены данные по разным гендерным группам пациентов. Среди обследованных пациентов с подозрением на МПН частота выявления мутации *V617FJAK2* у женщин была статистически значимо выше ($p < 0,01$, OR = 1,78 (1,6-1,99)). В группе скрининга значимых отличий частоты выявления мутации не наблюдалось, хотя среди обследованных женщин доноров крови данной мутации выявлено не было.

Характеристика пациентов, включенных в исследование, медиана (Q25-75)

Пациенты	Пол	Всего	Возраст, годы	Доля пациентов с мутацией <i>V617FJAK2</i> , n (%)	Аллельная нагрузка <i>V617FJAK2</i> , %
Пациенты, направленные с подозрением на МПН	Мужчины	3259	53 (38-63)	726 (22,3%)	30,0 (18-52)
	Женщины	3198	57 (42-67)	1144 (33,8%)*	29,6 (14-51)
Пациенты без онкогематологического диагноза	Мужчины	1769	50 (39-58)	26 (1,47%)	0,25 (0,07-0,45)
	Женщины	1612	56 (47-67)	19 (1,18%)	0,16 (0,09-0,22)
В том числе: пациенты из медицинских организаций	Мужчины	965	57 (50-65)	19 (1,97%)	0,24 (0,08-0,44)
	Женщины	1185	61 (53-70)	24 (1,50%)	0,16 (0,11-0,23)
доноры крови	Мужчины	805	41 (36-48)	5 (0,62%)	0,33 (0,09-0,87)
	Женщины	426	42 (36-49)	0	-

Примечание. * – Гендерные различия статистически значимы при $p < 0,01$.

Значения аллельной нагрузки у всех мужчин и женщин с выявленной мутацией *JAK2 V617F* значительно варьируют в разные возрастные периоды, при этом у пациентов до сорокалетнего возраста практически никогда не превышают 50%. Очевидно, потеря гомозиготности в кроветворных клетках пациентов происходит

преимущественно в более старшем возрасте.

На рис. 1 представлены данные о возрастной зависимости частоты выявления мутации *JAK2 V617F* среди обследованных пациентов с клиническими проявлениями и уровнем аллельной нагрузки выше 2%, которым в последующем был подтвержден диагноз МПН.

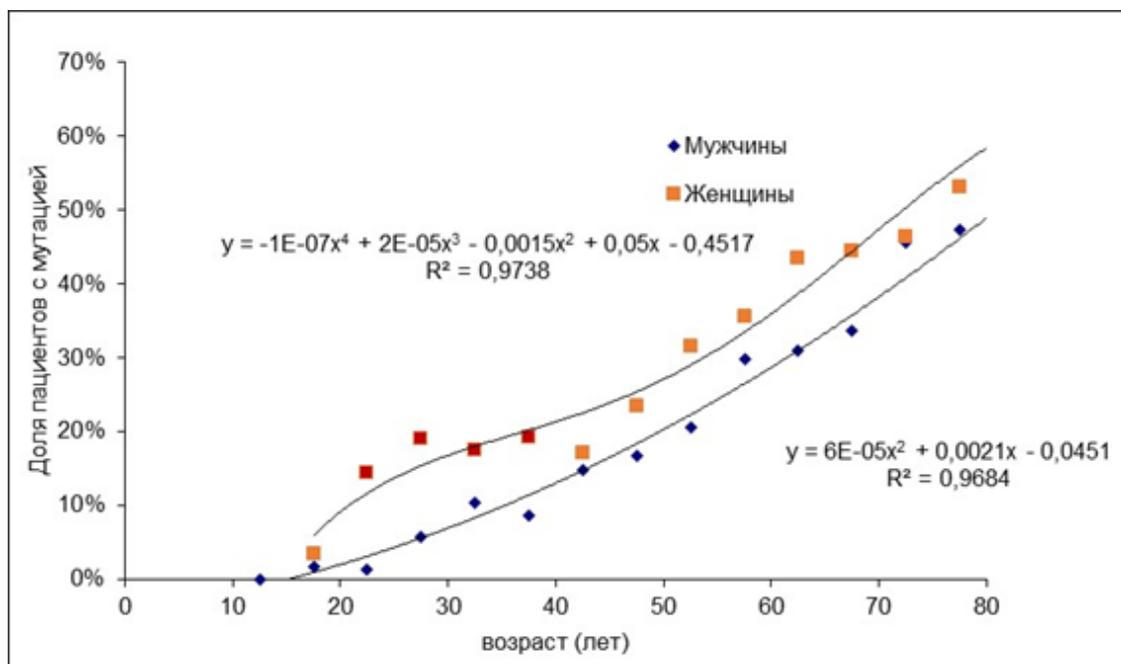


Рис.1. Возрастная зависимость частоты выявления мутации *JAK2 V617F* среди обследованных пациентов с клиническими проявлениями МПН и уровнем аллельной нагрузки выше 2%.

В возрасте от 20 до 80 лет у мужчин и женщин зависимость частоты выявления мутации хорошо описывается уравнениями полинома (см. рис.1), при этом у обследованных женщин в сравнении с мужчинами наблюдается более высокая частота выявления мутации в возрасте 20-40 лет. Частота обнаружения мутации у пациентов старше 85 лет снижается, однако небольшая

выборка пациентов в этой возрастной группе (менее 30 человек) уменьшает степень достоверности отличий и не анализируется в настоящем исследовании.

Результаты использования модели фазового перехода второго рода для описания возрастной динамики частоты мутации *JAK2 V617F* приведены на рис. 2.

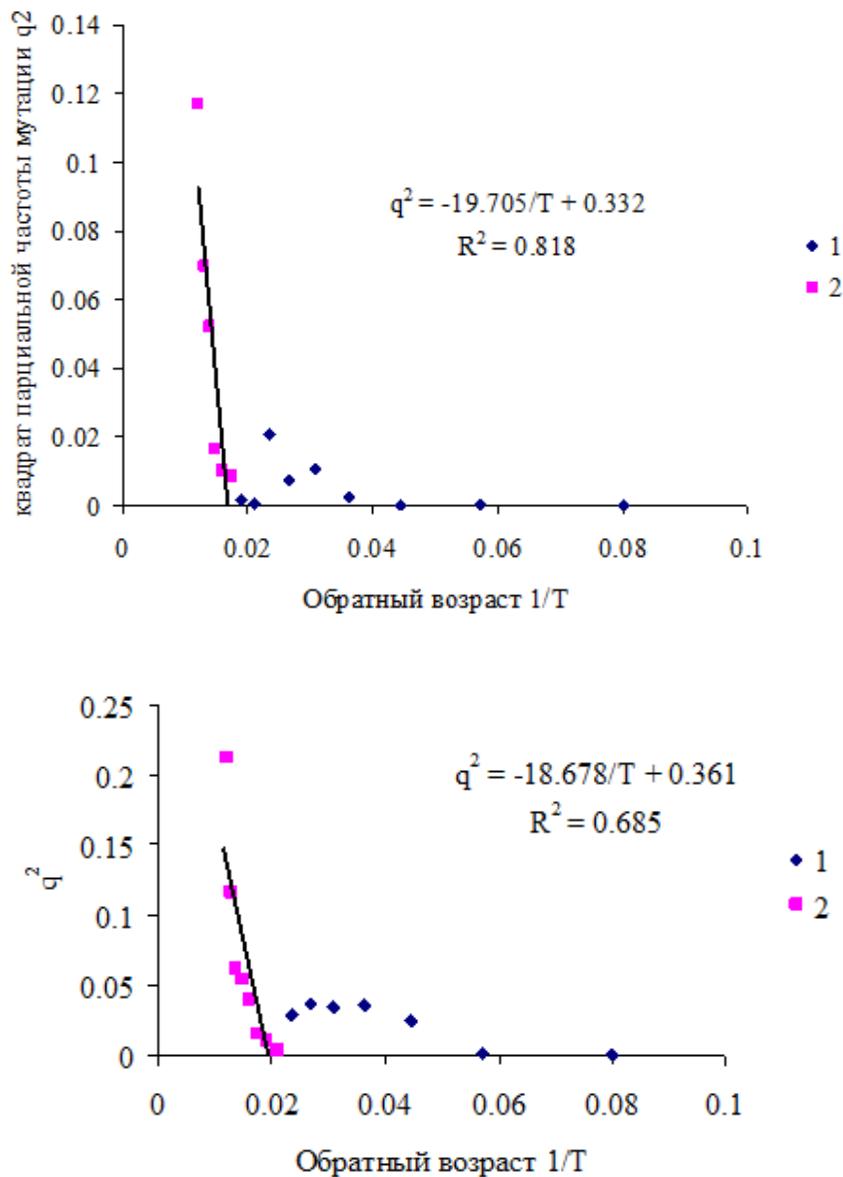


Рис. 2. Модель фазового перехода для возрастной зависимости выявления мутации *JAK2 V617F* у пациентов мужчин (А) и женщин (Б) с аллельной нагрузкой мутации более 2%. Фаза 1 – докритическая (ДКФ), фаза 2 – посткритическая (ПКФ).

На возрастной кривой в модели фазовых переходов можно выделить две фазы – докритическую (ДКФ) и посткритическую (ПКФ). Для каждой фазы можно написать уравнение связи:

$$q^2 = a - b/T \quad (2)$$

Уравнение (2) можно рассматривать как линейное регрессионное уравнение относительно переменных q^2 и $1/T$.

Резкий излом кривой (2) происходит при определенном значении обратного возраста $1/T_c$. Расчетный популяционный «критический» возраст смены фаз у женщин (46,1 года) происходит приблизительно на 5 лет раньше, чем у мужчин (51,5 года), хотя эти различия в нашей выборке оказались статистически не значимы. Коэффициенты линейного уравнения для описания ПКФ как для мужчин, так и для женщин отличаются от нуля ($p \leq 0,001$), что статистически подтверждает наличие излома

на возрастной кривой динамики мутаций и корректность использования модели фазовых переходов второго рода.

Частота выявления мутации *JAK2 V617F* на уровне менее 2% аллельной нагрузки в нашей выборке существенно не зависела от возраста обследованных пациентов (рис. 3) как у мужчин, так и у женщин. Частоты

выявления лиц с низкой нагрузкой среди пациентов с клиническими симптомами МПН во всех возрастных диапазонах превышают соответствующие значения среди пациентов из группы скрининга. Вместе с тем эти данные не могут быть описаны в формате модели фазового перехода.

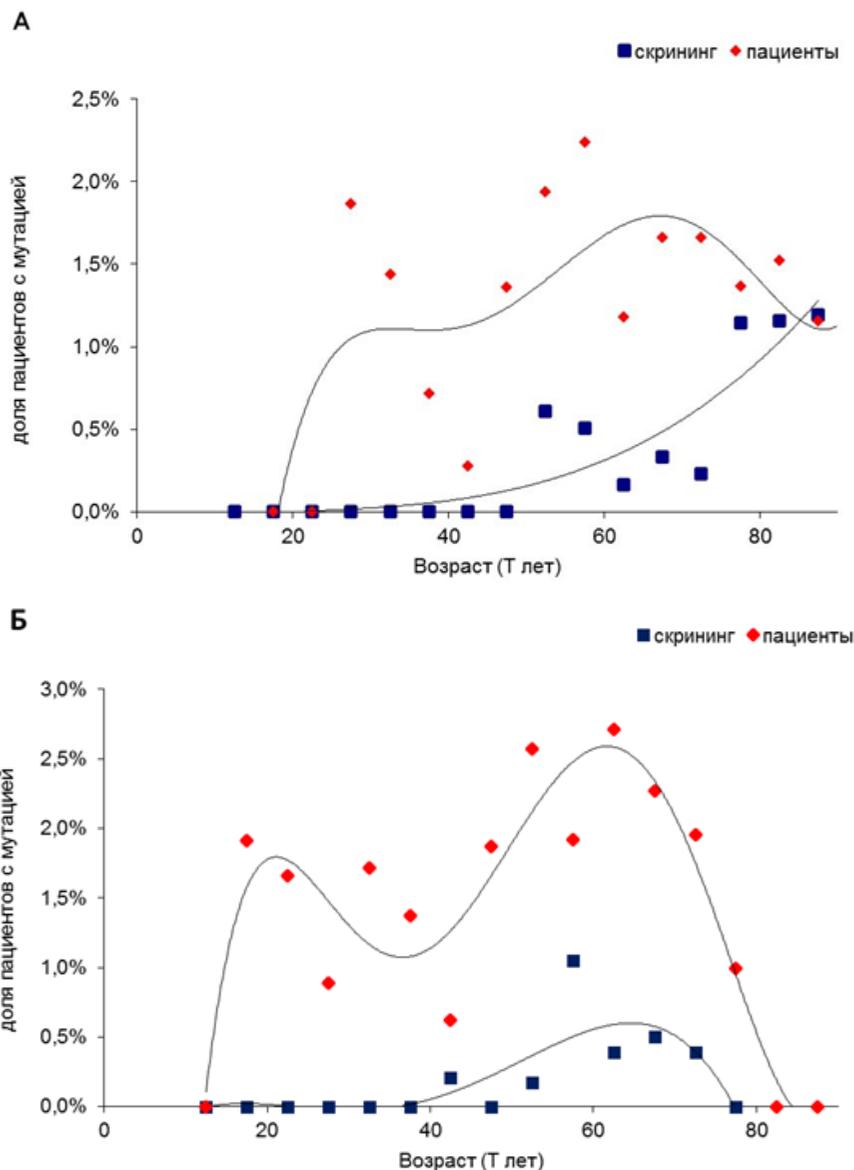


Рис. 3. Возрастная зависимость выявления мутации *JAK2 V617F* в группе пациентов и в группе скрининга (А - женщины, Б - мужчины) с аллельной нагрузкой мутации менее 2%.

Обсуждение. В настоящем исследовании при сравнении характеристик гендерной и возрастной зависимости частоты выявления *JAK2 V617F*-позитивных МПН и КГНП мы использовали критерий уровня аллельной нагрузки 2%, опираясь на литературные данные и клинические подтвержденные случаи у наших пациентов. Выбранный уровень, безусловно, не может являться абсолютным показателем наличия или отсутствия МПН, поскольку значения аллельной нагрузки при КГНП иногда могут достигать 10% [4], а значения

ниже 1,0% могут наблюдаться при клинически выраженном МПН, сочетаясь в ряде случаев с другими драйверными мутациями.

При этом в рутинном анализе с диагностическими тест-системами для качественной оценки результата обнаружения мутации *JAK2 V617F* в лабораториях редко используют контрольные материалы со значениями, близкими к порогу аналитической чувствительности, что потенциально увеличивает риск неправильной интерпретации. Результаты, представленные на рис.2, де-

монстрируют, что при подтвержденном диагнозе МПН действительно иногда обнаруживаются уровни нагрузки менее 2% в широком возрастном диапазоне, что характерно и для людей с КГНП. Возникает закономерный вопрос о патогенетических различиях вариантов МПН и особенностях интерпретации результатов при разных нагрузках *JAK2 V617F*, а также целесообразности использования высокочувствительных количественных тестов.

Зависимость частоты возникновения и значений уровня аллельной нагрузки мутации *JAK2 V617F* от возраста и пола пациентов обсуждается в ряде работ. J. Patterson-Fortin и соавторы [1] сравнивают данные популяционного исследования в Дании «Copenhagen general» [6,7] и выборки из базы данных международной компании «23 and Me» [8], которая также включала большой пул пациентов с МПН. Использование представленных в работе J. Patterson-Fortin и соавт. [1] табличных данных, объединенных всего в четыре возрастные когорты с 1 года до 112 лет при нашем пересчете, не противоречило модели фазового перехода второго рода, однако полноценный частотный анализ возрастной динамики по четырем когортам недостаточен для обоснованных выводов.

В опубликованных популяционных исследованиях мутация *JAK2 V617F*, связанная с КГНП, преобладала у мужчин, а в когорте пациентов с *JAK2 V617F*-позитивным МПН преобладали женщины. Это позволило Patterson-Fortin J. с соавт. [1] сформулировать «*JAK2 V617F*-парадокс»: *JAK2 V617F*-позитивный КГНП более характерен для мужчин, а для женщин мутация *JAK2 V617F* в большей степени связана с клиническими симптомами МПН. В нашей выборке пациентов с МПН соотношение мужчин и женщин было равным и различий в возрасте не наблюдалось, но частота выявления мутации у женщин была более высокой, чем у мужчин как в целом, так и в отдельных возрастных диапазонах (см. рис. 1). Интересно, что среди доноров крови *JAK2 V617F* позитивный КГНП выявлен нами только у мужчин, что подтверждает «*JAK2 V617F*-парадокс» и показывает различное диагностическое значение низких аллельных нагрузок у мужчин и женщин.

Использование нами модели фазового перехода второго рода позволило выделить два качественно разных возрастных периода в скорости накопления мутации среди обследованных нами пациентов и определить критический возраст, после которого интенсивность развития *JAK2 V617F*-позитивных МПН, но не КГНП, резко возрастает.

Следует отметить, что в случае анализа выявляемости низких уровней аллельной нагрузки, которые в большинстве случаев соответствуют *JAK2 V617F*-позитивному КГНП, модель фазовых переходов оказалась неприемлемой.

Поскольку динамика изменения параметра порядка в разных фазах описывается линейным уравнением, характеризуемым, в отличие от полиномиальных уравнений, всего двумя легко интерпретируемыми параметрами T_c – критическим возрастом мутационного

процесса и $b = \frac{\partial(q^2)}{\partial(\frac{1}{T})}$ – интенсивностью накопления

мутаций у пациентов с возрастом, появляется возможность использовать достаточно простые расчеты для прогноза и сравнения процессов в различных сложных системах. Наше исследование демонстрирует отличия возрастной и гендерной зависимости между *JAK2 V617F*-позитивными МПН и КГНП, что свидетельствует о различиях их патогенеза. Можно предполагать, что данный подход может быть также использован при оценке эффективности профилактических мероприятий, направленных на снижение риска развития заболевания.

Поскольку линейные уравнения более точно предсказывают результаты расчетов, предполагается, что их использование позволит с большей достоверностью оценить ожидаемое количество пациентов с МПН в зависимости от демографической ситуации в регионах. Сравнительная прогностическая способность данной модели с полиномиальными методиками будет представлена в дальнейших публикациях.

Применимость модели фазовых переходов второго рода к описанию не только физических, но также биологических и социальных систем отражает тот факт, что эта модель не зависит от особенностей конкретной моделируемой системы, а зависит прежде всего от числа параметров порядка, используемых для ее описания [25]. Постулируется, что все фазовые переходы второго рода, в которых для описания состояния системы используется один параметр порядка, схожи между собой.

Одно из объяснений фазового перехода второго типа в модели Ландау заключается в пороговом характере изменения внутренних характеристик сложных систем. Фазовый переход можно рассматривать как процесс возникновения нового качественного состояния упорядоченности во множестве случайно взаимодействующих элементов системы.

В нашем случае модель фазовых переходов была справедлива только для клинически значимого уровня (более 2%) аллельной нагрузки исследуемой мутации. Очевидно, с увеличением возраста в организме наблюдается накопление случайных соматических мутаций, обусловленное естественным ограничением репаративной способности генома. Часть таких мутаций в отдельных кловых клонах позволяет им получить определенные конкурентные пролиферативные преимущества, например, за счет сниженной зависимости от ростовых факторов при мутации в гене *JAK2*, что ведет к появлению КГНП, но не к неконтролируемой пролиферации и клинической манифестации заболевания.

В большинстве случаев с возрастом за счет различных соматических мутаций формируется приспособительное олигоклональное кроветворение, поддерживаемое сбалансированной эволюцией конкурирующих клонов и ограничивающим давлением иммунного надзора. Вместе с тем такой баланс не всегда устойчив и отдельные клоны могут монополизировать ресурсы кроветворения. Существенное увеличение интенсивности клональной экспансии, очевидно, может быть обусловлено параллельно возникающим развитием селективной иммунной толерантности и соответствующим качественным переходом в развернутую клиническую фазу заболевания.

Интересно, что возраст-зависимый процесс метилирования ДНК также в ряде случаев характеризуется экспоненциальным ростом. Так, в работе N.D. Johnson

и соавт. [26] обнаружено, что интенсивность метилирования двух сайтов cg07955995 и cg22285878 характеризуется быстрым увеличением с возрастом. В результате метилирования обозначенных сайтов увеличивается уровень экспрессии гена *FOXP3*, который индуцирует преобразование большого количества наивных CD14+25-T-клеток в CD14+25+ T-клетки (Treg), что определяет характер иммунного ответа. Обсуждение гипотезы участия в патогенезе МПН лимфоцитов, сохраняющих активный провоспалительный “эффektorный фенотип”, но без специфических цитотоксических способностей против MPN-мутированных клеток, приводится в статье V. Nasillo и соавторов [27]. Выявленные гендерные различия могут вполне объясняться известными отличиями процессов метилирования ДНК у мужчин и женщин.

Наш расчет представленных в работе N.D. Johnson и соавт. [26] данных о возрастной зависимости метилирования в моноклональных клетках крови продемонстрировал соответствие с моделью фазового перехода второго рода с близким критическим возрастом перехода, составляющим примерно 45 лет.

Таким образом, накопление после определенно-го возраста генетических изменений в кроветворных клетках может приводить к формированию относительно стабильного адаптивного варианта КГНП. Вместе с этим повышается риск дальнейшей потенциальной экспансии клонов, получивших конкурентные преимущества в пролиферации и выживании. Соответствие динамики этих процессов с моделью фазового перехода второго рода предполагает появление качественно новых устойчивых взаимодействий кроветворных клеток и клеток иммунного контроля. При этом процессы формирования *JAK2 V617F*-позитивных КГНП и МПН также имеют качественные отличия, которые требуют дальнейшего изучения.

Ограничения использования предложенной модели связаны с необходимостью обработки довольно большого объема выборки, данная модель менее чувствительна к отдельным флуктуациям, выявляемым на кривой полиномиальной зависимости. В связи с недостаточной для статистической оценки выборкой пациентов в работе не проводился анализ по отдельным нозологическим вариантам МПН. Хотя группы пациентов сбалансированы по возрасту и половому составу, объединение отдельных когорт доноров крови и пациентов из разных клинических отделений не позволяет считать данное исследование строго популяционным. Тем не менее, полученные результаты позволяют сформулировать достоверные заключения о возможности использования модели фазовых переходов второго рода и различиях возраст-зависимых механизмов формирования КГНП и группы *JAK2 V617F*-позитивных МПН. В дальнейшем, по мере набора результатов в дополнительных выборках, планируется апробация прогностических возможностей представленной модели для расчета конкретных уровней ожидаемой заболеваемости МПН в зависимости от демографической ситуации в регионе.

Заключение. Возрастная зависимость частоты выявления мутации *JAK2 V617F* у пациентов с МПН при уровне аллельной нагрузки более 2% статистически достоверно описывается с использованием модели фазо-

вого перехода второго рода Л. Ландау, что предполагает пороговое появление качественно новых взаимодействий в процессе клонального гемопоэза с вероятным вовлечением возрастных эпигенетических механизмов нарушения иммунологического надзора. Важным практическим следствием анализа полученных данных является целесообразность учета различий диагностической значимости разных уровней аллельной нагрузки, а также гендерной зависимости диагностической значимости теста при низких уровнях *JAK2 V617F* у мужчин и женщин.

ЛИТЕРАТУРА (П.П. 1, 4 - 8, 12-15, 17-19, 25-27 СМ. REFERENCES)

2. Меликян А.Л., Ковригина А.М., Суборцева И.Н., Шуваев В.А., Морозова Е.В., Ломаиа Е.Г. и др. Клинические рекомендации по диагностике и терапии Ph-негативных миелопролиферативных заболеваний (истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия, первичный миелофиброз) (ред. 2020 г.). *Клиническая онкогематология*. 2021; 14(2): 262-98.
3. Абдулкадыров К.М., Шуваев В.А., Мартынкевич И.С. Миелопролиферативные новообразования. М.: Литтерра; 2016.
9. Ольховский И.А., Филина Н.Г., Горбенко А.С., Столяр М.А., Колотвина Т.Б., Субботина Т.Н. Частота обнаружения мутации гена *JAK2* среди доноров крови. *Гематология и трансфузиология*. 2018; 63(1):65-70. DOI: 10.25837/HAT.2018.49..1..006.
10. Ольховский И. А., Горбенко А. С., Столяр М. А., Грищенко Д.А., Ткаченко О.А., Марцинкевич Т.Л. Частота выявления соматической мутации *V617F* в гене *JAK2* у пациентов с сердечно - сосудистой патологией. *Терапевтический архив*. 2019; 91(7):25-8. DOI: 10.26442/00403660.2019.07.000245.
11. Ольховский И.А., Карапетян Г.Э., Горбенко А.С., Субботина Т.Н., Столяр М.А. и др. Выявляемость пациентов с онкогенной соматической мутацией янускиназы-2 (*V617F JAK2*) в рамках программ диспансерного и профилактического осмотров. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(5):275-8.
16. Ольховский И.А., Столяр М.А., Комаровский Ю.Ю., Горбенко А.С., Корчагин В.И., Дунаева Е.А. и др. Исследование ассоциации гаплотипа 46/1 гена янус-киназы 2 (*JAK2*) и драйверных мутаций хронических Ph-негативных миелопролиферативных новообразований. *Гематология и трансфузиология*. 2022; 67(3):377-87.
20. Обеснюк В.Ф. Возрастная динамика интенсивности онкологической заболеваемости указывает на существование уязвимых подгрупп. *Анализ риска здоровью*. 2023;3:29–38. DOI: 10.21668/health.risk/2023.3.03.
21. Суховольский В.Г., Иванова Ю.Д., Shulman K., Мажаров В.Ф., Тарасова И.В., Тарасова О.В., Хлебопрос Р.Г. Популяционная динамика онкозаболеваний: модель фазового перехода второго рода. *Биофизика*. 2015; 60(4):777-86.
22. Ландау Л.Д. К теории фазовых переходов. ЖЭТФ. 1937; 7:19 - 32.
23. Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. Статистическая физика. М.: Наука; 1964.
24. Горбенко А.С., Столяр М.А., Субботина Т.Н., Михалёв М.А., Ольховский И.А. Разработка метода определения аллельной нагрузки соматической мутации *V617F* в гене *JAK2* (янус-киназы-2) в пулах проб венозной крови. *Лабораторная служба*. 2016; 5(1):19-25. DOI: 10.17116/labs20165119-25.

REFERENCES

1. Patterson-Fortin J., Moliterno A.R. Molecular Pathogenesis of Myeloproliferative Neoplasms: Influence of Age and Gender. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* 2017; 12(5):424-31. DOI: 10.1007/s11899-017-0411-0.
2. Melikyan A.L., Kovrigina A.M., Subortseva I.N., Shuvaev V.A., Morozova E.V., Lomaia E.G. et al. National Clinical Guidelines on Diagnosis and Treatment of Ph-Negative Myeloproliferative Neoplasms (Polycythemia Vera, Essential Thrombocythemia, and Primary Myelofibrosis) (ed. 2020). *Klinicheskaya onkogematologiya*. 2021; 14(2):262-98. (in Russian)
3. Abdulkadyrov K.M., Shuvaev V.A., Martynkevich I.S.

- Myeloproliferative diseases. Moscow: Litterra; 2016. (in Russian)
4. Stuckey R., Bilbao-Sieyro C., Segura-Díaz A., Gómez-Casares M.T. Molecular Studies for the Early Detection of Philadelphia-Negative Myeloproliferative Neoplasms. *Int. J. Mol. Sci.* 2023; 24(16):12700. DOI: 10.3390/ijms241612700.
 5. Xu X., Zhang Q., Luo J., Xing S., Li Q., Krantz S.B. et al. JAK2V617F: prevalence in a large Chinese hospital population. *Blood.* 2007; 109(1):339-42. DOI: 10.1182/blood-2006-03-009472.
 6. Nielsen C., Birgens H.S., Nordestgaard B.G., Bojesen S.E. Diagnostic value of JAK2 V617F somatic mutation for myeloproliferative cancer in 49 488 individuals from the general population. *Br. J. Haematol.* 2013;160(1):70–9. DOI: 10.1111/bjh.12099.
 7. Nielsen C., Bojesen S.E., Nordestgaard B.G., Kofoed K.F., Birgens H.S. JAK2V617F somatic mutation in the general population: myeloproliferative neoplasm development and progression rate. *Haematologica.* 2014; 99(9):1448-55. DOI: 10.3324/haematol.2014.107631.
 8. Hinds D.A., Barnholt K.E., Mesa R.A., Kiefer A.K., Do C.B., Eriksson N. et al. Germ line variants predispose to both JAK2 V617F clonal hematopoiesis and myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2016; 128(8):1121–8. DOI: 10.1182/blood-2015-06-652941.
 9. Olkhovskiy I.A., Filina N.G., Gorbenko A.S., Stolyar M.A., Kolotvina T.B., Subbotina T.N. Prevalence of mutations in JAK2 among blood donors. *Gematologiya I transfuziologiya.* 2018; 63(1):65-70. (in Russian)
 10. Olkhovskiy I.A., Gorbenko A.S., Stolyar M.A., Grischenko D.A., Tkachenko O.A., Martsinkevich T.L. Somatic mutation of the V617F JAK2 gene in patients of the cardiovascular diseases. *Terapevticheskij arkhiv.* 2019; 91(7):25-8. DOI: 10.26442/00403660.2019.07.000245. (in Russian)
 11. Olkhovskiy I.A., Karapetyan G.E., Gorbenko A.S., Subbotina T.N., Stolyar M.A., Dyupina T.N. et al. The identifiability of patients with carcinogenic somatic mutation of Junus kinase-2 (V617F/JAK2) within the framework of programs of dispensary and preventive examinations. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2016; 61(5):275-8. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-5-275-278. (in Russian)
 12. Perner F., Perner C., Ernst T., Heidel F.H. Roles of JAK2 in Aging, Inflammation, Hematopoiesis and Malignant Transformation. *Cells.* 2019; 8(8):854. DOI: 10.3390/cells8080854.
 13. Bick A.G., Weinstock J.S., Nandakumar S.K., Fulco C.P., Bao E.L., Zekavat S.M. et al. Inherited causes of clonal haematopoiesis in 97,691 whole genomes. *Nature.* 2020; 586(7831):763-768. DOI: 10.1038/s41586-020-2819-2.
 14. Robertson N.A., Latorre-Crespo E., Terradas-Terradas M., Lemos-Portela J., Purcell A.C., Livesey B.J. et al. Longitudinal dynamics of clonal hematopoiesis identifies gene-specific fitness effects. *Nat. Med.* 2022; 28(7):1439-46. DOI: 10.1038/s41591-022-01883-3.
 15. Belotserkovskaya E., Golotin V., Uyanik B., Demidov O.N. Clonal haematopoiesis - a novel entity that modifies pathological processes in elderly. *Cell Death. Discov.* 2023; 9(1):345. DOI: 10.1038/s41420-023-01590-z.
 16. Olkhovskiy I.A., Stolyar M.A., Komarovskiy Yu.Yu., Gorbenko A.S., Korchagin V.I., Dunaeva E.A. et al. Study of the Janus kinase 2 (JAK2) gene haplotype 46/1 association with driver mutations of chronic Ph-negative myeloproliferative neoplasms. *Gematologiya i transfuziologiya.* 2022; 67(3):377-87. DOI: 10.35754/0234-5730-2022-67-3-377-387 (in Russian)
 17. Guo J., Walter K., Quiros P.M., Gu M., Baxter E.J., Danesh J. et al. Inherited polygenic effects on common hematological traits influence clonal selection on JAK2V617F and the development of myeloproliferative neoplasms. *Nat. Genet.* 2024; 56(2):273-80. DOI: 10.1038/s41588-023-01638-x.
 18. Warren J.T., Link D.C. Clonal hematopoiesis and risk for hematologic malignancy. *Blood.* 2020; 136(14):1599-1605. DOI: 10.1182/blood.2019000991.
 19. Karantanos T., Kaizer H., Chaturvedi S., Resar L.M.S., Moliterno A.R. Inflammation exerts a nonrandom risk in the acquisition and progression of the MPN: Insights from a Mendelian randomization study. *EClinical Medicine.* 2020; 21:100324. DOI: 10.1016/j.eclinm.2020.100324.
 20. Obesnyuk V.F. Age dynamics of cancer incidence intensity indicates existence of some frailty subgroups. *Analiz riska zdorov'yu.* 2023; 3:29–38. DOI: 10.21668/health.risk/2023.3.03.eng. (in Russian)
 21. Soukhovolsky V.G., Ivanova Y.D., Shulman K., Mazharov V.F., Tarasova I.V., Tarasova O.V. et al. Population Dynamics of Cancer: A Model of Second Order Phase Transition. *Biofizika.* 2015; 60(4):777-86. (in Russian)
 22. Landau L.D. Towards the theory of phase transitions. *JETP.* 1937; 7:19-32. (in Russian)
 23. Landau L.D. Lifshic E.M. Statistical physics. Moscow:Nauka;1964. (in Russian)
 24. Gorbenko A.S., Stolyar M.A., Subbotina T.N., Mihalev M.A., Olkhovskiy I.A. Developing method for allelic somatic mutations burden of Janus kinase 2 (V617F JAK2) detection in pools of venous blood samples. *Laboratornaya sluzhba* 2016; 5(1):19-25. DOI: 10.17116/labs20165119-25. (in Russian)
 25. Bruce A.D., Cowley R.A. Structural Phase Transitions. Taylor & Francis;1984.
 26. Johnson N.D., Wiener H.W., Smith A.K., Nishitani S., Absher D.M., Arnett D.K. et al. Non-linear patterns in age-related DNA methylation may reflect CD4+ T cell differentiation. *Epigenetics.* 2017; 12(6):492-503. DOI: 10.1080/15592294.2017.1314419.
 27. Nasillo V., Riva G., Paolini A., Forghieri F., Roncati L., Lusenti B. et al. Inflammatory Microenvironment and Specific T Cells in Myeloproliferative Neoplasms: Immunopathogenesis and Novel Immunotherapies. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22(4):1906. DOI: 10.3390/ijms22041906.

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Костинов А.М.¹, Конищева А.Ю.¹, Протасов А.Д.², Костинов М.П.^{1,3}, Ястребова Н.Е.¹, Харсеева Г.Г.⁴, Полищук В.Б.¹, Андреева Н.П.⁵

ЛАБОРАТОРНЫЕ МАРКЁРЫ (ИФН-Г, ИЛ-10) КАК ПОКАЗАТЕЛИ КЛИНИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ВАКЦИНАЦИИ ПРОТИВ ПНЕВМОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ БОЛЬНЫХ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, г. Москва, Россия;

²ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 443099, г. Самара, Россия;

³ФГАУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова» Минздрава РФ (Сеченовский Университет), 119048, г. Москва, Россия;

⁴ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 344022, г. Ростов-на-Дону, Россия;

⁵ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова», 428015, г. Чебоксары, Чувашская Республика, Россия

Streptococcus pneumoniae – один из приоритетных патогенов, выделяемых из носоглотки больных с бронхиальной астмой (БА), провоцирующий развитие локальных воспалительных реакций, системную сенсибилизацию организма и обострение БА. Пневмококковые вакцины показывают высокую клиническую эффективность в части снижения числа обострений БА, но рекомендации GINA не включают плановую иммунизацию пациентов из-за недостатка комплексных исследований, оценивающих реакции врожденного и адаптивного иммунитета больных БА при использовании различных вариантов пневмококковых вакцин и их комбинаций.

Цель исследования – установить ассоциативные изменения лабораторных маркёров врожденного иммунитета (ИФН-γ и ИЛ-10) и клинического эффекта вакцинации ПКВ13 взрослых лиц с бронхиальной астмой.

Материал и методы. Исследованы сыворотки крови пациентов с БА, иммунизированных ПКВ13 и их индивидуальные клинические карты. Содержание ИФН-γ, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-18, ФНО-α, МСР-1 определено методом ИФА. Результаты. Исследования свидетельствуют о положительном клиническом эффекте вакцинации ПКВ13 у пациентов с БА, связанном с уменьшением числа пациентов с обострениями (на 81,5%, $p < 0,001$) и увеличением количества пациентов без госпитализаций (на 76,5%, $p < 0,001$) в течение года наблюдения. Для пациентов с лёгкой степенью тяжести БА и тех, кто демонстрировал снижение числа обострений, отмечено выраженное повышение содержания ИФН-γ в сыворотке крови спустя 6 недель после вакцинации. У пациентов с повышенным уровнем общего IgE на первом визите отмечено характерное увеличение содержания ИЛ-10 через 6 мес. после вакцинации.

Заключение. Иммунизация пациентов с БА ПКВ13 снижает риск развития обострений и число госпитализаций, повышая уровень контроля заболевания по сравнению с довакцинальным периодом. Лабораторные показатели, свидетельствующие о повышенном уровне ИФН-γ

Ключевые слова: бронхиальная астма; Превенар 13 (ПКВ13); ИФН-γ; ИЛ-10; цитокины

Для цитирования: Костинов А.М., Конищева А.Ю., Протасов А.Д., Костинов М.П., Ястребова Н.Е., Харсеева Г.Г., Полищук В.Б., Андреева Н.П. Лабораторные маркёры врожденного иммунитета, как показатели эффективности вакцинации ПКВ13 больных с бронхиальной астмой. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69 (10): 513-519.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-10-513-519>

Для корреспонденции: Костинов Антон Михайлович, аспирант лаборатории аллергодиагностики ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова; e-mail: amkostinov@gmail.com

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках отраслевой программы.

Поступила 26.07.2024

Принята к печати 26.08.2024

Опубликовано 00.10.2024

Kostinov A.M.¹, Konishcheva A.Yu.¹, Protasov A.D.², Kostinov M.P.^{1,3}, Yastrebova N.E.¹, Kharseeva G.G.⁴, Polishchuk V.B.¹, Andreeva N.P.⁵

LABORATORY MARKERS (IFN-Г, IL-10) AS INDICATORS OF THE EFFECTIVENESS OF PCV13 VACCINATION IN PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA

¹I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Serums, 105064, Moscow, Russia

²Samara State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Samara, 443099, Russia

³I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 119048, Moscow, Russia

⁴Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Rostov Region, 344022, Russian Federation

⁵I.N. Ulianov Chuvash State University, 428015, Cheboksary, Chuvash Republic, Russia

Streptococcus pneumoniae is one of the priority pathogens isolated from the nasopharynx of patients with bronchial asthma (AB), provoking the development of local inflammatory reactions and systemic sensitization, acting as a trigger for exacerbations of AB. Pneumococcal vaccines show high clinical efficacy in reducing the number of exacerbations of AB, but the GINA recommendations do not include routine immunization of patients due to the lack of comprehensive studies evaluating the reactions of congenital and adaptive immunity of patients with AB when using various variants of pneumococcal vaccines and their combinations.

The aim of the study was to determine laboratory markers of innate immunity (IFN- γ and IL-10) as indicators of the effectiveness of PCV13 vaccination in adult patients with bronchial asthma. Blood sera of patients with AB immunized with PCV13 and their individual clinical records were studied. The content of IFN- γ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, TNF- α , MCP-1 was determined by ELISA.

Outcomes. Studies show a positive clinical effect of PCV13 vaccination in patients with AB, associated with a decrease in the number of patients with exacerbations (by 81.5%, $p < 0.001$) and an increase in the number of patients without hospitalization (by 76.5%, $p < 0.001$) during the year of follow-up. For patients with mild AB severity and those who showed a decrease in the number of exacerbations, there was a marked increase in serum inf- γ 6 weeks after vaccination. with an increased level of total IgE at the first visit, a characteristic increase in the content of IL-10 was noted after 6 months. after vaccination.

Conclusion. Immunization of patients with AB PCV13 reduces the risk of exacerbations and the number of hospitalizations, increasing the level of disease control compared to the pre-vaccination period. Laboratory values indicating an increased level of IFN- γ are associated with a decrease in the incidence of exacerbations of AB. In patients with AB, an increase in IL-10 is associated with an increase in total IgE levels.

Key words: bronchial asthma; Prevenar 13 (PCV13); IFN- γ ; IL-10; cytokines

For citation: Kostinov A.M., Konishcheva A.Yu., Protasov A.D., Kostinov M.P., Yastrebova N.E., Kharseeva G.G., Polishchuk V.B., Andreeva N.P. Laboratory markers of innate immunity as indicators of the effectiveness of PCV13 vaccination in patients with bronchial asthma. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (10): 513-519 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-10-513-519>

For correspondence: Kostinov A.M., Postgraduate Student, Laboratory of Allergy Diagnostics, I.I. Mechnikov Research Institute of Radiation Diagnostics; e-mail: amkostinov@gmail.com

Information about authors:

Kostinov A.M., <https://orcid.org/0000-0001-9665-1382>;

Konishcheva A.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-3623-4293>;

Protasov A.D., <https://orcid.org/0000-0001-8452-5776>;

Kostinov M.P., <https://orcid.org/0000-0002-1382-9403>;

Yastrebova N.E., <https://orcid.org/0000-0002-6911-1345>;

Kharseeva G.G., <https://orcid.org/0000-0002-6226-2183>;

Polishchuk V.B., <https://orcid.org/0000-0003-0539-0909>;

Andreeva N.P., <https://orcid.org/0000-0002-1989-3334>.

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

Financing. The study was carried out within the framework of the industry program.

Received 26.07.2024

Accepted 26.08.2024

Published 00.10.2024

Введение. Бронхиальная астма (БА), характеризующаяся широкой распространённостью (до 10% популяции в развитых странах), высокой частотой смертности (до 10 смертей на 100 тыс. случаев заболевания) и инвалидизации, является гетерогенным заболеванием, обусловленным нарушениями регуляции иммунного ответа: возникновением дисбаланса между популяциями Th₁, Th₂, Th₁₇, T_{reg}, НКТ-клетками и компонентами врождённого иммунитета [1, 2]. Хроническое воспаление при БА в условиях сниженной колонизационной резистентности дыхательных путей пациентов часто обусловлено реакцией гиперчувствительности к антигенам бактерий, особенно *Streptococcus pneumoniae* [3, 4].

S. pneumoniae является одним из приоритетных патогенов, выделяемых из носоглотки больных с БА [5]. Воздействие *S. pneumoniae* на организм пациентов с БА часто ведёт к развитию осложнений, хронизации заболевания, летальности [6-9]. У пациентов с БА *S. pneumoniae* способен оказывать прямое и косвенное воздей-

ствие на организм: провоцировать развитие локальных воспалительных реакций в дыхательных путях и приводить к системной сенсibilизации. Пневмококковую инфекцию рассматривают как один из ведущих факторов развития обострений БА [1].

Широкую распространённость получили исследования, направленные на изучение эффекта применения пневмококковых конъюгированных и полисахаридных вакцин и препаратов на основе *S. pneumoniae* или их компонентов не только в качестве профилактического агента, но и иммунорегуляторного терапевтического средства для снижения числа обострений БА [10-16]. Несмотря на имеющиеся данные о клинической эффективности пневмококковых вакцин у больных с БА, согласительный документ GINA [1] до сих пор не вносит в рекомендации плановую вакцинацию против пневмококковой инфекции для пациентов с БА, аргументируя это недостатком качественных масштабных исследований по данной проблеме. На сегодняшний день отсутствуют комплекс-

ные работы, содержащие оценку реакций врождённого и адаптивного иммунитета среди пациентов с БА в ответ на введение различных пневмококковых вакцин и их комбинаций.

Цель исследования – установить ассоциативные изменения лабораторных маркёров врождённого иммунитета (ИФН- γ и ИЛ-10) и клинического эффекта вакцинации ПКВ13 взрослых с бронхиальной астмой.

Материал и методы. Текущее одноцентровое, открытое, нерандомизированное, проспективное, когортное, контролируемое исследование проводилось в сроки с февраля 2019 года по октябрь 2020 года на базе отделений пульмонологии и аллергологии клиник ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, лаборатории аллергодиагностики ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова» с использованием сертифицированного оборудования Центра коллективного пользования ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова».

Исследованы образцы сыворотки крови пациентов

($n=31$) в возрасте от 18 до 80 лет с установленным диагнозом БА в соответствии с GINA, их индивидуальные клинические карты.

Критерии включения: пациенты, ранее непривитые против пневмококковой инфекции; отсутствие других хронических заболеваний; без наличия острых инфекционных заболеваний на момент начала проведения исследования; наличие письменного информированного согласия на участие в исследовании.

Критерии исключения: несоблюдение протокола исследования; отказ от дальнейшего участия в исследовании.

Критерии невключения: вакцинация против пневмококковой инфекции в анамнезе, применение препаратов иммуноглобулина или переливание крови в течение трёх последних месяцев до начала исследования; вакцинация против гриппа и других инфекций на период исследования.

Характеристика включенных в исследование пациентов представлена в табл. 1.

Таблица 1

Характеристика включенных в исследование пациентов с БА

Параметры	Значения
Число пациентов, абс.	31
Длительность БА, годы; медиана (Q ₁ -Q ₃)	7,0 (3-20)
Число обострений на пациента за последние 12 месяцев; среднее значение (стандартное отклонение)	2,3 (2,3)
Число госпитализаций на пациента за последние 12 месяцев; среднее значение (стандартное отклонение)	0,7 (1,1)
Тяжесть БА; абс. (%):	
легкая (интермиттирующая/ персистирующая)	12 (38,7)
средняя	13 (41,9)
тяжелая	6 (19,4)
Степень контроля БА; абс. (%):	
контролируемая	10 (32,2)
частично контролируемая	2 (6,5)
неконтролируемая	19 (61,3)
Наличие атопических заболеваний в анамнезе; абс. (%)	10 (32,3)
Эндотип БА; абс. (%):	
с высоким T2-воспалением	14 (45,2)
с низким T2-воспалением	17 (54,8)
Суточная доза ИГКС; абс. (%):	
нет	5 (16,1)
низкая	8 (25,8)
средняя	18 (58,1)
высокая	0 (0,0)

Клиническую картину заболевания оценивали в соответствии с изменениями следующих параметров: количество обострений и госпитализаций, наблюдающееся за год до и после вакцинации; число пациентов с обострениями (госпитализациями) и среднее число обострений (госпитализаций по поводу) БА на 1 пациента за год до и после проведения исследования, уровень контроля заболевания, оцениваемый с использованием вопросника ACQ-5 (Asthma Control Questionnaire).

В части иммунологических исследований проведено измерение содержания панели Th₁/Th₂/Treg цитокинов, общего IgE в сыворотке крови. При рассмотрении

панели цитокинов регистрировали изменения в содержании ИФН- γ в сыворотке не отличались от довакцинальных значений.

При рассмотрении прочих определяемых в исследовании цитокинов стоит отметить, что статистически значимых изменений в их динамике на протяжении периода наблюдений не обнаружено, однако различия сохранялись между отдельными подгруппами пациентов. Анализируя содержание регуляторного цитокина ИЛ-10, отмечено его значительно более высокое содержание в сыворотке крови у пациентов с повышенным уровнем общего IgE на первом визите, особенно через 6 месяцев после вакцинации ($p<0,05$), несмотря на отсутствие

данной закономерности при рассмотрении эндотипов БА (табл. 4).

Обсуждение. При хронических бронхолегочных заболеваниях, таких как БА, *S. pneumoniae* рассматрива-

ется в качестве одного из важнейших этиологических факторов, что дополнительно обосновывает практическую значимость профилактических мероприятий у этих пациентов. В ходе проведенного исследования

Таблица 2

Клинические характеристики течения БА у пациентов, вакцинированных ПКВ13

Параметры	Временной период		Изменения
	12 месяцев до вакцинации	12 месяцев после вакцинации	
Число пациентов с обострениями, абс. (%)	27 (87,1)	5 (16,1)	İ
Число пациентов без госпитализаций, абс. (%)	17 (54,8)	30 (96,8)	13
Число пациентов с контролируемой степенью БА, абс. (%)	10 (32,3)	15 (48,4)	
Средний балл ACQ-5 на конец периода, среднее (СО) [min; медиана; max]	1,69 (1,21) [0,00; 1,80; 4,60]	0,94 (0,96) [0,00; 0,80; 4,20]	İ

Таблица 3

Концентрация ИФН-γ

Параметр	Временные точки				
	исходно	6 недель	6 месяцев	12 месяцев	p
Тяжесть БА					
Легкая	0,00 [0,00; 1,23]	0,78 [0,00; 3,51]	0,00 [0,00; 2,30]	0,00 [0,00; 1,79]	0,011
Средняя	0,00 [0,00; 1,96]	0,00 [0,00; 0,75]	0,00 [0,00; 2,69]	0,00 [0,00; 1,14]	0,963
Тяжелая	0,00 [0,00; 0,15]	1,56 (1,49) [0,00; 1,60; 3,27]	0,00 [0,00; 0,00]	0,00 [0,00; 0,69]	0,036
Динамика числа обострений (в сравнении с 12 мес до вакцинации)					
Сократилось	0,00 [0,00; 1,42]	0,51 [0,00; 2,87]	0,00 [0,00; 2,30]	0,00 [0,00; 1,26]	0,006
Без изменений	0,00 [0,00; 0,00]	0,00 [0,00; 0,00]	0,00 [0,00; 0,00]	0,00 [0,00; 0,00]	–
Увеличилось	–	–	–	–	–
Динамика числа госпитализаций (в сравнении с 12 мес до вакцинации)					
Сократилось	0,00 [0,00; 0,00]	0,15 [0,00; 1,54]	0,00 [0,00; 0,00]	0,00 [0,00; 0,97]	0,432
Без изменений	0,07 [0,00; 1,13]	0,16 [0,00; 3,51]	0,00 [0,00; 2,30]	0,00 [0,00; 0,88]	0,007
Увеличилось	–	–	–	–	–

Примечание. Здесь и в табл.4: данные, соответствующие нормальному распределению, представлены как среднее (СО) [min; медиана; max], не соответствующие – в виде медианы [Q₁; Q₃]. Жирным шрифтом выделено наличие достоверных отличий.

Таблица 4

Содержание ИЛ-10 (пг/мл) в сыворотке крови пациентов с БА после вакцинации ПКВ13 в зависимости от эндотипа заболевания и сопутствующих ему параметров

Параметры	Временные точки	
	6 недель	6 месяцев
Эндотип БА		
Высокое T2-воспаление	2,12 (2,00) [0,00; 1,61; 5,49]	2,86 (2,61) [0,00; 2,55; 7,60]
Низкое T2-воспаление	0,61 [0,00; 2,88]	1,05 [0,03; 3,54]
p	0,430	0,196
Атопия в анамнезе		
Отсутствует	1,08 [0,20; 4,05]	1,42 (1,75) [0,00; 0,53; 5,05]
Присутствует	0,71 [0,00; 1,67]	0,53 [0,09; 2,87]
p	0,391	0,302
Уровень общего IgE-АТ при первом визите (исходно)		
Общий IgE-АТ в норме	0,88 [0,00; 2,88]	0,56 [0,03; 3,32]
Общий IgE-АТ Повышенный	2,27 (2,02) [0,00; 1,67; 5,49]	3,58 (2,35) [0,00; 3,49; 7,50]
p	0,282	0,015

подтверждены данные других авторов о том, что иммунизация пациентов с БА ПКВ13 значительно снижает риски возникновения обострения БА и госпитализации по её поводу [20-25].

Наблюдающееся улучшение клинической картины БА, сопровождающее иммунизацию против пневмококковой инфекции с использованием конъюгированной вакцины, может быть обусловлено различными факторами, среди которых стоит отметить влияние вакцины на функциональную активность эффекторов системы врождённого и адаптивного иммунитета и изменения в микробиоценозе дыхательных путей. ПКВ13 активирует не только гуморальное звено иммунитета с формированием специфических антител, но и молекулярно-клеточные механизмы, сопровождающиеся увеличением числа $CD_3^+CD_4^+$, $CD_3^+CD_8^+$, $CD_3^+CD_{16}^+CD_{56}^+$, CD_{19}^+ , CD_3 -HLA DR⁺, CD_3 -HLA DR⁺ лимфоцитов [26, 27]. Конъюгированная вакцина способствует образованию Т-клеток иммунологической памяти, экспрессирующих CD_{45RO} антиген и сохраняющихся в организме в течение длительного времени [27]. Наличие этих клеток у пациентов с БА является необходимым условием для формирования иммунного ответа на антигены различной специфичности, в том числе, и пневмококковые [28].

Положительный клинический эффект от вакцинации может быть обусловлен изменениями в микробиоценозе мокроты пациентов с БА [29, 30]. Вакцинация против пневмококка препятствует колонизации слизистой оболочки дыхательного тракта и способствует элиминации уже присутствующих микроорганизмов, что снижает вероятность обострения заболевания на фоне возникновения инфекций. Многие исследования демонстрируют элиминацию *S. pneumoniae* из мокроты в 88% случаев, что связывают с формированием мукозального иммунитета [20]. Проведенные микробиологические исследования показали, что через 1 и 4 года у пациентов с БА, привитых конъюгированной полисахаридной вакциной, частота выделения *S. pneumoniae* значительно снижается по сравнению с довакцинальными показателями [23].

Одним из ключевых результатов, полученных при исследовании содержания в сыворотке крови пациентов с БА цитокинов (ИФН- γ , ИЛ-4, ИЛ-6, TNF- α , MCP-1, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-18), являются данные о повышении содержания ИФН- γ после вакцинации. Это дополняет перечисленные выше факторы, обуславливающие положительное клиническое воздействие вакцинации у пациентов с БА. Повышение содержания ИФН- γ в сыворотке крови отмечено прежде всего у пациентов, характеризующихся снижением числа обострений заболевания по сравнению с довакцинальным периодом.

ИФН- γ играет существенную роль в нормализации дисбаланса между субпопуляциями Th₁- и Th₂-лимфоцитов у пациентов с БА. Действительно, низкие уровни этого цитокина опосредуют аллергическую реакцию дыхательных путей посредством рекрутирования воспалительных клеток и усиления презентации антигена. В то же время высокие уровни ИФН- γ ведёт к повышенной защите от внутриклеточных патогенов, в первую очередь вирусов.

Результаты показали, что содержание ИЛ-10 в сыворотке крови пациентов с БА что после вакцинации ПКВ13 в зависимости от эндотипа заболевания и сопут-

ствующим ему параметров достоверно не изменялись. Стоит отметить, что ИЛ-10 подавляет гиперреактивность и эозинофилию дыхательных путей, главным образом, за счёт ингибирования индуцированного антигеном рекрутирования воспалительных клеток. Имеются данные о том, что повышение концентрации ИЛ-10 подавляет функции T_{reg}, которые, в свою очередь, способны ингибировать провоспалительные сигнальные каскады, подавляющие Th₂-клетки, макрофаги, дендритные клетки, НКТ-клетки, В-лимфоциты [32, 33, 34]. В то же время, T_{reg} выполняют одну из главных ролей в обеспечении защиты организма от различных инфекционных агентов, в том числе, и пневмококка. Представленные результаты свидетельствуют о том, что при исследовании широкого спектра медиаторов (ИФН- γ , ИЛ-4, ИЛ-6, TNF- α , MCP-1, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-18) у пациентов с БА именно ИФН- γ и ИЛ-10 имеют важное значение в регуляции адаптивного иммунного ответа. Это позволяет рассматривать ИФН- γ и ИЛ-10 у больных с БА как дополнительные к клиническому обследованию лабораторные показатели клинического эффекта вакцинации против пневмококковой инфекции.

Заключение. Иммунизация пациентов с БА вакциной ПКВ13 значительно снижала риски возникновения обострения БА и госпитализации по ее поводу, повышая уровень контроля заболевания. Для пациентов с легкой степенью тяжести БА, а также для тех, у кого наблюдалось снижение числа обострений по сравнению с довакцинальным периодом, характерно повышение уровня ИФН- γ в сыворотке крови спустя 6 недель после иммунизации. Статистически значимое увеличение содержания ИЛ-10 наблюдали у пациентов с БА, имевших повышенный уровень общего IgE. Эти лабораторные показатели показывают значимую роль ИФН- γ в нормализации иммунного ответа у пациентов с БА и могут свидетельствовать о положительном клиническом воздействии вакцинации ПКВ13 на организм пациентов с БА.

ЛИТЕРАТУРА

1. GINA. Global Initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and prevention (2023) Available at: <https://ginasthma.org/2023-gina-main-report/> (accessed 26 May 2024).
2. Lambrecht B.N., Hammad H. Asthma: The importance of dysregulated barrier immunity. *Eur. J. Immunol.* 2013; 43: 3125-37. DOI: 10.1002/eji.201343730.
3. Hollams E.M., Hales B.J., Bachert C., Huvenne W., Parsons F., de Klerk N.H. et al. Th2-associated immunity to bacteria in teenagers and susceptibility to asthma. *Eur Respir J.* 2010; 36 (3): 509-16. DOI: 10.1183/09031936.00184109.
4. Федосеев Г.Б., Трофимов В.И., Тимчик В.Г., Негруца К.В., Голубева В.И., Горюнова Е.В. и др. Инфекционная и неинфекционная сенсibilизация больных бронхиальной астмой и хронической обструктивной болезнью легких. *Российский Аллергологический Журнал.* 2015; (6): 39-53.
5. Kama Y., Kato M., Yamada Y., Koike T., Suzuki K., Enseki M., et al. The suppressive role of Streptococcus pneumoniae colonization in acute exacerbations of childhood bronchial asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2020; 181 (3): 191-9. DOI: 10.1159/000504541.
6. Klemets P., Lyytikäinen O., Ruutu P., Ollgren J., Nuorti J. P. Invasive pneumococcal infections among persons with and without underlying medical conditions: implications for prevention strategies. *BMC Infect Dis.* 2008; 96 (8). DOI: 10.1186/1471-2334-8-96.
7. Гаращенко Т. И., Костинов М. П., Ильенко Л. И., Кытько О. В., Гаращенко М. В., Фошина Е.П. и др. Профилактическое и терапевтическое использование гемофильной и пневмококковой вакцин у часто и длительно болеющих детей с рецидивирующими средни-

- ми отитами. *Вопросы современной педиатрии*. 2006; 5 (5): 24-9.
8. Ильенко Л.Н., Костинов М.П., Гарашенко М.А., Кытько О.П., Овечкина Н.Н., Кац Т.Н. Иммунизация вакцинами для профилактики пневмококковой, гемофильной инфекции и гриппа у часто и длительно болеющих детей с хронической и часто рецидивирующей неспецифической инфекционной патологией бронхолегочной системы. *Вопросы современной педиатрии*. 2006; 5(4): 27-30.
 9. Брико Н.И., ред. Эпидемиология, клиника и профилактика пневмококковой инфекции: Учебное пособие. М.: Ремедиум Приволжье; 2017.
 10. Preston J. A., Essilfie A.T., Horvat J. C., Wade M.A., Beagley K.W., Gibson P.G., et al. Inhibition of allergic airways disease by immunomodulatory therapy with whole killed *Streptococcus pneumoniae*. *Vaccine*. 2007; 25 (48): 8154-62. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.09.034.
 11. Thorburn A. N., Foster P. S., Gibson P. G., Hansbro P. M. Components of *Streptococcus pneumoniae* suppress allergic airways disease and NKT cells by inducing regulatory T cells. *J. Immunol.* 2012; 188 (9): 4611-20. DOI: 10.4049/jimmunol.1101299.
 12. Костинов М.П., ред. Расширение комплекса лечебно-профилактических мероприятий при бронхиальной астме у детей с применением вакцин "Пневмо-23" и Акт-ХИБ": Пособие для врачей. М.: Медицина для всех; 2004.
 13. Чучалин А.Г., Биличенко Т.Н., Зверев В.В., Семенов Б.Ф., Костинов М.П., Таточенко В.К. и др., ред. Иммунизация полисахаридной поливалентной вакциной для профилактики пневмококковой инфекции: Учебное пособие. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2008.
 14. Маркелова Е. В., Гушина Я. С., Костинов М. П., Журавлева Н. В. Клинико-иммунологический эффект вакцинации "ПНЕВМО 23" детей с атопической бронхиальной астмой. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2005; (2): 83-5.
 15. Протасов А. Д., Костинов М. П., Жестков А. В., Штейнер М. Л., Магаршак О. О., Костинова Т.А. и др. Выбор оптимальной тактики вакцинации против пневмококковой инфекции с иммунологических и клинических позиций у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких. *Терапевтический архив*. 2016; 88(5): 62-9.
 16. Костинов М. П., ред. Вакцинация взрослых - от стратегии к тактике: Руководство для врачей. М.: Группа МДВ; 2020.
 17. Драпкина О.М., ред. Краткие алгоритмы ведения пациентов на этапе оказания первичной медико-санитарной помощи: Пособие для врачей-терапевтов. М.: ООО "Видокс"; 2019.
 18. Чучалин А.Г., Александровский Ю.А., Аметов А.С., Аполихин О.И., Белоусов Ю.Б., Богатырев В.В. и др. Федеральное руководство по использованию лекарственных средств (формулярная система). Том Выпуск XVI. М.: Эхо; 2015.
 19. Авдеев С.Н., Алыева М.Х., Баранов А.А., Бикмиева А.В., Брико Н.И., Булгакова В.А. и др. Вакцинопрофилактика пневмококковой инфекции у детей и взрослых. Методические рекомендации. *Профилактическая медицина*. 2023.
 20. Андреева Н. П., Протасов А. Д., Костинова Т. А., Леженина С. В. Влияние вакцинации против пневмококковой инфекции и гриппа на клиническое течение бронхиальной астмы. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2019; 18 (4): 93-100. DOI: 10.31631/2073-3046-2019-18-4-93-100.
 21. Lee T. A., Weaver F. M., Weiss K. B. Impact of pneumococcal vaccination on pneumonia rates in patients with COPD and asthma. *J. Gen. Intern. Med.* 2007; 22 (1): 62-7. DOI: 10.1007/s11606-007-0118-3.
 22. Peseck R., Lockey R. Vaccination of adults with asthma and COPD. *Allergy*. 2011; 66 (1): 25-31. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2010.02462.x.
 23. Protasov A.D., Kostinov M.P., Zhestkov A.V., Gorbachev D.O., Kostinov A.M., Elner M.E., et al. Changes in Sputum Microbiocenosis and Clinical Pattern Under Different Vaccination Protocols for Pneumococcal Infection in Patients with Bronchial Asthma. *Global Journal of Respiratory Care*. 2022; (8): 18-27. DOI: 10.12974/2312-5470.2022.08.05.
 24. Драпкина О.М., Брико Н.И., Костинов М.П., Фельдблом И.В., Алыева М.Х., Андреева Н.П. и др., ред. Иммунизация взрослых: Методические рекомендации. М.: Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины Минздрава России; 2020.
 25. Костинов М.П., Протасов А.Д., Жестков А.В., Полищук В.Б. Перспективные данные применения пневмококковой 13-валентной конъюгированной вакцины у взрослых пациентов с хронической бронхолегочной патологией. *Пульмонология*. 2014; (4): 57-63.
 26. Калюжная Т. А., Федосеев М. В., Намазова-Баранова Л. С., Шахтактинская Ф. Ч., Сельвян А. М., Толстова С. В., и др. Анализ научных данных, подтверждающих эффективность вакцинации пневмококковой конъюгированной вакциной в когорте детей с бронхиальной астмой. *Педиатрическая фармакология*. 2020; 17 (5): 467-71. DOI: 10.15690/pf.v17i5.2187.
 27. Протасов А.Д., Жестков А.В., Костинов М.П. и др. Способ формирования иммунологической памяти к антигенам *Streptococcus pneumoniae* у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких. Патент РФ № 2544168; 2015.
 28. Костинов М.П., Протасов А.Д., Жестков А.В., Ястребова Н.Е., Костинов А.М., Власенко А.Е. и др. Исследование безопасности введения 13-валентной пневмококковой конъюгированной вакцины и поствакцинальный иммунный ответ к серотипам *Streptococcus pneumoniae* у взрослых больных с бронхиальной астмой и хронической обструктивной болезнью легких. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2021; 76 (3): 324-34. DOI: 10.15690/vramn1342.
 29. Костинов М.П., Протасов А.Д., Жестков А.В., Штейнер М.Л., Тезиков Ю.В., Липатов И.С. Влияние разных схем вакцинации против пневмококковой инфекции на клиническое течение хронической обструктивной болезни легких: фокус на изменении микробиоценоза мокроты. *Туберкулез и болезни легких*. 2021; 99 (7): 7-17. DOI: 10.21292/2075-1230-2021-99-7-7-17.
 30. Никифоров В.В., Орлова Н.В., Суранова Т.Г. Вакцинопрофилактика пневмококковой инфекции в условиях продолжающегося распространения COVID-19. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2020; 25 (2): 48-55. DOI: 10.17816/EID41765.
 31. Finkelman F. D., Hogan S. P., Hershey G. K. K., Rothenberg M. E., Wills-Karp M. Importance of cytokines in murine allergic airway disease and human asthma. *J. Immunol.* 2010; 184 (4): 1663-74. DOI: 10.4049/jimmunol.0902185.
 32. Ogawa Y., Duru E. A., Ameredes B. T. Role of IL-10 in the resolution of airway inflammation. *Curr Mol Med*. 2010; 8 (5): 437-45. DOI: 10.2174/156652408785160907.
 33. Халтурина Е.О., Миронов А.Ю. Особенности профиля сывороточных цитокинов у иммунокомпрометированных пациентов с атипичными хроническими активными герпесвирусными инфекциями. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (2): 88-94. DOI 10.51620/0869-2084-2023-68-2-88-94.
 34. Нестерова И. В., Халтурина Е. О., Миронов А. Ю. Диагностическая эффективность и прогностическая значимость биомаркеров при атипичных хронических активными герпесвирусных инфекциях. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (5): 272-79. DOI 10.51620/0869-2084-2023-68-5-272-279.

REFERENCES

1. GINA. Global Initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and prevention (2023) Available at: <https://ginasthma.org/2023-gina-main-report/> (accessed 26 May 2024).
2. Lambrecht B.N., Hammad H. Asthma: The importance of dysregulated barrier immunity. *Eur. J. Immunol.* 2013; 43: 3125-37. DOI: 10.1002/eji.201343730.
3. Hollams E.M., Hales B.J., Bachert C., Huvenne W., Parsons F., de Klerk N.H. et al. Th2-associated immunity to bacteria in teenagers and susceptibility to asthma. *Eur. Respir J.* 2010; 36 (3): 509-16. DOI: 10.1183/09031936.00184109.
4. Fedoseev G.B., Trofimov V.I., Timchik V.G., Negrutsova K.V., Golubeva V.I., Gorovneva, et al. Infectious and noninfectious sensitization of patients with bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Rossiyskiy allergologicheskii zhurnal*. 2015; (6): 39-53. (in Russian)
5. Kama Y., Kato M., Yamada Y., Koike T., Suzuki K., Enseki M., et al. The suppressive role of *Streptococcus pneumoniae* colonization in acute exacerbations of childhood bronchial asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2020; 181 (3): 191-9. DOI: 10.1159/000504541.
6. Klemets P., Lyytikäinen O., Ruutu P., Ollgren J., Nuorti J. P. Invasive pneumococcal infections among persons with and without underlying medical conditions: implications for prevention strategies. *BMC Infect Dis.* 2008; 96 (8). DOI: 10.1186/1471-2334-8-96.
7. Garashchenko T.I., Kostinov M.P., Iliencko Li., Kyt'ko O.V., Garashchenko M.V., Foshina Ye.P. et al. Preventive and therapeutic application of hib and pneumococcal vaccines among children, who are

- prone to frequent and prolonged recurrent otitis media. *Voprosy sovremennoy pediatrii*. 2006; 5(5): 24-9. (in Russian)
8. Il'enko L., Kostinov M., Garashchenko M., Kyt'ko O., Ovechkina N., Kats T. Vaccine immunization for prevention of pneumococcal, haemophilus influenzae and flu among sickly children, who often suffer from persistent heterospecific infectious pathology of the bronchopulmonary system. *Voprosy sovremennoy pediatrii*. 2006; 5(4): 27-30. (in Russian)
 9. Briko N.I., ed. Epidemiology, clinic and prevention of pneumococcal infection [Epidemiologiya, klinika i profilaktika pnevmokokkovoy infektsii]: Study guide. Moscow: Remedium Privolzhye; 2017. (in Russian)
 10. Preston J. A., Essilfie A.-T., Horvat J. C., Wade M.A., Beagley K.W., Gibson P.G., et al. Inhibition of allergic airways disease by immunomodulatory therapy with whole killed *Streptococcus pneumoniae*. *Vaccine*. 2007; 25 (48): 8154-62. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.09.034.
 11. Thorburn A. N., Foster P. S., Gibson P. G., Hansbro P. M. Components of *Streptococcus pneumoniae* suppress allergic airways disease and NKT cells by inducing regulatory T cells. *J. Immunol*. 2012; 188 (9): 4611-20. DOI: 10.4049/jimmunol.1101299.
 12. Kostinov M.P. Expansion of the complex of therapeutic and prophylactic measures in bronchial asthma in children with the use of vaccines "Pneumo-23" and "Akt-HIB" [Rasshireniye kompleksa lecheno-profilakticheskikh meropriyatii pri bronkhial'noy astme u detey s primeneniym vaksina "Pneumo-23" i "Akt-KHIB"]: Posobie dlya vrachey. Moscow: Meditsina dlya vsekh; 2004. (in Russian)
 13. Chuchalin A.G., Bilichenko T.N., Zverev V.V., Semyonov B.F., Kostinov M.P., Tatochenko V.K., et al., eds. Immunisation with polysaccharide polyvalent vaccine for the prevention of pneumococcal infection [Immunizatsiya polisakharidnoy polivalentnoy vaksinoy dlya profilaktiki pnevmokokkovoy infektsii]: Study guide. Moscow: Federal'naya sluzhba po nadzory v sfere zashchity prav potrebitel' I blagopoluchiya cheloveka; 2008. (in Russian)
 14. Markelova E.V., Gushchina Ya.S., Kostinov M.P., Zhuravleva N.V. Clinical and immunological effect produced by vaccination with "Pneumo 23" of children with atopic bronchial asthma. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2005; (2): 83-5. (in Russian)
 15. Protasov A.D., Kostinov M.P., Zhestkov A.V., Shteiner M.L., Magarshak O.O., Kostinova T.A. et al. Choice of optimal vaccination tactics against pneumococcal infection from immunological and clinical standpoints in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2016; 88(5): 62-9. (in Russian)
 16. Kostinov M.P., ed. Vaccination of adults - from strategy to tactics [Vaccination of adults - from strategy to tactics]: Posobie dlya vrachey. Moscow: Gruppya MDV; 2020. (in Russian)
 17. Drapkina O.M., ed. Brief algorithms for the management of patients at the stage of primary health care [Kratkiye algoritmy vedeniya patsiyentov na etape okazaniya pervichnoy mediko-sanitarnoy pomoshchi]: Posobie dlya terapevtov. Moscow: Vidoks; 2019. (in Russian)
 18. Chuchalin A.G., Alexandrovsky Y.A., Ametov A.S., Apolikhin O.I., Belousov Y.B., Bogatyrev V.V., eds. Federal guide to the use of medicines (formulary system). Vol. Issue XVI [Federal'noye rukovodstvo po ispol'zovaniyu lekarstvennykh sredstv (formulyarnaya sistema). Tom Vypusk XVI]. Moscow: Ekho; 2015. (in Russian)
 19. Avdeev S.N., Alyeva M.H., Baranov A.A., Bikmieva A.V., Briko N.I., Bulgakova V.A. et al. Federal Clinical Guidelines on Vaccination of pneumococcal infection in children and adults. *Profilakticheskaya meditsina*. 2023; 26(9-2): 3-23. (in Russian)
 20. Andreeva N.P., Protasov A.V., Kostinova T.A., Lezhenina S.V. Effect of vaccination against pneumococcal infection and influenza on the clinical course of bronchial asthma. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika*. 2019; 18 (4): 93-100. DOI: 10.31631/2073-3046-2019-18-4-93-100. (in Russian)
 21. Lee T. A., Weaver F. M., Weiss K. B. Impact of pneumococcal vaccination on pneumonia rates in patients with COPD and asthma. *J. Gen. Intern. Med*. 2007; 22 (1): 62-7. DOI: 10.1007/s11606-007-0118-3.
 22. Pesek R., Lockey R. Vaccination of adults with asthma and COPD. *Allergy*. 2011; 66 (1): 25-31. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2010.02462.x.
 23. Protasov A.D., Kostinov M.P., Zhestkov A.V., Gorbachev D.O., Kostinov A.M., Elner M.E., et al. Changes in sputum microbiocenosis and clinical pattern under different vaccination protocols for pneumococcal infection in patients with bronchial asthma. *Global Journal of Respiratory Care*. 2022; (8): 18-27. DOI: 10.12974/2312-5470.2022.08.05.
 24. Drapkina O.M., Briko N.I., Kostinov M.P., Feldblum I.V., Alyeva M.H., Andreeva N.P., et al., eds. Immunisation of adults [Immunizatsiya vzroslykh]: Methodical recommendations. Moscow: Natsional'nyi meditsinskiy issledovatel'skiy tsentr terapii i profilakticheskoy meditsiny Minzdrava Rossii; 2020. (in Russian)
 25. Kostinov M.P., Protasov A.D., Zhestkov A.V., Polishchuk V.B. Perspectives of vaccination with 13valent pneumococcal vaccine in adults with chronic respiratory diseases. *Pul'monologiya*. 2014; (4): 57-63. (in Russian)
 26. Kalyuzhnaya T.A., Fedoseenko M.V., Namazova-Baranova L.S., Shaktakhinskaya F.Ch., Selvyan A.M., Tolstova S.V., et al. The analysis of scientific data on the efficacy of pneumococcal conjugated vaccine in the cohort of children with bronchial asthma. *Pediatricheskaya farmakologiya*. 2020; 17 (5): 467-71. DOI: 10.15690/pf.v17i5.2187. (in Russian)
 27. Protasov A.D., Zhestkov A.V., Kostinov M.P. Method for forming immunological memory to *Streptococcus pneumoniae* antigens in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Patent RF № 2544168; 2015. (in Russian)
 28. Kostinov M.P., Protasov A.D., Zhestkov A.V., Yastrebova N.E., Kostinov A.M., Vlasenko A.E. et al. A randomized safety study of 13-Valent Pneumococcal Conjugated Vaccine and Post-Vaccination Immune Response to *Streptococcus pneumoniae* Serotypes in Adult Patients with Bronchial Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2021; 76 (3): 324-34. DOI: 10.15690/vramn1342. (in Russian)
 29. Kostinov M.P., Protasov A.D., Zhestkov A.V., Shteyner M.L., Tezikov Yu.V., Lipatov I.S. The Effect of Different Regimens of Vaccination against Pneumococcal Infection on the Clinical Course of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Focus on Changes in Sputum Microorganism Population. *Tuberkulyoz i bolezni legkikh*. 2021; 99 (7): 7-17. DOI: 10.21292/2075-1230-2021-99-7-7-17. (in Russian)
 30. Nikiforov V. V., Orlova N. V., Suranova T. G. Vaccinal prevention of pneumococcal infection in the context of the ongoing spread of COVID-19. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni*. 2020; 25 (2): 48-55. DOI:10.17816/EID41765. (in Russian)
 31. Finkelman F. D., Hogan S. P., Hershey G. K. K., Rothenberg M. E., Wills-Karp M. Importance of cytokines in murine allergic airway disease and human asthma. *J. Immunol*. 2010; 184 (4): 1663-74. DOI: 10.4049/jimmunol.0902185.
 32. Ogawa Y., Duru E. A., Ameredes B. T. Role of IL-10 in the resolution of airway inflammation. *Curr. Mol. Med*. 2010; 8 (5): 437-45. DOI: 10.2174/156652408785160907.
 33. Khalturina E.O., Mironov A.Yu. Features of the serum cytokine profile in immunocompromised patients with atypical chronic active herpesvirus infections. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2023; 68 (2): 88-94. DOI 10.51620/0869-2084-2023-68-2-88-94. (in Russian)
 34. Nesterova I.V., Khalturina E.O., Mironov A.Yu. Diagnostic effectiveness and prognostic significance of biomarkers in atypical chronic active herpesvirus infections. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2023; 68 (5): 272-9. DOI 10.51620/0869-2084-2023-68-5-272-279. (in Russian)

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Ротанов С.В.^{1,2}, Акиншина Ю.А.¹, Гашенко Т.Ю.¹

ТЕХНОЛОГИЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАРБАПЕНЕМАЗ У ПАТОГЕНОВ ЧЕЛОВЕКА ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

¹АО «ЭКОлаб», 142530, г. Электрогорск, Россия;

²ФБУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора (ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора), 142279, г. о.Серпухов, п. Оболensk, Россия

Представлены результаты разработки и апробации с клиническими образцами нового отечественного набора реагентов «ИХА-CARBA-5» Тест-система иммунохроматографическая для качественного определения карбапенемаз KPC, OXA, VIM, IMP и NDM в бактериальной колонии из культуры». Описаны состав и структура иммунохроматографических тест-полосок, правила их использования. Показаны высокие характеристики клинической чувствительности и специфичности (по 100%) при стабильной воспроизводимости результатов тестирования; аналитическая чувствительность тест-полосок (предел обнаружения) по отношению к определяемым ферментам: к KPC - 600 пг/мл; к OXA - 300 пг/мл; к VIM - 300 пг/мл; к IMP - 200 пг/мл, к NDM - 150 пг/мл. В серии испытаний оценён ряд потенциально интерферирующих веществ и перекрёстно реагирующих культур микроорганизмов, содержащихся в клинических пробах; не установлено их влияния на результаты ИХА исследования. Новый набор может быть рекомендован для широкого применения при оказании медицинской помощи населению и использования с целью эпидемиологического мониторинга резистентных карбапенемаза-продуцирующих штаммов микроорганизмов в популяции.

Ключевые слова: иммунохроматография; клиническая микробиология; карбапенемазы; набор реагентов

Для цитирования: Ротанов С.В., Акиншина Ю.А. Гашенко Т.Ю. Технология определения карбапенемаз у патогенов человека иммунохроматографическим методом. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69 (10): 520-529.

DOI: <https://doi.org/10.15620/0869-2084-2024-69-10-520-529>

Для корреспонденции: Акиншина Юлия Александровна, руководитель научно-производственного отдела ИХТС АО «ЭКОлаб»; e-mail: akinshina.opr@mail.ru

Финансирование. Исследование выполнено в соответствии с научным производственным планом предприятия при полном финансировании АО «ЭКОлаб».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 17.08.2024

Принята к печати 23.08.2024

Опубликовано 00.10.2024

Rotanov S.V.^{1,2}, Akinshina Yu.A.¹, Gashenko T.Yu.¹

TECHNOLOGY FOR DETERMINING CARBAPENEMASES IN HUMAN PATHOGENS BY IMMUNOCHROMATOGRAPHIC METHOD

¹JSC «EKOLab», 142530, Elektrogorsk, Russia;

²Federal budgetary institution of Science «State Scientific Centre of Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor (FSBI «SSC PMB» of Rospotrebnadzor), 142279, Serpukhov, Obolensk, Russia

There are presented the results of the development and testing with clinical samples of a new domestic kit of reagents «ICA-CARBA-5». Immunochromatographic test system for the qualitative determination carbapenemases KPC, OXA, VIM, IMP and NDM in a bacterial colony from culture. The composite composition and structure of immunochromatographic test strips, as well as the rules for their use, are described. High characteristics of clinical sensitivity and specificity (100% each) with stable reproducibility of test results were shown; analytical sensitivity of test strips (detection limit) in relation to the enzymes being determined: to KPC - 600 pg/ml; to OXA - 300 pg/ml; to VIM - 300 pg/ml; to IMP - 200 pg/ml and to NDM - 150 pg/ml. A series of tests assessed a number of potentially interfering substances and cross-reacting cultures of microorganisms contained in clinical samples on the results of ICA testing. The new kit can be recommended for widespread use in providing medical care to the population and for use for epidemiological monitoring of carbapenemase-resistant strains in the population.

Key words: immunochromatography; clinical microbiology; carbapenemases; kit of reagents

For citation: Rotanov S.V., Akinshina Yu.A., Gashenko T.Yu. Technology for determining carbapenemases in human pathogens using the immunochromatographic method. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (10): 520-529. (in Russ.)

DOI: <https://doi.org/10.15620/0869-2084-2024-69-10-520-529>

For correspondence: Akinshina Yulia Aleksandrovna, specialist of the Innovative Development Department CJSC «EKOLab»; e-mail: akinshina.opr@mail.ru

Information about authors:

Rotanov S. V., <https://orcid.org/0000-0002-3222-1401>;

Akinshina Yu. A., <https://orcid.org/0000-0002-9223-3455>;

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

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 17.08.2024

Accepted 23.08.2024

Published 00.10.2024

Введение. Одной из наиболее эффективных групп современных антимикробных препаратов (АМП) являются карбапенемы: имипенем, меропенем, эртапенем, дорипенем и др. Карбапенемы назначают больным тяжелыми нозокомиальными инфекциями и инфекциями, вызванными смешанной микрофлорой, поскольку широкий спектр активности этих АМП включает грамположительные, грамотрицательные и анаэробные микроорганизмы; указанные АМП характеризуется низкой цитотоксичностью и хорошими фармакокинетическими параметрами (распределением в организме, обеспечением высоких терапевтических концентраций в его тканях и жидкостях, проникновением через гематоэнцефалический барьер в спинномозговую жидкость). Карбапенемы слабо разрушаются в тканях организма, они выводятся с мочой преимущественно в неизменённом виде [1-3].

Карбапенемы относят к β -лактамам, поскольку структура молекулы этих АМП включает гетероциклическое кольцо, состоящее из трёх атомов углерода и одного атома азота (β -лактамное кольцо). Выраженное бактерицидное действие карбапенемов обусловлено нарушением под их воздействием механизмов синтеза клеточной стенки бактерий. В сравнении с пенициллинами, цефалоспорины, монобактамами, карбапенемы выгодно отличаются большей устойчивостью к разрушающему (гидролизующему) действию со стороны природных бактериальных ферментов - β -лактамаз, что определяет показания и порядок их назначения пациентам, при выявлении у них устойчивой микрофлоры [1-2].

По структуре первичной аминокислотной последовательности β -лактамазы классифицируют (по R. P. Ambler, 1980) на четыре молекулярных класса – А, В, С, D. Ферменты А, С, D классов относятся к гидролазам серинового типа (поскольку в состав их молекул входит аминокислота серин); активные центры ферментов класса В включают один или два атома цинка, что послужило основанием к их номинации металло- β -лактамазами (МБЛ) [3, 5]. Успешное применение карбапенемов с течением времени стало ограничиваться тем, что в результате мутаций и межклеточного горизонтального обмена генетическим материалом (в плазидах и транспозонах) бактерии стали проявлять способность уклоняться от воздействия этих АМП. Начиная с 90-х годов XX века в научных публикациях появились сообщения о карбапенемазустойчивых штаммах патогенов человека; и описан механизм уклонения их от действия новых разработанных АМП путём выработки более совершенных гидролаз – карбапенемаз, способных расщеплять не только ранее разработанные типы β -лактамных АМП, но и используемые в медицине карбапенемы.

В настоящее время известно большое разнообразие вариантов карбапенемаз; по своей молекулярной структуре их относят к трём из четырёх известных классов β -лактамаз:

в классе А сериновых карбапенемаз описаны KPC,

GES-5, IMI, NMCA, SME;

в классе В металло- β -лактамаз - VIM, NDM, IMP, SIM, GIM, SPM;

в классе D сериновых карбапенемазы представлены OXA (-48, -58, -23 и др.) [6-9].

Перечисленные буквенные обозначения карбапенемаз чаще всего производны от видового наименования бактерий, у которых они первоначально выявлены или географического региона обнаружения, цифровые индексы уточняют особенности их строения или порядковый номер опубликования. Мониторинг лабораторного определения и идентификации карбапенемаз позволяет оценивать их распространение в популяции разных регионов мира и циркуляцию в отдельных учреждениях здравоохранения. В большинстве стран мира у патогенных для человека резистентных энтеробактерий наибольшее распространение к настоящему времени получили сериновые карбапенемазы молекулярных типов KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) и OXA (the oxacillinase-type beta-lactamase – оксациллиназа), металло- β -лактамазы типов NDM (New Delhi Metallo-beta-lactamase - Нью Дели металло- β -лактамаза), VIM (Verona Integron-encoded Metallo-beta-lactamase - Верона интегрон-кодированная металло- β -лактамаза, или Verona Imipenemase - Верона имипенемаза), и в несколько меньшей степени IMP (imipenemase – имипенемаза) [7-10].

Признание антибиотикорезистентности в качестве реальной современной глобальной угрозы для всей системы здравоохранения (при оказании медицинской помощи больным инфекционного и хирургического профиля) консолидировало усилия ВОЗ, Европейского комитета по определению чувствительности микроорганизмов к АМП (EUCAST) и Национальных центров по контролю заболеваемости (CDC) по разработке комплекса практических мероприятий по изучению и мониторингу устойчивых к АМП патогенов человека [7, 11, 12].

Для выявления карбапенемаз разработаны и внедрены в рутинную практику лабораторий клинической микробиологии различные лабораторные технологии: прежде всего, фенотипические и аналитические тесты выявления карбапенемаз грамотрицательных бактерий, и молекулярно-генетические исследования генов.

Среди фенотипических тестов более распространена технология определения у энтеробактерий минимальной подавляющей концентрации (МПК) диско-диффузионным методом, методом серийных разведений или с помощью автоматизированных станций в отношении меропенема, имипенема, эртапенема; устойчивыми согласно рекомендациям Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) считаются штаммы с МИК более 2 мг/л [12], их следует дополнительно тестировать на наличие и установление типа карбапенемаз.

Для выявления металло- β -лактамаз (МБЛ) используют хелатинирующие агенты (такие как этилендиаминотетраацетат – ЭДТА, дипиколиновая или меркаптопропионовая кислоты), способные связывать ионы

цинка в составе активного центра фермента и, таким образом, подавлять его гидролизующую активность в отношении АМП. На практике эта методика реализуется в виде культивирования исследуемой суспензионной культуры на плотной питательной среде с использованием двойных дисков с ЭДТА. Увеличение зоны подавления роста культуры на агаре между дисками с АМП и с ЭДТА является свидетельством синтеза изучаемой культурой МБЛ. Модификации этого метода: использование комбинированных дисков, содержащих одновременно ЭДТА и АМП или двойного Е-теста, одна половина которого помимо градиента концентрации АМП содержит постоянную концентрацию ЭДТА. При сравнении величины зон подавления роста вокруг дисков или полосок Е-теста только с АМП и АМП+ЭДТА в случае синтеза металло-β-лактамаз наблюдают более широкие зоны подавления роста культуры (не менее дополнительных 7 мм при методе комбинированных дисков или 8-кратного увеличения значения МИК с использованием Е-теста) [10, 13].

Для выявления сериновых карбапенемаз класса А в качестве ингибитора активности служит аминоксидная кислота (АФБК); при этом техника постановки лабораторного исследования с двойными или комбинированными дисками аналогична вышеописанной для МБЛ. Кроме описанного метода рекомендуется применение модифицированного теста Ходжа, принцип которого заключается в посеве на чашке Петри с агаром Мюллера-Хинтона контрольного штамма *E. coli* ATCC 25922, помещении в центральную часть диска с карбапенемным АМП и штриховом посеве от диска к периферии изучаемой культуры. В случае продукции карбапенемаз изучаемым изолятом происходит гидролиз карбапенемного АМП и появляется рост контрольного штамма *E. coli*.

Интерпретация фенотипических методов определения карбапенемаз может быть затруднена в случаях одновременного синтеза ферментов разных молекулярных классов. Фенотипические тесты не позволяют установить тип выявленной карбапенемазы [13]. Для определения ферментов ОХА-типа фенотипические тесты практически не используются.

Точными методами определения карбапенемаз являются молекулярно-генетические исследования. Разработаны методики мультиплексной полимеразной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с последующей идентификацией продуктов амплификации и метод гибридационного анализа на ДНК-чипах [9, 10, 13].

Одной из наиболее быстрых по выполнению и обладающей высокой точностью результатов является иммунохроматографическая (ИХ) технология определения карбапенемаз, которую ряд исследователей относят не к фенотипическим, а аналитическим тестам. Диагностическим преимуществом ИХ является то обстоятельство, что наряду с высокой чувствительностью, специфичностью и скоростью получения результата, ИХ позволяет определить тип выявленного фермента. Разработаны варианты практического воплощения ИХ-теста с одновременным определением нескольких (2-5) типов известных карбапенемаз [9, 13-15]. Ограничением в использовании этой технологии является невозможность применения для поиска новых, ранее не описанных типов карбапенемаз.

Из публикаций в материалах научных и коммерческих изданий нам стали известны зарубежные и отечественные аналоги ИХ наборов реагентов для одновременного качественного определения в культурах *in vitro* нескольких типов наиболее распространенных карбапенемаз (КРС, ОХА, VIM, IMP, NDM): «NG-Test CARBA 5» (фирма «NG Biotech Z.A.», Франция) и «CARBA5-ИМБИАН-ИХА» (фирма ООО «ИМБИАН», Новосибирская обл., Россия) [13-15].

Существующие санкционные ограничения со стороны Европейской экономической системы и США не позволяют на регулярной основе использовать разработанные западными странами ИХ наборы реагентов в микробиологических лабораториях России для выявления и мониторинга карбапенемаза-продуцирующих штаммов микроорганизмов.

Цель исследования - разработка нового оригинального отечественного набора реагентов в формате иммунохроматографической тест-кассеты для одновременного диагностического дифференцированного определения нескольких (от 3 до 5) наиболее часто встречающихся в популяции бактериальных карбапенемаз из культуры энтеробактерий, полученных из биоматериала обследуемого больного, и расширенная клиническая оценка нового разработанного медицинского изделия.

Материал и методы. При разработке дизайна новой тестовой ИХ кассеты использован научный подход и практические наработки создания композитных ИХ мембран, содержащих целевые маркеры по отношению к нескольким определяемым анализам одновременно, что позволяет выполнять диагностическое исследование за одну лабораторную постановку [8, 16-21]; решался вопрос о возможности практического размещения и эффективного использования варианта нескольких полос детекции на одной ИХ тест-полосе [15, 18, 21].

Одной из решаемых задач при выполнении работы явились адаптация и стандартизация условий микробиологического культивирования испытуемых биологических образцов от пациента, полученных на разных видах плотных питательных сред и содержащих в испытуемой пробе примеси этих агаризованных сред, и небольшие включения наиболее часто встречающихся сопутствующих микроорганизмов.

В работе использованы разные виды биологического материала человека: венозная кровь, раневое гнойное и серозно-геморрагическое отделяемое, пунктаты из полостей и кист, соскобы с изъязвлений на коже и слизистых оболочках, моча, фекалии, другие биологические жидкости, направляемые клиникой на исследование.

В соответствии с устоявшейся технологией конструирования ИХ стрипов, размещаемых в удобные для использования в клинических лабораториях пластиковые кассеты, применена техника создания многослойного разнородного композита:

- для создания подложки из полилита брали бумагу силиконизированную 0,2-0,6 мм толщиной (фирма ООО «ПКФ Современные технологии», Россия, кат. № ИНА-100);

- для иммуносорбента, обеспечивающего качественное иммунохимическое взаимодействие антигенов и антител, использована нитроцеллюлозная мем-

брана с большой пропускной способностью и способностью удерживать нанесённые на неё тестовые линии с антителами к карбапенемазам, - толщиной 185 мкм ± 20% (фирма «MDI», Индия, Type CNPC-SS12, 15 мкм);

- стрип комплектовали мембраной для нанесения необходимых конъюгатов антител к карбапенемазам (фирма «MDI», Индия, Type PT-R1);

- включали впитывающую мембрану для нанесения образца с наибольшей толщиной 0,6-0,8 мм и плотностью 270±20 г/м², обеспечивающими фильтрацию образца от крупных включений (фирма «MDI», Индия, Type GFB-R7L);

- добавляли завершающую процесс исследования мембрану для адсорбции жидкой фазы с растворёнными не вступившими в реакцию веществами - толщиной 0,2-0,5 мм, плотностью 179±5 г/м² (фирма «MDI», Индия, Type AP110).

Для нанесения и иммобилизации на иммуносорбенте пять тестовых линий готовили растворы соответствующих антител к пяти изучаемым карбапенемазам (фирма «Jiangsu East-Mab Biomedical Technology Co., Ltd.», Китай, кат. №№ DZMK012, DZMK013, C07502, HA 226-2M, DZMK017 соответственно):

- KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase);
- IMP (Imipenemase);
- NDM (New Delhi metallo-beta-lactamase);
- VIM (Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase);
- OXA (The oxacillinase-type beta-lactamase).

Необходимую в исследовании контрольную линию (С) на иммуносорбенте создавали раствором козьих антител к иммуноглобулинам (IgG) мыши в концентрации ≥1 мг/мл в фосфатном буфере (pH 7,4), (АО «ЭКОлаб», Россия, кат. № 264.4).

На мембрану для конъюгатов, наносили рабочие растворы конъюгатов антител к карбапенемазам KPC, IMP, NDM, VIM, OXA (Jiangsu East-Mab Biomedical Technology Co., Ltd., Китай, кат. №№ DZMK011, DZMK021, DZMK015, C07503, 02MK022 соответственно) с наночастицами коллоидного золота (НЧ-КЗ) размером 30-80 нм, полученными из золотохлоридоводородной кислоты - Gold (III) chloride hydrate (фирма «Aldrich», кат. № 254169-500MG); однородность размеров НЧ-КЗ проверяли с помощью просвечивающей электронной микроскопии и спектрофотометрии.

Процессы приготовления необходимых растворов и отмывания продуктов разработки обеспечивали деионизованной водой (установка «Simplicity System», фирмы «Millipore», США), с удельным сопротивлением 18,2 Ом·м при 25 °С. Стерилизующую фильтрацию неионизированной воды и солевых растворов обеспечивали пропусканием через стандартный набор: пред-фильтр и фильтры с калиброванной величиной пор - 0,45 и 0,22 мкм (фирмы «Millipore», США).

Разработанный композит ИХ стрипа после сборки помещали в пластиковую кассету (контейнер из пластика размером 70х20 мм, с отверстиями для внесения исследуемого образца и для аналитической зоны) и упаковывали с силикагелем в индивидуальную упаковку из фольги алюминиевой 120х70 мм (ООО «ПКФ Современные технологии», Россия).

Для обеспечения лабораторного процесса диагностического исследования в разработанный набор реа-

гентов включили необходимые комплектующие:

- флакон-капельницу с буферным раствором (БР) для приготовления исследуемой бактериальной взвеси (ООО «Меридиан», Россия), содержащую 5,0 мл 0,01 М фосфатного буфера (pH-7,4-7,6) с твин-20 2,5% (фирмы «ROTH», Германия, кат. № 9127.2) и азидом натрия 0,1% (фирмы ДИА-М, Россия, кат. № 3402);

- пипетку Пастера одноразовую неградуированную для переноса жидкостей («Нинбо Гритмед Медикал Инструментес Ко., Лтд.», Китай, РУ № ФСЗ 2012/11857);

- микропробирку одноразовую пластиковую объёмом 0,5 мл (тип Эппендорф) для подготовки исследуемого образца, РУ № ФСЗ 2012/12495);

- картонную подставку под микропробирки (АО «ЭКОлаб, Россия, кат. № 43.8).

Процесс разработки и проведение внутренних клинических испытаний по оценке диагностических показателей чувствительности, специфичности и воспроизводимости результатов исследования с разработанным набором реагентов обеспечен панелью клинических образцов разных биологических материалов, полученных в соответствии с договорами о сотрудничестве, из нескольких медицинских организаций: ГБУЗ «Орехово-Зуевская станция переливания крови» (лицензия ЛО-50-01-005260 от 02.04.14 г.), ООО «ИНВИТРО» (лицензия ЛО-77-01-012556 от 22.06.2016 г.), Диагностического Центра «El'Clinic» АО «ЭКОлаб» (лицензия № Л041-01162-50/00365571 от 08.04.15 г.). Всего применено 254 клинических образца, в том числе: 106 - содержавших и 148 образцов, не содержавших карбапенемазы KPC, OXA, VIM, IMP, NDM в бактериальной колонии культуры, выращенных на различных плотных питательных средах.

Для моделирования возможной интерференции на результаты исследования приготовлены 54 образца культур микроорганизмов, продуцирующих и не продуцирующих карбапенемазы KPC, OXA, VIM, IMP, NDM типов, и содержавшие плотную питательную среду (в концентрации до 100 мг/мл), цельную кровь (50 мкг/мл), слюну (50 мкг/мл), мочу (50 мкг/мл), АМП (меропенем, имипенем, дорипенем, эртапенем в концентрациях до 10 мкг/мл) или цефтриаксон (в концентрации до 500 мкг/мл).

Изучение вероятной перекрёстной реактивности с сопутствующей микрофлорой выполнено с 36 клиническими образцами, продуцирующими и не продуцирующими карбапенемазы KPC, OXA, VIM, IMP, NDM типов с добавлением в пробу *E. coli* (в концентрации 1,0×10⁶ КОЕ/мл), *Klebsiella pneumoniae* (1,0×10⁶ КОЕ/мл), *Enterobacter cloacae* (1,0×10⁶ КОЕ/мл), *Pseudomonas aeruginosa* (1,0×10⁶ КОЕ/мл), *Acinetobacter baumannii* (1,0×10⁶ КОЕ/мл) или *Staphylococcus aureus* (1,0×10² КОЕ/мл).

Для обеспечения проведения внутренних доклинических испытаний в производственных условиях по разработанному ТУ 21.20.23-368-70423725-2024 в производственных условиях, выпущены 4 опытные серии разработанного набора реагентов «ИХА-CARBA-5»: сер. 1 и 2 со сроком годности до 09.06.26 г. и сер. 3 и 4 со сроком годности до 10.06.26 г.

Необходимая в исследовании тест-система сравнения: «NG-Test CARBA 5» Экспресс-тест для определе-

ния карбапенемаз KPC, OXA, VIM, IMP и NDM в бактериальной колонии из культуры» (фирма «NGBiotech», Франция), серии 190323-01, годный до 2025-11, РУ № РЗН 2022/16818 от 05.04.2022 приобретена через торговую фирму-посредник.

В качестве референсной системы для решения спорных результатов ИХ исследований использованы результаты ПЦР-РВ по выявлению генов карбапенемаз: «АмплиСенс® MDR MBL-FL». Набор реагентов для выявления генов металло-β-лактамаз групп VIM, IMP и NDM методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией», РУ № РЗН 2013/729 от 13.03.2019, серия 15.12.23 годный до 2024-09-15 и «АмплиСенс® MDR KPC/OXA-48-FL». Набор реагентов для выявления генов карбапенемаз групп KPC и OXA-48 в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией», РУ № РЗН 2013/879 от 13.03.2019, серия 17.12.23 годный до 2024-09-17.

Все лабораторные исследования выполнены с точным соблюдением указаний, содержащихся в прилагаемых к наборам и приборам инструкциям по применению.

Результаты и обсуждение. Одновременно с началом работ по конструированию новой ИХ композитной тест-мембраны организована и проведена разработка панели биологических образцов микроорганизмов, содержащих и не содержащих изучаемые гидролизующие ферменты в охарактеризованных количественных соотношениях – создана и утверждена на АО «ЭКОлаб» стандартная панель образцов предприятия - СОП-368. Эта панель предназначена для применения на различных этапах разработки и последующего производ-

ства иммуноактивных компонентов нового набора, при выпускающем и последующем контроле качества и специфической активности производственных серий в пределах их сроков годности. Комплект СОП-368 включал:

- образец № 1 (не содержащий карбапенемаз);
- образцы № 2-№ 6 (содержащие определяемые ферменты в концентрациях порогового определения ИХ набора: образец № 2 - KPC в концентрации 600 пг/мл, образец № 3 - OXA в концентрации 300 пг/мл, образец № 4 - VIM в концентрации 300 пг/мл, образец № 5 - IMP в концентрации 200 пг/мл, образец № 6 - NDM в концентрации 150 пг/мл);
- образцы № 7-№ 11 (содержащие изучаемые карбапенемазы в избыточных концентрациях - 100 мкг/мл; № 7 - KPC, № 8 -OXA, № 9 -VIM, № 10 - IMP, № 11 - NDM, соответственно).

Опираясь на опыт зарубежных разработчиков прототипа ИХ набора для определения карбапенемаз [14] и собственные исследования и наработки [18, 21], решено использовать одну удлиненную композитную мембрану с последовательным размещением на ней пяти тестовых зон (OXA, VIM, NDM, IMP, KPC) и зоны общего контроля (С); проведенные натурные испытания подтвердили правильность выбранного решения (рис. 1). Собранные и высушенные ИХ тест-полоски монтировались в пластиковые кассеты, имеющие открытые участки (окна) для внесения исследуемого образца (маркировка литерой S - Sample) и для учёта результатов исследования (маркировка литерами O, V, N, I, K - начальные буквы наименований определяемых ферментов и С - Control). Собранная пластиковая тест-кассета является неразборной, тестовые и контрольные линии на мембране визуально не определяются.

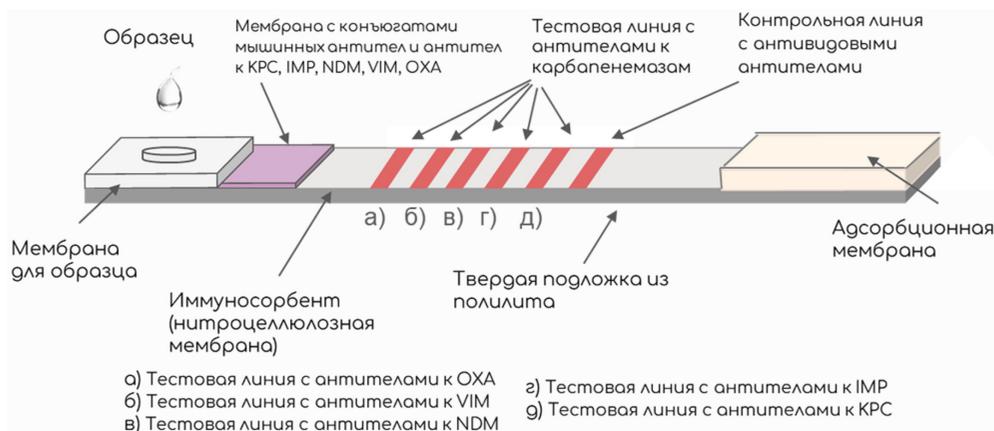


Рис. 1. Схема размещения мембран и нанесения иммунных реагентов на композитную иммунологическую тест-полоску в составе набора реагентов «ИХА-CARBA-5» по ТУ 21.20.23-368-70423725-2024».

Серии выполненных лабораторных исследований позволили оттитровать концентрации рабочих растворов для производства ИХ тест-полоски набора:

для нанесения поперечных линий на иммуносорбенте:

- раствор антител $\geq 0,5$ мг/мл к определяемым карбапенемазам (тестовые линии O, V, N, I, K соответственно) в фосфатном буфере (рН 7,4);

- козьи антитела к иммуноглобулинам IgG мыши ≥ 1 мг/мл (контрольная линия С) в фосфатном буфере (рН 7,4) (АО «ЭКОлаб», Россия, кат. № 264.4);
- для пропитывания мембраны с конъюгатами:
- конъюгаты антител к карбапенемазам ≥ 1 мг/мл в трисовом буфере (рН 7,4);
- конъюгаты НЧ-КЗ с мышинными иммуноглобу-

линами $IgG \geq 0,5$ мг/мл в трисовом буфере (рН 7,4) (АО «ЭКОлаб», Россия, кат. № 264.4).

Дополнительная серия постановок включала титрование концентраций растворов реагентов для проведения лабораторного исследования.

Изучение специфической активности всех компонентов опытно-производственных серий наборов при их хранении в условиях контролируемой повышенной температуры (условиях искусственного старения) позволило установить гарантируемый срок годности набора, который составил 25 месяцев.

Завершение лабораторных испытаний и написание нормативных технических документов (технических условий и инструкции по применению) знаменовало завершение процесса создания нового медицинского изделия «ИХА-CARBA-5» Тест-система иммунохроматографическая для качественного определения карбапенемаз КРС, ОХА, VIM, IMP и NDM в бактериальной колонии из культуры» по ТУ 21.20.23-368-70423725-2024.

Разработанные наборы «ИХА-CARBA-5» характеризовались следующими нормативными показателями аналитической чувствительности (предел обнаружения) по отношению к определяемым карбапенемазам: к КРС - от 600 пг/мл и выше; к ОХА - от 300 пг/мл и выше; к VIM - от 300 пг/мл и выше; к IMP - от 200 пг/мл и выше, к NDM - от 150 пг/мл и выше.

Принцип проведения иммунохроматографического теста. Тест представляет собой вариант классического иммунохимического взаимодействия антигенов и антител: в качестве антигенов служат специфические эпитопы выявляемых карбапенемаз, в качестве антител - меченные коллоидным золотом конъюгаты (НЧ-КЗ + моноклональные антитела). Образец тестируемой культуры микроорганизмов вносят через специальную лунку (S) кассеты на поверхность тест-полоски, где, смачивая мембрану тест-полоски, он взаимодействует со смесью меченных НЧ-КЗ моноклональными антителами к различным карбапенемазам, выбирая для образования сложного иммунного комплекса наиболее соответствующие себе. Образовавшиеся сложные иммунные комплексы продвигаются за счёт капиллярных сил в толще нитроцеллюлозной подложки и достигают поперечных линий из иммобилизованных моноклональных антител к каждому из определяемых ферментов; здесь они специфически взаимодействуют и заяко-

реваются в продвижении.

Если в исследуемой пробе содержались микроорганизмы, продуцирующие карбапенемазы, то по окончании исследования они концентрируются в области соответствующих тест-линий иммуносорбента, образуя за счёт частиц золота окрашенные в розовый цвет полосы. При отсутствии карбапенемаз окрашивается только контрольная линия, свидетельствующая о правильном выполнении всех этапов исследования и валидности использованной тест-системы.

Порядок подготовительных процедур и проведения исследования.

Подготовка культур к исследованию. Для исследования применяют разнообразные анализы, полученные от человека с соблюдением стерильных условий: фекалии, раневое отделяемое, биологические жидкости: амниотическая жидкость, гной, кровь лимфа, мокрота, желчь, молозиво, моча, секрет предстательной железы, слизь со слизистых оболочек, синовиальная жидкость, сперма, спинномозговая жидкость, тканевая жидкость, плевральная жидкость, носовая слизь, пот, трансудат, ушная сера или экссудат. Каждый образец высевают на плотные питательные среды и культивируют с целью получения изолированных колоний. Разработаны рекомендации по использованию определённых типов питательных сред для последующего определения карбапенемаз: ХРОМагар™^МСуперКАРБАгм, агар Мюллер-Хинтона, УРИселект™^М4, Триптиказо-соевый агар, 5% Колумбийский агар лошадиной крови, Хромогенный агар Chromid ESBL, Хромогенный агар Chromid CARBA smart, агар Дригальского, Лурия бульон и Лурия агар.

Процедуры отбора биологических проб, посева и культивирования обеспечиваются соблюдением условий стерильности в соответствии со стандартными процедурами. По завершении периода культивирования через 18-24 часа при 37 °С на поверхности агара выявляют выросшие изолированные колонии микроорганизмов.

Подготовка образцов. Из флаконов в микропробирку (типа Эппендорф) вносят 5 капель (~200 мкл) экстракционного буферного раствора (входит в состав набора реагентов). С помощью бактериологической петли выбранную колонию культуры снимают с плотной питательной среды и переносят в одноразовую микропробирку с буфером; материал суспендируют с целью гомогенизации (рис. 2).

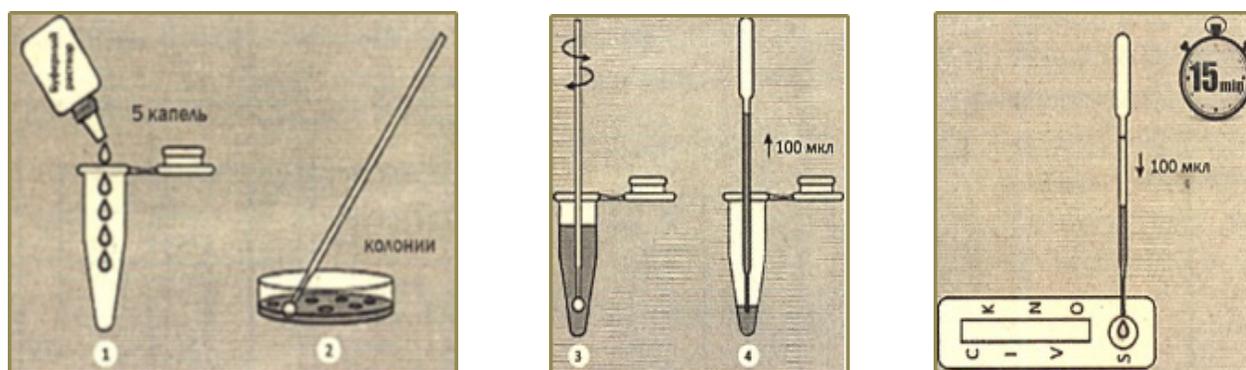


Рис. 2. Порядок подготовки образца и проведения исследования с набором реагентов «ИХА-CARBA-5» по ТУ 21.20.23-368-70423725-2024».

Проведение исследования:

Перед исследованием все компоненты набора и исследуемые образцы доводят до комнатной температуры (18-25 °С), упаковку с тест-кассетой сохраняют при указанной температуре до вскрытия! Все реагенты готовы к применению.

Непосредственно перед проведением анализа тест-кассету извлекают из индивидуальной упаковки, кладут на чистую сухую горизонтальную поверхность лицевой стороной вверх и маркируют.

С помощью пипетки Пастера (в положении вертикально) набирают и переносят 3 капли (~100 мкл) подготовленной ранее исследуемой пробы в лунку тест-кассеты, отмеченную литерой «S»).

Начинают отсчёт времени по секундомеру. Тест-кассету не трогают и не перемещают.

Результат исследования учитывают через 15-20 минут (не позднее 20 минут!).

Интерпретация результатов. Степень окраски розовых линий на ИХ тест-полоске может варьировать в зависимости от концентрации карбапенемаз в исследуемом образце (рис. 3).

Положительный результат оценивают по проявлению двух или более чётких окрашенных линий: одной - в контрольной зоне (С) и другой(других) - в тестовой зоне (I, V, K, N, O).

Отрицательный результат: в контрольной зоне (С) образуется окрашенная линия, в тестовых зонах (I, V, K, N, O) окрашивания не происходит.

Недействительный результат регистрируют в случае, когда в контрольной зоне (С) не появляется окрашенной линии независимо от состояния линий в тестовой зоне (I, V, K, N, O).

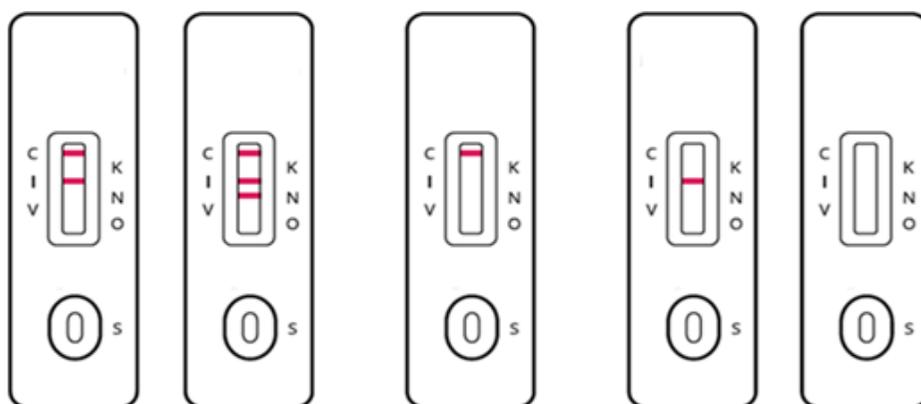


Рис. 3. Интерпретация результатов исследования с набором реагентов «ИХА-CARBA-5» по ТУ 21.20.23-368-70423725-2024».

При получении недействительного результата исследование следует повторить с использованием тест-кассеты из другой серии набора реагентов «ИХА-CARBA-5».

Результаты внутренних доклинических испытаний разработанного набора. В рамках внутренних доклинических испытаний разработанного набора реагентов «ИХА-CARBA-5» проведено исследование колоний, выросших на плотных питательных средах из 254 клинических образцов от пациентов ЛПУ. Исследования с тремя опытно-производственными сериями разработанного набора реагентов и набором сравнения полностью совпадали по типу выявляемых карбапенемаз: колонии микроорганизмов из 106 образцов содержали карбапенемазы (KPC - в 26 образцах, OXA - в 18, VIM - в 24, IMP - в 13, NDM - в 25 образцах колоний микроорганизмов) и из 148 клинических образцов - их не содержали (см. таблицу). Верифицирующее исследование в ПЦР двумя наборами реагентов подтвердило наличие карбапенемаз как по общему количеству проб, так и по типу кодирующих их экспрессию генов. Проведёнными исследованиями, установлена высокая клиническая чувствительность и специфичность разрабо-

танного нового набора реагентов «ИХА-CARBA-5» (по 100%), стабильность времени получения результатов и отсутствие выраженной межсерийной вариабельности.

Полученные результаты сопоставлены с опубликованными данными, полученными с использованием ИХ наборов «NG-Test CARBA 5» в лаборатории при Сеульском госпитале (Республика Корея). В ходе проведённых клинических исследований выявлены 78 штаммов продуцирующих и 23 штамма, не продуцирующих карбапенемазы (штаммы дополнительно охарактеризованы в ПЦР и в сиквенсе). Авторы аттестуют показатели клинической чувствительности в ИХА в 100% по отношению к KPC, NDM, OXA-48-like, IMP, в то время как при определении VIM - 92,31% (95% CI 63,97-99,81%); при клинической специфичности результатов - 100%. Затраты времени на проведение ИХ исследования давали преимущество ИХ по сравнению с ПЦР (с набором «Xpert Carba-R assay», СИА), в среднем 24 минуты против 1 часа и 11 минут соответственно [16].

Другая группа внутренних клинико-лабораторных испытаний набора реагентов «ИХА-CARBA-5» выделена для выявления и оценки выраженности возможной вариации результатов ИХ определения карбапене-

маз в присутствии в реакционной среде потенциально интерферирующих веществ: компонентов питательной среды (в концентрации до 100 мг/мл), цельной крови (50 мкг/мл), мочи (50 мкг/мл), слюны (50 мкг/мл), АМП (меропенема, имипенема, дорипенема, эртапенема в концентрациях до 10 мкг/мл и цефтриаксона – до 500 мкг/мл). С этой целью приготовлены образцы, моделирующие потенциальное интерферирующее влияние перечисленных 9 факторов с каждым типом карбапенемаз и без них (9 факторов х 6 типов интерферентов = 54 образца); тестирование выполнено с каждой опытно-производственной серией набора реагентов (4 серии); всего проведено 216 исследований. Не зарегистрировано вариации выраженности позитивного результата в ИХ-исследовании в зависимости от присутствия в реакционной среде изученных потенциальных интерферентов. Не наблюдалось появления ложных положительных результатов в ИХ при отсутствии в среде карбапенемаз, но в присутствии интерферентов.

Третья группа внутренних доклинических испытаний посвящена изучению возможной перекрёстной реактивности на результаты определения ИХ методом наличия и установления типов карбапенемаз в условиях присутствия в исследуемой пробе культур наиболее часто циркулирующих в популяции микроорганизмов (смешанная культура). Для моделирования указанных ситуаций перед исследованием 6 подготовленных проб (5 - содержащих каждый тип карбапенемаз и 1 - их не содержащей) в микропробирки вносили каждую из 6 выбранных культур микроорганизмов: *E. coli* (1,0×10⁶ КОЕ/мл; штамм O₁₅₇:H₇), *Klebsiella pneumoniae* (1,0×10⁶ КОЕ/мл; штамм *K. pneumoniae ssp. pneumoniae* ST 3181K-54), *Enterobacter cloacae* (1,0×10⁶ КОЕ/мл; штамм NCTC 10006), *Pseudomonas aeruginosa* (1,0×10⁶ КОЕ/мл; штамм ST235), *Acinetobacter baumannii* (1,0×10⁶ КОЕ/мл; штамм *Acinetobacter baumannii* 5720), *Staphylococcus aureus* (1,0×10² КОЕ/мл; штамм CC30); всего изучено 36 проб с 4 сериями разработанных наборов. Независимым лаборантом при учёте результатов 144 исследований с разработанным набором «ИХА-CARBA-5» не определено воздействия (перекрёстной реактивности) испытанных штаммов микроорганизмов в указанной концентрации на результаты ИХ тестов.

Проведёнными внутренними доклиническими испытаниями в условиях АО «ЭКОлаб» показана высокая специфичность разработанного набора реагентов «ИХА-CARBA-5» для иммунохроматографического определения в колониях микроорганизмов ферментов устойчивости карбапенемаз (КРС, OXA, VIM, IMP и NDM).

В процессе испытаний подтверждено, что применение ИХ технологии экономно по времени, не требует дополнительного дорогостоящего оборудования, доступно для применения медицинским персоналом клинической лаборатории.

Систематическое широкое использование ИХ наборов для качественного определения карбапенемаз КРС, OXA, VIM, IMP, NDM при оказании медицинской помощи населению направлено на повышение качества оказания этой услуги, экономное расходование средств на антибактериальные препараты и позволяет осуществлять эпидемиологический мониторинг распространения карбапенемаза-резистентных штаммов в популяции.

Заключение. Сотрудниками АО «ЭКОлаб» при решении задач по импортозамещению и в целях обеспечения учреждений здравоохранения России доступными диагностическими медицинскими изделиями для оказания медицинской помощи населению разработан новый отечественный набор реагентов «ИХА-CARBA-5» Тест-система иммунохроматографическая для качественного определения карбапенемаз КРС, OXA, VIM, IMP и NDM в бактериальной колонии из культуры» по ТУ 21.20.23-368-70423725-2024». Проведёнными внутренними доклиническими испытаниями с новым ИХ набором реагентов «ИХА-CARBA-5» при исследовании 254 клинических образцов (в том числе 106, содержащих энтеробактерии, синтезирующие карбапенемазы КРС, OXA, VIM, IMP, NDM, и 148 образцов, их не содержащих), установлена высокая клиническая специфичность и чувствительность результатов исследования (по 100%) и отсутствие внутри- и межсерийной варибельности результатов тестирования. Установленные показатели сопоставимы с зарубежным аналогом. Аналитическая чувствительность (предел обнаружения) теста «ИХА-CARBA-5» установлена в отношении определяемых аналитов: КРС - 600 пг/мл; OXA - 300

Результаты клинических испытаний по определению карбапенемаз в реакции иммунохроматографии с разработанными наборами «ИХА-CARBA-5» (серии 1 и 2, годные 09.02.26 и серии 3 и 4, годные до 10.02.26) и тест-системой сравнения «NG-Test CARBA 5» (серия 190323-01, годна до 2025-11) и верифицирующего определения кодирующих генов карбапенемазных групп в ПЦР с наборами реагентов «АмплиСенс® MDR MBL-FL» (серия 15.12.23, годен до 2024-09-15) и «АмплиСенс® MDR КРС/OXA-48-FL» (серия 17.12.23, годен до 2024-09-17)

Аналит	n	Результаты исследований с наборами реагентов													
		«ИХА-CARBA-5»								«NG-Test CARBA 5»		«АмплиСенс® MDR MBL-FL»		«АмплиСенс® MDR КРС/OXA-48-FL»	
		сер. 01		серия 02		серия 03		серия 04		пол.	отр.	пол.	отр.	пол.	отр.
		пол.	отр.	пол.	отр.	пол.	отр.	пол.	отр.						
Образцы СОП-368	11	10	1	10	1	10	1	10	1	10	1	-	-	-	-
Колонии из клинических образцов, содержавшие карбапенемазы	106	106	0	106	0	106	0	106	0	106	0	62	0	44	0
Колонии из клинических образцов, не содержавшие карбапенемазы	148	0	148	0	148	0	148	0	148	0	148	0	00	0	0

Примечание. n - количество исследований; пол. – положительный результат; отр. – отрицательный результат.

пг/мл; VIM - 300 пг/мл; IMP - 200 пг/мл и NDM - 150 пг/мл. Изучение клинических образцов, содержащих потенциально интерферирующие вещества (плотную питательную среду, цельную кровь, мочу, слюну, АМП (меропенем, имипенем, дорипенем, эртапенем или цефтриаксон) или потенциально перекрестно реагирующие культуры (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*), демонстрирует отсутствие влияния этих факторов на положительные результаты определения карбапенемаз или появление ложных положительных результатов. По завершении государственной регистрации в Российской Федерации в установленном законом порядке Набор реагентов «ИХА-CARBA-5» Тест-система иммунохроматографическая для качественного определения карбапенемаз КРС, OXA, VIM, IMP и NDM в бактериальной колонии из культуры» по ТУ 21.20.23-368-70423725-2024» может быть рекомендован для внедрения в практику здравоохранения, что позволит обеспечить своевременное и качественное оказание медицинской помощи населению и осуществлять эпидемиологический мониторинг циркуляции карбапенемаз-продуцирующих штаммов бактерий в популяции.

ЛИТЕРАТУРА (П.П. 2, 3, 5-7, 12, 16 С.М. REFERENCES)

1. Яковлев С.В., Суrowa М.П., Быков А.О. Инфекции, вызванные карбапенемо-резистентными энтеробактериями: эпидемиология, клиническое значение и возможности оптимизации антибактериальной терапии. *Антибиотики и химиотерапия*. 2020; 65: 5-6.
2. Давидович Н.В., Кукалевская Н.Н., Башилова Е.Н., Бажукова Т.А. Основные принципы эволюции антибиотикорезистентности у бактерий (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65(6): 387-93.
3. Кузьменков А.Ю., Трушин И.В., Авраменко А.А., Эйдельштейн М.В., Дехнич А.В., Козлов Р.С. AMRmap: Интернет-платформа мониторинга антибиотикорезистентности. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2017; 19(2): 84-90.
4. Полищук А.Г., Якубович Е.И., Полухина О.В., Осовских В.В., Евтушенко В.И. Карбапенемазопродуцирующие грамотрицательные бактерии в специализированном стационаре ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий» Санкт-Петербурга. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2017; 19(3): 235-42.
5. Тапальский Д.В., Осипов В.А., Жаворонок С.В. Карбапенемазы грамотрицательных бактерий: распространение и методы детекции. *Медицинский журнал*. 2012; 2: 10-5.
6. Распоряжение Правительства Российской Федерации от 25.09.2017 г. № 2045-р. "Об утверждении Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года".
7. Попов Д.А. Сравнительная характеристика современных методов определения продукции карбапенемаз. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2019; 21(2): 125-33.
8. DIALAB medical. Каталог. Экспресс-тест для определения карбапенемаз КРС, OXA, VIM, IMP и NDM (NG-Test CARBA5). Электронный ресурс. <http://diallab.ru/product/ngb-car-s23-014-iht-ng-test-carba5-dlya-opred-karba-penemaz-krc-oxa-vim-imp-i-ndm-20-kasset>.
9. Экспресс-тест для качественного иммунохроматографического определения карбапенемаз КРС, OXA, VIM, IMP и NDM в бактериальной колонии из культуры в биологическом материале "CARBA5-ИМБИАН-ИХА". Электронный ресурс. <https://analitika-med.ru/products/94936/RZH-2023-21446/#home> (Дата обращения 10.06.2024). (in Russian)
10. Акиншина Ю.А., Марданлы С.Г., Ротанов С.В., Помазанов В.В., Киселева В.А. О количественном определении D-димера в крови иммунохроматографическим методом. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67(2): 91-6. DOI: 10.15620/0869-2084-2022-67-2-91-96.
11. Акиншина Ю.А., Марданлы С.Г., Ротанов С.В., Малышев В.В., Змеева Т.А. и др. Разработка иммунохроматографического набора реагентов для выявления ротавирусов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (11): 672-9. DOI: 10.51620/0869-2084-2021-68-11-672-679.
12. Акиншина Ю.А., Марданлы С.Г., Ротанов С.В. Об иммунохроматографическом выявлении *Helicobacter pylori* у человека. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69 (4): 123-30. DOI: 10.51620/0869-2084-2024-69-4-123-130.
13. Ротанов С.В., Марданлы С.Г., Попова Т.В., Акиншина Ю.А. О распространении *Helicobacter pylori* среди населения Павлово-Посадского района Московской области. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2024; 29 (2): 82-9. DOI: 10.51620/3034-1981-2024-29-2-82-89.
14. Акиншина Ю.А., Марданлы С.Г., Ротанов С.В., Гашенко Т.Ю. Однотипное выявление маркеров возбудителей острых кишечных вирусных инфекций у человека. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2024; 29 (2): 97-106. DOI: 10.51620/3034-1981-2024-29-2-97-106.

REFERENCES

1. 1. Yakovlev S.V., Suvorova M.P., Bykov A.O. Infections caused by Carbapenem-resistant Enterobacterales: Epidemiology, clinical significance, and possibilities for antibiotic therapy optimization. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2020; 65: 5-6. DOI: 10.37489/0235-2990-2020-65-5-6-41-69. (in Russian)
2. Blair J.M., Webber M.A., Baylay A.J., Ogbolu D.O., Piddock L.J. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*. 2015; 13(1): 42-51.
3. Holmes A.H., Moore L.S., Sundsfjord A., Steinbakk M., Regmi S., Karkey A. et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet*. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet*. 2016; 387(10014): 176-87.
4. Davidovich N.V., Kukalevskaya N.N., Bashilova E.N., Bazhukova T.A. Basic principles of the evolution of antibiotic resistance in bacteria (Literature review). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2020; 65(6): 387-93. DOI: 10.15620/0869-2084-2020-65-6-387-393. (in Russian)
5. Bush K. The ABCD's of β -lactamase nomenclature. *The Journal of Infection and Chemotherapy*. 2013; 19(4): 549-59. DOI: 10.1007/s10156-013-0640-7.
6. Davies J., Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2010; 74(3): 417-33.
7. Antimicrobial Resistance Global Report on surveillance. Webcast of Q-A. Session on global report on surveillance, 2014. Web resource: http://apps.who.int/iris/bit-stream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1 (date of the application: 10.07.2024).
8. Kuz'menkov A.Yu., Trushin I.V., Avramenko A.A., Eydel'shteyn M.V., Dekhnichev A.V., Kozlov R.S. AMRmap: an online platform for monitoring antibiotic resistance. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2017; 19(2): 84-90. (in Russian)
9. Polishchuk A.G., Yakubovich E.I., Polukhina O.V., Osovskikh V.V., Evtushenko V.I. Carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in the Russian research center of radiology and surgical technologies. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2017; 19(3): 235-42. (in Russian)
10. Tapalskiy D.V., Osipov V.A., Zhavoronok S.V. Carbapenemases of gram-negative pathogens: spread and methods of detection. *Medit-sinskiy zhurnal*. 2012; 2: 10-5. (in Russian)
11. Order of the Government of the Russian Federation of September 25, 2017. № 2045-p. Strategy to prevent the spread of antimicrobial resistance in the Russian Federation for the period up to 2030. Web resource: <http://government.ru/docs/29477> (date of the application: 10.06.2024). (in Russian)
12. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0, 2016. Web resource: www.eucast.org.
13. Popov D.A. Comparative review of the modern methods for carbapenemases detection. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimik-*

- robnaya khimioterapiya*. 2019; 21(2): 125-33. DOI: 10.36488/cmac/2019/2/125-133. (in Russian)
14. Electronic resource DIALAB medical. Catalog. Rapid test for the determination of carbapenemases KPC, OXA, VIM, IMP and NDM (NG-Test CARBA5). Web resource: <http://diallab.ru/product/ngb-car-s23-014-iht-ng-test-carba5-dlya-opred-karbapenemaz-kpc-oxa-vim-imp-i-ndm-20-kasset> (date of the application 10.06.2024). (in Russian)
 15. Express test for qualitative immunochromatographic determination of carbapenemases KPC, OXA, VIM, IMP and NDM in a bacterial colony from a culture in biological material "CARBA5-IMBIAN-IHA" according to TU 21.20.23-051-39271034-2023. Web resource: <https://analitikamed.ru/products/94936/RZH-2023-21446/#home>. (date of the application 10.06.2024.) (in Russian)
 16. Yoon J., Kim C.H., Yoon S.Y., Lim C.S., Lee C.K. Application of a multiplex Application of a multiplex immunochromatographic assay for rapid identification of carbapenemases in a clinical microbiology laboratory: performance and turn-around-time evaluation of NG-test Carba 5. *BMC Microbiology*. 2021; 21: 260.
 17. Akinshina Yu.A., Mardanly S.G., Rotanov S.V., Malyshev V.V., Zmeeva T.A. et al. On the quantitative determination of D-dimer in blood by immunochromatographic method. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2022; 67(2): 91-6. DOI: 10.15620/0869-2084-2024-67-2-91-96. (in Russian)
 18. Akinshina Yu.A., Mardanly S.G., Rotanov S.V. On the immunochromatographic detection of *Helicobacter pylori* in humans. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2024; 69 (4): 123-30. DOI: 10.51620/0869-2084-2024-69-4-123-130. (in Russian)
 19. Rotanov S.V., Mardanly S.G., Popova T.V., Akinshina Yu.A. On the spread of *Helicobacter pylori* among the population of the Pavlovo-Posad district of the Moscow region. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni*. 2024; 29 (2): 82-9. DOI: 10.51620/3034-1981-2024-29-2-82-89. (in Russian)
 20. Akinshina Yu.A., Mardanly S.G., Rotanov S.V., Gashenko T.Yu. One-stage detection of markers of causes of acute intestinal viral infection in humans. *Epidemiologiya I infeksionnye bolezni*. 2024; 29 (2): 97-106. DOI: 10.51620/3034-1981-2024-29-2-97-106. (in Russian)

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Кузьмич Е. В.¹, Павлова И. Е.¹, Хамаганова Е. Г.², Кузьминова Е. П.², Кудинова Э. Е.³, Бубнова Л. Н.¹

ПРИМЕНЕНИЕ ПРОГРАММЫ HAPLOSTATS ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ HLA-ГЕНОТИПА

¹ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», 191024, Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава РФ, 125167, Москва, Россия;

³ГБУ Ростовской области «Станция переливания крови», 344037, Ростов-на-Дону, Россия

Введение. Программа HaploStats позволяет определить наиболее вероятный HLA-генотип в формате высокого разрешения на основании результатов HLA-типирования низкого уровня разрешения и этнической принадлежности, что может быть важным для более точной оценки степени гистосовместимости пары донор-реципиент и профиля анти-HLA антител у реципиентов органного трансплантата.

Цель - оценка точности прогнозирования HLA-генотипов с помощью программы HaploStats.

Материал и методы. В исследование включены 119 жителей Северо-Западного и 120 жителей Южного Федеральных округов России, русских согласно самоопределению. Высокоразрешающее HLA-типирование выполнено методом секвенирования нового поколения. Полученные результаты преобразовывались в эквиваленты низкого разрешения для ввода в программу HaploStats. Прогнозирование наиболее вероятного HLA-генотипа в формате высокого разрешения осуществлялось программой HaploStats с учетом этничности обследованных лиц (кавказоиды).

Результаты. Более высокая точность прогнозирования HLA-генотипов отмечалась при введении в HaploStats данных низкоразрешающего HLA-типирования генов HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1. Применение в качестве исходных данных результатов типирования генов HLA-A, -B, -DRB1 снижало точность прогнозирования. Для русских Северо-Западного Федерального округа доля безошибочных результатов уменьшалась с 58,0% до 41,2% ($p=0,01$), для русских Южного Федерального округа – с 47,5% до 26,7% ($p=0,001$). Точность прогнозирования вероятных HLA-генотипов для русских Северо-Западного Федерального округа несколько выше, чем для русских Южного Федерального округа. Если в качестве исходных данных применялись результаты HLA-типирования низкого уровня разрешения генов HLA-A, -B, -DRB1, выявленные различия статистически достоверны (41,2% против 26,7%, $p=0,02$). При прогнозировании наиболее вероятных HLA-генотипов на основе данных HLA-типирования низкого уровня разрешения генов HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 различия не достигали уровня статистической значимости (58,0% против 47,5%, $p=0,12$).

Заключение. Результаты исследования продемонстрировали недостаточную точность прогнозирования HLA-генотипов с помощью программы HaploStats для русских популяций. Этот факт может объясняться несоответствием иммуногенетических характеристик русских и эталонных панелей HLA-гаплотипов, используемых программой HaploStats.

Ключевые слова: донор; гистосовместимость; органная трансплантация; HaploStats; HLA-гаплотип; HLA-генотип; HLA-типирование

Для цитирования: Кузьмич Е. В., Павлова И. Е., Хамаганова Е. Г., Кузьминова Е. П., Кудинова Э. Е., Бубнова Л. Н. Применение программы HaploStats для прогнозирования HLA-генотипа. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69 (10): 530-535.

DOI: <https://doi.org/10.51620-0869-2084-2024-69-10-530-535>

Для корреспонденции: Кузьмич Елена Витальевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник НИИ иммунологии ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА»; e-mail: yelenakuzmich@gmail.com

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 21.08.2024

Принята к печати 02.09.2024

Опубликовано 01.10.2024

Kuzmich E. V.¹, Pavlova I. E.¹, Khamaganova E. G.², Kuzminova E. P.², Kudinova E. E.³, Bubnova L. N.¹

APPLICATION OF THE HAPLOSTATS PROGRAM FOR HLA-GENOTYPE PREDICTION

¹Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology, Federal Medical and Biological Agency, 191024, St. Petersburg, Russian Federation;

²National Medical Research Center for Hematology, 125167, Moscow, Russian Federation;

³Blood Transfusion Station of Rostov Region, 344037, Rostov-on-Don, Russian Federation

Background. The HaploStats allows the determination of the most likely high-resolution HLA genotype based on low-resolution HLA typing and ethnicity, which may be important for a more accurate assessment of the donor-recipient histocompatibility and the anti-HLA antibody profile in organ transplant recipients.

Aim. To evaluate the accuracy of HLA genotype prediction using the HaploStats.

Material and methods. 119 residents of the North-Western and 120 residents of the Southern regions of Russia, Russians according to self-determination, were included in the study. High-resolution HLA typing was performed by next generation sequencing. The obtained results were converted into low-resolution equivalents for input into the HaploStats. Prediction of the most likely high-resolution HLA-genotype was performed by the HaploStats taking into account the ethnicity (Caucasoid).

Results. Higher accuracy of HLA-genotype prediction was observed when low-resolution HLA typing of HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 genes were entered into the HaploStats. Using HLA-A, -B, -DRB1 gene typing as input data reduced the accuracy of prediction. For Russians of the Northwestern region, the correct results decreased from 58.0% to 41.2% ($p=0.01$), for Russians of the Southern region – from 47.5% to 26.7% ($p=0.001$). The accuracy of predicting probable HLA-genotypes for Russians of the Northwestern region was a bit higher than for Russians of the Southern region. If low-resolution typing of HLA-A, -B, -DRB1 genes was used as initial data, the differences were statistically significant (41.2% vs. 26.7%, $p=0.02$). If low-resolution typing of HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 genes was used, the differences were not statistically significant (58.0% vs. 47.5%, $p=0.12$).

Conclusion. The results of the study demonstrated insufficient accuracy of HLA-genotype prediction using the HaploStats for Russians. This fact can be explained by the discrepancy between the immunogenetic characteristics of Russians and reference panels of HLA-haplotypes used by the HaploStats.

Key words: donor; HaploStats; histocompatibility; HLA-genotype; HLA-haplotype; HLA-typing; organ transplantation

For citation: Kuzmich E.V., Pavlova I.E., Khamaganova E.G., Kuzminova E.P., Kudinova E.E., Bubnova L. N. Application of the Haplostats program for HLA-genotype prediction. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024;69 (10): 530-535 (in Russ.)

DOI: <https://doi.org/10.51620-0869-2084-2024-69-10-530-535>

For correspondence: Kuzmich E.V., PhD (Biology), Leading Researcher, Research Laboratory of Immunology, Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology, Federal Medical and Biological Agency; e-mail: yelenakuzmich@gmail.com

Information about authors:

Kuzmich E.V., <https://orcid.org/0000-0003-0489-1763>;

Pavlova I.E., <https://orcid.org/0000-0001-7756-4902>;

Khamaganova E.G., <https://orcid.org/0000-0002-0110-3314>;

Kuzminova E.P., <https://orcid.org/0000-0001-9473-4774>;

Kudinova E.E., <https://orcid.org/0000-0001-7407-9864>;

Bubnova L.N., <https://orcid.org/0000-0002-6690-3742>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 21.08.2024

Accepted 02.09.2024

Published 01.10.2024

Введение. Комплекс иммуногенетических исследований, выполняемый при планировании органной трансплантации, включает HLA-типирование (определение лейкоцитарных антигенов человека, Human Leucocyte Antigens – HLA) реципиента и донора, определение анти-HLA антител и индивидуальную перекрёстную пробу на совместимость (Crossmatch). Согласно Стандартам Европейской федерации иммуногенетики (European Federation for Immunogenetics – EFI), обязательным условием проспективного обследования донора и реципиента является типирование антигенов HLA-A, -B и -DR. Необходимость исследования дополнительных локусов определяется национальными нормативными актами. Перед проведением трансплантации для реципиента и живого донора должно быть выполнено подтверждающее HLA-типирование [1].

В настоящее время для реципиентов и доноров органного трансплантата наиболее часто проводится типирование низкого уровня разрешения генов HLA-A, -B и -DRB1 с помощью методов полимеразной цепной реакции с использованием сиквенс-специфичных праймеров (PCR-SSP) или сиквенс-специфичных олигонуклеотидных проб (PCR-SSOP) [2]. Однако результаты ряда исследований демонстрируют, что HLA-типирование высокого уровня разрешения и более широкий спектр типлируемых HLA-генов значительно повышают точность оценки степени гистосовместимости пары донор-реципиент и выявления донор-специфических анти-HLA антител [2-6].

Недостаточно широкое применение методов HLA-типирования высокого уровня разрешения в области

органной трансплантации объясняется большей длительностью выполнения исследований, стоимостью, трудоёмкостью, необходимостью специального оборудования (генетические анализаторы – секвенаторы). Для тех случаев, когда HLA-типирование методом секвенирования недоступно, существует возможность применения компьютерных программ, разработанных для прогнозирования наиболее вероятных HLA-генотипов индивидуумов на уровне высокого разрешения. Подобные программы могут использоваться со следующими целями: оценка потенциального наличия донор-специфических анти-HLA антител (ДСА) для проведения виртуального кроссматча и принятия решения о необходимости предоперационной терапии; анализ соответствия доноров и реципиентов на эпитоном уровне для более эффективного распределения донорских органов; стратификация пациентов по риску развития донор-специфических анти-HLA антител (ДСА) de novo и неблагоприятному исходу трансплантации [6].

Программное обеспечение HaploStats, созданное группой биоинформатики Национальной программы донорства костного мозга США (National Marrow Donor Program, NMDP), позволяет прогнозировать наиболее вероятный HLA-генотип индивидуума (комбинация двух HLA-гаплотипов) в формате высокого разрешения на основании результатов HLA-типирования низкого уровня разрешения и этнической принадлежности [7]. HaploStats использует эталонные панели частот HLA-гаплотипов для 21 этнической группы, установленные в результате обследования потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток NMDP [8].

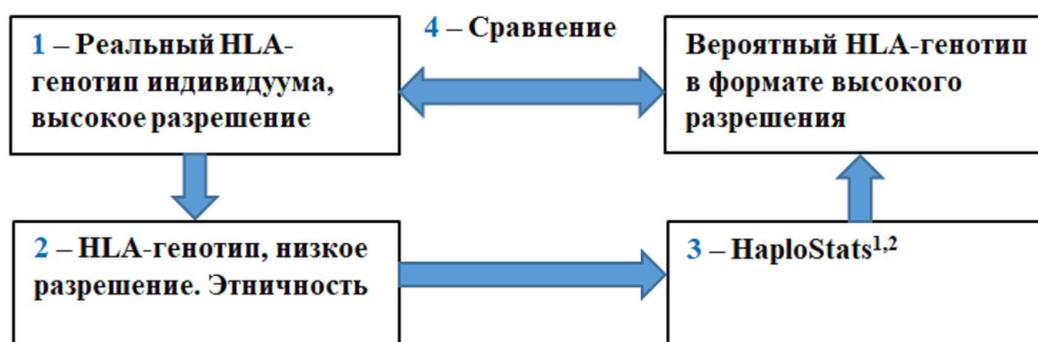
Цель исследования - оценка точности прогнозирования HLA-генотипов с помощью программы HaploStats.

Материал и методы. В исследование включены 119 жителей Северо-Западного и 120 жителей Южного Федеральных округов (ФО) России, русских согласно самоопределению. HLA-типирование высокого/аллельного уровня разрешения выполнено с помощью метода секвенирования нового поколения (next-generation sequencing, NGS) с использованием реактивов производства GenDx (Нидерланды). Полученные результаты преобразовывались в эквиваленты низкого разрешения.

HLA-типирование низкого уровня разрешения - определение принадлежности к группе HLA-аллелей, которой соответствует конкретный HLA-антиген.

HLA-типирование высокого уровня разрешения - определение принадлежности к подгруппе HLA-аллелей, кодирующих идентичную аминокислотную последовательность в пределах антигенсвязывающего сайта [1].

В программу HaploStats вводились следующие исходные данные: *HLA-A, -B, -DRB1* или *HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1* на уровне низкого разрешения. Прогнозирование наиболее вероятного HLA-генотипа на уровне высокого разрешения осуществлялось программой HaploStats с учётом этничности индивидуумов (Европеоидная раса, Caucasoids). Вероятный HLA-генотип сопоставлялся с реальным. Оценка совпадения HLA-генотипов проводилась в соответствии с определением HLA-типирования высокого уровня разрешения [1]. Алгоритм исследования представлен на рисунке.



Алгоритм исследования.

¹Метод 1. В программу HaploStats вводятся результаты низкоразрешающего типирования генов *HLA-A, -B, -DRB1*.

²Метод 2. В программу HaploStats вводятся результаты низкоразрешающего типирования генов *HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1*.

Сравнительный анализ результатов, полученных для двух обследованных когорт, выполнен с помощью точного теста Фишера с применением программного обеспечения СТАТИСТИКА 10.

Результаты. На первом этапе исследования проанализирована точность вероятных HLA-генотипов, определённых HaploStats на основе данных HLA-

типирования низкого уровня разрешения генов *HLA-A, -B, -DRB1*. Для популяции русских Южного ФО вероятные HLA-генотипы совпадали с реальными результатами высокоразрешающего HLA-типирования в 26,7% случаев, ошибки имели место в 73,3% случаев. Несовпадение по одному HLA-аллелю отмечалось в 33,3%, по 2 и более HLA-аллелям - в 40% случаев (табл. 1).

Таблица 1

Точность прогнозирования HLA-генотипов на основе данных HLA-типирования низкого уровня разрешения генов *HLA-A, -B, -DRB1*

Совпадение реального и вероятного HLA-генотипов	Русские - жители Северо-Западного ФО России, n=119		Русские - жители Южного ФО России, n=120	
	Количество	%	Количество	%
Отсутствие несовпадений	49	41,2	32	26,7
Наличие несовпадений, из них:	70	58,8	88	73,3
1 HLA-аллель	32	26,9	40	33,3
2 HLA-аллеля	21	17,6	30	25,0
3 HLA-аллеля	10	8,4	9	7,5
4 HLA-аллеля	4	3,4	6	5,0
5 HLA-аллелей	2	1,7	2	1,7
7 HLA-аллелей	0	0	1	0,8
8 HLA-аллелей	1	0,8	0	0
Несовпадение по аллелям генов:				
<i>HLA-A</i>	7	5,1	10	6,0
<i>HLA-B</i>	31	22,5	31	18,5
<i>HLA-C</i>	39	28,2	60	35,7
<i>HLA-DRB1</i>	37	26,8	37	22,0
<i>HLA-DQB1</i>	24	17,4	30	17,8
Число несовпадающих аллелей всего	138	100	168	100

Наиболее часто наблюдались ошибки определения *HLA-C* аллелей - 35,7% случаев. Для популяции русских Северо-Западного ФО вероятные HLA-генотипы совпадали с реальными результатами высокоразрешающего HLA-типирования в 41,2% случаев, ошибки наблюдались в 58,8% случаев. Несовпадение по одному HLA-аллелю имело место в 26,9%, по двум и более HLA-аллелям - в 31,9% случаев. Наиболее распространёнными были ошибки определения *HLA-C* - 28,2% и *HLA-DRB1* аллелей - 26,8% (табл. 1).

При прогнозировании вероятных HLA-генотипов на основе результатов HLA-типирования низкого уровня разрешения генов *HLA-A, -B, -DRB1* для русских Северо-Западного ФО наблюдался более высокий процент безошибочных результатов по сравнению с русскими Южного ФО (41,2% против 26,7%, $p=0,02$).

На втором этапе проанализирована точность вероятных HLA-генотипов, определённых NaploStats на основе данных HLA-типирования низкого уровня

разрешения генов *HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1*. Для популяции русских Южного ФО вероятные HLA-генотипы совпадали с реальными результатами высокоразрешающего HLA-типирования в 47,5% случаев; ошибки наблюдались в 52,5% случаев. Несовпадение по одному HLA-аллелю имело место в 34,2%, двум аллелям - 15%, трём аллелям - 3,3% случаев. Наиболее часто наблюдались ошибки определения *HLA-DRB1* аллелей - 33,7% и *HLA-B* - 25,8% (табл. 2).

Для популяции русских Северо-Западного ФО вероятные HLA-генотипы совпадали с реальными результатами высокоразрешающего HLA-типирования в 58,0% случаев, ошибки наблюдались в 42,0% случаев. Несовпадение по одному HLA-аллелю имело место в 25,2%, двум аллелям - 12,6%, трём аллелям - 3,4%, четырём аллелям - 0,8% случаев. Наиболее распространены ошибки определения *HLA-DRB1* аллелей - 39,5% и *HLA-B* - 28,9% (см. табл. 2).

Таблица 2

Точность прогнозирования HLA-генотипов на основе данных HLA-типирования низкого уровня разрешения генов *HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1*

Совпадение реального и вероятного HLA-генотипов	Русские - жители Северо-Западного ФО России, $n=119$		Русские - жители Южного ФО России, $n=120$	
	Количество	%	Количество	%
Отсутствие несовпадений	69	58,0	57	47,5
Наличие несовпадений, из них:	50	42,0	63	52,5
1 HLA-аллель	30	25,2	41	34,2
2 HLA-аллеля	15	12,6	18	15,0
3 HLA-аллеля	4	3,4	4	3,3
4 HLA-аллеля	1	0,8	0	0
Несовпадение по аллелям генов:				
<i>HLA-A</i>	6	7,9	10	11,3
<i>HLA-B</i>	22	28,9	23	25,8
<i>HLA-C</i>	5	6,6	13	14,6
<i>HLA-DRB1</i>	30	39,5	30	33,7
<i>HLA-DQB1</i>	13	17,1	13	14,6
Число несовпадающих аллелей всего	76	100	89	100

При прогнозировании вероятных HLA-генотипов на основе данных HLA-типирования низкого уровня разрешения генов *HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1* достоверные различия точности прогнозирования HLA-генотипов для русских Северо-Западного и Южного ФО не были выявлены (58,0% против 47,5%, $p=0,12$).

Вероятные HLA-генотипы для русских Северо-Западного ФО определялись более точно, если в качестве исходных данных в NaploStats вводились результаты типирования генов *HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1*. Доля безошибочных результатов составляла 58,0% против 41,2% при использовании в качестве исходных данных результатов HLA-типирования генов *HLA-A, -B, -DRB1* ($p=0,01$).

Аналогичная закономерность наблюдалась при прогнозировании вероятных HLA-генотипов для русских Южного ФО. Доля безошибочных результатов при введении в NaploStats данных типирования генов *HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1* составляла 47,5% против 26,7% в случае введения результатов HLA-типирования генов *HLA-A, -B, -DRB1* ($p=0,001$).

Обсуждение. HLA-типирование, выполняемое при

подготовке к органной трансплантации, необходимо для определения степени гистосовместимости пары донор-реципиент и анализа профиля анти-HLA-антител у пациента. В настоящее время оценка степени HLA-совместимости пациентов и доноров органного трансплантата наиболее часто осуществляется на основе данных типирования низкого уровня разрешения генов *HLA-A, -B, -DRB1*. Однако развитие технологий HLA-типирования и идентификации анти-HLA антител выявило ряд ограничений при использовании подобного подхода [5]. Согласно данным исследований, анти-HLA-DQ антитела являются наиболее распространенным типом ДСА *de novo*, развивающихся после трансплантации почки; несовпадение донора и реципиента в локусе HLA-DQ повышает риск потери трансплантата [9,10]. Показано, что заключение о наличии (либо отсутствии) ДСА, сделанное на основании данных HLA-типирования низкого уровня разрешения, может быть опровергнуто результатами высокоразрешающего HLA-типирования. Пациенты с ложноположительным определением ДСА *de novo* могут подвергаться инвазивным процедурам,

таким как протокольная биопсия, и терапии, направленной на устранение аллоантител. Для пациентов с нераспознанными циркулирующими ДСА *de novo* может применяться стратегия постепенной минимизации терапии, что может способствовать повышению риска иммуноопосредованного поражения трансплантата и его преждевременной утрате [2]. Высокоразрешающее HLA-типирование и расширенный спектр исследуемых HLA-генов могут позволить улучшить результаты органных трансплантаций. Мы проанализировали возможность применения программы HaploStats для прогнозирования вероятного HLA-генотипа на уровне высокого разрешения в случаях, когда HLA-типирование методом секвенирования недоступно.

В процессе исследования установлено, что при использовании в качестве исходных данных результатов низкоразрешающего HLA-типирования генов *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1*, *-DQB1* программа HaploStats более точно прогнозирует вероятные HLA-генотипы в формате высокого разрешения. Применение в качестве исходных данных результатов типирования генов *HLA-A*, *-B*, *-DRB1* снижает точность прогнозирования. В частности, для русских Северо-Западного ФО доля безошибочных результатов уменьшалась с 58,0% до 41,2% ($p=0,01$), для русских Южного ФО - с 47,5% до 26,7% ($p=0,001$).

Если в качестве исходных данных в программу HaploStats вводились результаты низкоразрешающего HLA-типирования генов *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1*, *-DQB1*, для представителей обеих обследованных популяций наиболее часто наблюдались ошибки определения *HLA-B* и *HLA-DRB1* аллелей, что может объясняться значительным полиморфизмом этих генов. Ген *HLA-B* является наиболее полиморфным из всех HLA-генов (10080 аллелей, известных к настоящему времени); ген *HLA-DRB1* наиболее вариабельный среди HLA-генов II класса (3714 аллелей) [11].

Точность прогнозирования вероятных HLA-генотипов в формате высокого разрешения для русских, проживающих в Северо-Западном ФО несколько выше, чем для русских-жителей Южного ФО. Если в качестве исходных данных применялись результаты HLA-типирования низкого уровня разрешения генов *HLA-A*, *-B*, *-DRB1* указанные отличия статистически достоверны (41,2% против 26,7%, $p=0,02$). При прогнозировании наиболее вероятных HLA-генотипов на основе данных HLA-типирования низкого уровня разрешения генов *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1*, *-DQB1* различия не достигали уровня статистической значимости (58,0% против 47,5%, $p=0,12$). Под влиянием различных факторов (значительная территория нашей страны, внутренние и внешние межэтнические контакты), русские популяции, сформировавшиеся в различных регионах нашей страны, приобрели некоторые особенности иммуногенетических профилей [12]. Этот факт, вероятно, объясняет наблюдавшиеся различия в точности прогнозирования HLA-генотипов для русских Северо-Западного и Южного ФО России.

Важно подчеркнуть, что общий высокий процент ошибочных результатов, может объясняться тем, что эталонные панели частот HLA-гаплотипов, используемые программой HaploStats, созданы на основе результатов иммуногенетического обследования потенциальных доноров ГСК, привлеченных NMDP. Данные

популяционных исследований свидетельствуют, что иммуногенетические профили русских и представителей других популяций, принадлежащих к европеоидной расе, имеют характерные отличия [12-16]. В составе доноров, привлеченных NMDP, представлены преимущественно потомки переселенцев из стран Западной Европы.

В исследование не включены представители других этнических групп, проживающих на территории Российской Федерации. Согласно данным литературы, точность прогнозирования вероятных *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1*, *-DQB1* генотипов с помощью программы HaploStats для индивидуумов, не принадлежащих к европеоидной расе, достоверно ниже по сравнению с кавказоидами [6].

Заключение. Результаты исследования продемонстрировали недостаточную точность прогнозирования *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1*, *-DQB1* генотипов в формате высокого разрешения с помощью программы HaploStats для русских. Создание аналогичной программы с учётом иммуногенетических характеристик этнических групп, проживающих на территории России, может повысить точность оценки степени гистосовместимости пары донор-реципиент и выявления донор-специфических анти-HLA антител у реципиентов органного трансплантата.

ЛИТЕРАТУРА

- Standards for Histocompatibility & Immunogenetics testing, version 8.0. Available at: <https://efi-web.org/committees/standards-committee>.
- Meneghini M., Perona A., Crespo E., Bemelman F., Reinke P., Viklicky O. et al. On the clinical relevance of using complete high-resolution HLA typing for an accurate interpretation of posttransplant immune-mediated graft outcomes. *Front. Immunol.* 2022; 13. Available at: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2022.924825/full>.
- Vogiatzi P. Some considerations on the current debate about typing resolution in solid organ transplantation. *Transplant. Res.* 2016; 5. Available at: <https://transplantationresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13737-016-0032-5>.
- Huang Y., Dinh A., Heron S., Gasiewski A., Kneib C., Mehler H. et al. Assessing the utilization of high-resolution 2-field HLA typing in solid organ transplantation. *Am. J. Transpl.* 2019; 19(7): 1955-63. DOI: 10.1111/ajt.15258.
- Senev A., Emonds M.P., Van Sandt V., Lerut E., Coemans M., Sprangers B. et al. Clinical importance of extended second field high-resolution HLA genotyping for kidney transplantation. *Am. J. Transpl.* 2020; 20(12): 3367-78. DOI: 10.1111/ajt.15938.
- Engen R.M., Jedraszko A.M., Conciatori M.A., Tambur A.R. Substituting imputation of HLA antigens for high-resolution HLA typing: Evaluation of a multiethnic population and implications for clinical decision making in transplantation. *Am. J. Transpl.* 2021; 21(1): 344-52. DOI: 10.1111/ajt.16070.
- HaploStats software. Available at: <https://www.haplostats.org/haplostats?execution=e1s1>.
- Gragerl L., Madbouly A., Freeman J., Maiers M. Six-locus high resolution HLA haplotype frequencies derived from mixed-resolution DNA typing for the entire US donor registry. *Hum. Immunol.* 2013; 74(10): 1313-20. DOI: 10.1016/j.humimm.2013.06.025.
- DeVos J.M., Gaber A.O., Knight R.J., Land J.A., Suki W.N., Gaber L.W. et al. Donor-specific HLA-DQ antibodies may contribute to poor graft outcome after renal transplantation. *Kidney Int.* 2012; 82(5): 598-604. DOI: 10.1038/ki.2012.190.
- Leeaphorn N., Pena J.R.A., Thamcharoen N., Khankin E.V., Pavlakis M., Cardarelli F. HLA-DQ mismatching and kidney transplant outcomes. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2018; 13(5): 763-71. DOI:

- 10.2215/CJN.10860917.
11. IPD-IMG/HLA Database. Statistics. Available at: <https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/about/statistics/>.
 12. Кузьмич Е.В., Павлова И.Е., Бубнова Л.Н. Генетические дистанции между русскими различных регионов России и другими популяциями. *Медицинская иммунология*. 2024. Available at: <https://www.mimmun.ru/mimmun/article/view/2886>.
 13. Суслowa Т.А., Вавилов М.Н., Сташкевич Д.С., Беляева С.В., Хромова Е.Б., Евдокимов А.В. и др. Иммуногенетический профиль (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1) популяции русских Челябинской области. *Гематология и трансфузиология*. 2015; 60(30): 28-35.
 14. Хамаганова Е.Г., Кузьминова Е.П., Чапова Р.С., Гапонова Т.В., Савченко В.Г. HLA-A*/B*C*/DRB1*/DQB1*-гены и гаплотипы у доноров костного мозга регистра ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, самоопределившихся как русские. *Гематология и трансфузиология*. 2017; 62(2): 65-70. DOI: 10.18821/0234-5730-2017-62-2-65-70.
 15. Логинова М.А., Махова О.А., Кутявина С.С., Смирнова Д.Н., Обухов И.Л., Парамонов И.В. и др. Профиль распределения HLA-аллелей и -гаплотипов у русских доноров Иркутской области. *Трансфузиология*. 2021; 22(2): 161-78.
 16. Кузьмич Е.В., Павлова И.Е., Беляева Е.В., Бубнова Л.Н. Иммуногенетическая характеристика доноров гемопоэтических стволовых клеток, являющихся представителями наиболее многочисленных этнических групп России. *Медицинская иммунология*. 2024; 26(2): 281-90. DOI: 10.15789/1563-0625-ICO-2657.
 5. Senev A., Emonds M.P., Van Sandt V., Lerut E., Coemans M., Sprangers B. et al. Clinical importance of extended second field high-resolution HLA genotyping for kidney transplantation. *Am. J. Transpl.* 2020; 20(12): 3367-78. DOI: 10.1111/ajt.15938.
 6. Engen R.M., Jedraszko A.M., Conciatori M.A., Tambur A.R. Substituting imputation of HLA antigens for high-resolution HLA typing: Evaluation of a multiethnic population and implications for clinical decision making in transplantation. *Am. J. Transplant.* 2021; 21(1): 344-52. DOI: 10.1111/ajt.16070.
 7. HaploStats software. Available at: <https://www.haplostats.org/haplostats?execution=e1s1>.
 8. Gragert L., Madbouly A., Freeman J., Maiers M. Six-locus high resolution HLA haplotype frequencies derived from mixed-resolution DNA typing for the entire US donor registry. *Hum. Immunol.* 2013; 74(10): 1313-20. DOI: 10.1016/j.humimm.2013.06.025.
 9. DeVos J.M., Gaber A.O., Knight R.J., Land J.A., Suki W.N., Gaber L.W. et al. Donor-specific HLA-DQ antibodies may contribute to poor graft outcome after renal transplantation. *Kidney Int.* 2012; 82(5): 598-604. DOI: 10.1038/ki.2012.190.
 10. Leeaphorn N., Pena J.R.A., Thamcharoen N., Khankin E.V., Pavlakis M., Cardarelli F. HLA-DQ mismatching and kidney transplant outcomes. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2018; 13(5): 763-71. DOI: 10.2215/CJN.10860917.
 11. IPD-IMG/HLA Database. Statistics. Available at: <https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/about/statistics/>.
 12. Kuzmich E.V., Pavlova I.E., Bubnova L.N. Genetic distances between Russians of different regions of Russia and other populations. *Meditsinskaya immunologiya*. 2024. Available at: <https://www.mimmun.ru/mimmun/article/view/2886>. (in Russian)
 13. Suslova T.A., Vavilov M.N., Stashkevich D.S., Belyaeva S.V., Khromova E.B., Evdokimov A.V. et al. Immunogenetic profile (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1) of the Russian population in Chelyabinsk region. *Gematologiya i transfuziologiya*. 2015; 60(3): 28-35. (in Russian)
 14. Khamaganova E.G., Kuzminova E.P., Chapova R.S., Gaponova T.V., Savchenko V.G. HLA-A*/B*C*/DRB1*/DQB1*-genes and haplotypes in self-assessed as Russians donors of bone marrow Registry (National Research Center for Hematology). *Gematologiya i transfuziologiya*. 2017; 62(2): 65-70. DOI: 10.18821/0234-5730-2017-62-2-65-70. (in Russian)
 15. Loginova M.A., Makhova O.A., Kutyavina S.S., Smirnova D.N., Obukhov I.P., Paramonov I.V. et al. Distribution profile of HLA alleles and haplotypes the Russian donors of the Irkutsk region. *Transfuziologiya*. 2021; 22(2): 161-78. (in Russian)
 16. Kuzmich E.V., Pavlova I.E., Belyaeva E.V., Bubnova L.N. Immunogenetic characteristics of hematopoietic stem cell donors representing the most numerous ethnic groups in Russia. *Meditsinskaya immunologiya*. 2024; 26(2): 281-90. DOI: 10.15789/1563-0625-ICO-2657. (in Russian)

REFERENCES

1. Standards for Histocompatibility & Immunogenetics testing, version 8.0. Available at: <https://efi-web.org/committees/standards-committee>.
2. Meneghini M., Perona A., Crespo E., Bemelman F., Reinke P., Viklicky O. et al. On the clinical relevance of using complete high-resolution HLA typing for an accurate interpretation of posttransplant immune-mediated graft outcomes. *Front. Immunol.* 2022; 13. Available at: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2022.924825/full>
3. Vogiatzi P. Some considerations on the current debate about typing resolution in solid organ transplantation. *Transplant. Res.* 2016; 5. Available at: <https://transplantationresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13737-016-0032-5>.
4. Huang Y., Dinh A., Heron S., Gasiewski A., Kneib C., Mehler H. et al. Assessing the utilization of high-resolution 2-field HLA typing in solid organ transplantation. *Am. J. Transpl.* 2019; 19(7): 1955-63. DOI: 10.1111/ajt.15258.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Ротанов С.В.^{1,2}, Марданлы С.Г.^{1,3}, Акиншина Ю.А.¹, Марданлы А.Г.⁴

ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОЕ КАЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ У ЧЕЛОВЕКА АНТИГЕНОВ КОРОНАВИРУСА И ВИРУСОВ ГРИППА А И В НА ОСНОВЕ ТЕХНОЛОГИИ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

¹АО «ЭКОлаб», 142530, г. Электрогорск, Россия;

²ФБУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора (ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора), 142279, г. о. Серпухов, п. Оболенск, Россия

³ГОУВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет» (ГОУ ВО МО «ГТТУ»), 142611, г. Орехово-Зуево, Россия

⁴«Нахчыванский государственный университет», AZ7012, Нахчыван, Азербайджан

Представлены результаты разработки и апробации с клиническими образцами нового отечественного набора реагентов «Тест-система иммунохроматографическая для качественного определения антигена коронавируса SARS-CoV-2 и антигенов вирусов гриппа А и В в биологическом материале человека «ИХА-КОВИГРИПП» по ТУ 21.20.23-379-70423725-2024». Представлен композитный состав иммунохроматографических (ИХ) тест-полосок и указания по использованию. В расширенных доклинических испытаниях показаны высокие характеристики клинической чувствительности, специфичности, воспроизводимости (по 100%), установлена аналитическая чувствительность набора (предел обнаружения) по отношению к стандартным образцам предприятия и ряду международных вирус- и антиген-содержащих стандартов. В серии испытаний оценён ряд потенциально интерферирующих лекарственных веществ и перекрёстно реагирующих культур микроорганизмов, содержащихся в клинических пробах у обследуемых лиц с подозрением на ОРВИ. Не установлено влияния интерферирующих средств в изученных концентрациях и циркулирующих в популяции микроорганизмов на положительные или отрицательные результаты ИХ исследования с новым набором. Набор ИХ реагентов представлен к официальной регистрации в Российской Федерации.

Ключевые слова: иммунохроматография; лабораторная диагностика; коронавирус SARS-CoV-2; вирусы гриппа А и В; набор реагентов

Для цитирования: Ротанов С.В., Марданлы С.Г., Акиншина Ю.А., Марданлы А.Г. Дифференцированное качественное определение у человека антигенов коронавируса и вирусов гриппа А и В на основе технологии иммунохроматографического анализа. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69 (10): 536-547.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-10-536-547>

Для корреспонденции: Акиншина Юлия Александровна, руководитель научно-производственного отдела иммунохроматографических тест-систем АО «ЭКОлаб»; e-mail: akinshina.opr@mail.ru

Финансирование. Исследование выполнено в соответствии с научным производственным планом предприятия при полном финансировании АО «ЭКОлаб».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 17.08.2024

Принята к печати 23.08.2024

Опубликовано 00.10.2024

Rotanov S.V.^{1,2}, Mardanly S.G.^{1,3}, Akinshina Yu.A.¹, Mardanly A.G.⁴

DIFFERENTIATED QUALITATIVE DETERMINATION OF CORONAVIRUS AND INFLUENZA A AND B VIRUS IN HUMANS BASED ON IMMUNOCHROMATOGRAPHIC ANALYSES TECHNOLOGY

¹JSC «EKOLab», 142530, Elektrogorsk, Russia;

²Federal budgetary institution of Science «State Scientific Centre of Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор (FSBI "SSC PMB" of Rosпотребнадзор), 142279, Serpukhov, Obolensk, Russia;

³State educational institution of higher education of the Moscow region «State Humanitarian University of Technology» (GGTU), 142611, Orekhovo-Zuyevo, Russia

⁴"Nakhchivan State University", AZ7012, Nakhchivan, Azerbaijan

The article presents the results of the development and testing with clinical samples of a new domestic reagent kit «Immunochromatographic test system for the qualitative determination of the SARS-CoV-2 coronavirus antigen and influenza A and B virus antigens in human biological material «ИХА-КОВИГРИПП» according to TU 21.20.23-379-70423725-2024». The composition of immunochromatographic test strips and instructions for use are presented. Extended preclinical trials showed high characteristics of clinical sensitivity, specificity and reproducibility (100% each), the analytical sensitivity of the kit (detection limit) in relation to standard samples of the enterprise and a number of international virus- and antigen- containing standards was established. A series of tests evaluated a number of potentially interfering drugs and cross-reacting cultures of microorganisms contained in clinical samples of individuals suspected of having acute respiratory inflammatory infection. No effect of interfering agents in the studied concentrations and microorganisms circulating in the population on positive or negative results of the IHCA study with the new kit was established. The reagent kit is submitted for official registration in the Russian Federation.

Key words: immunochromatography; laboratory diagnostics; SARS-CoV-2 coronavirus; influenza A and B viruses; reagent kit

For citation: Rotanov S.V., Mardanly S.G., Akinshina Yu.A., Mardanly A.G Differentiated qualitative determination of coronavirus and influenza A and B virus antigens in humans based on immunochromatographic analysis technology. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (10): 536-547 (in Russ.)
DOI: https://doi.org/10.15620/0869-2084-2024-69-10-536-547

For correspondence: Akinshina Yulia Aleksandrovna, specialist of the Innovative Development Department CJSC “EKOLab”;
e-mail: akinshina.opr@mail.ru

Information about authors:

Rotanov S.V., <https://orcid.org/0000-0002-3222-1401>;

Mardanly S.G., <https://orcid.org/0000-0003-3650-2363>;

Akinshina Yu.A., <https://orcid.org/0000-0002-9223-3455>;

Mardanly A.G., <https://orcid.org/0009-0001-1591-1849>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 17.08.2024

Accepted 23.08.2024

Published 00.10.2024

Введение. По данным официальной статистической отчётности острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) в настоящее время занимают первое место в структуре всех инфекционных заболеваний человека, что определяет эту патологию как одну из самых актуальных медицинских проблем [1]. Пандемия новой коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, которую наблюдали с 2019 г. по май 2023 г., внесла изменение в структуру эпидемиологических показателей ОРВИ. На пике эпидемии коронавирусной инфекции в Российской Федерации (2020-2021 гг.) циркуляция всех типов вирусов гриппа в популяции большинства регионов практически прекратилась. В следующие эпидемические сезоны (2021-2022 и 2022-2023 гг.) наблюдалось постепенное возвращение вирусов гриппа в человеческую популяцию: преимущественно подтипа A(H₃N₂), с небольшим участием подтипа вируса гриппа B Викторианской линии и при отсутствии подтипа A(H₁N₁)pdm09. К концу 2023 года соотношение и выявление типов вирусов гриппа вновь претер-

пело изменение и составило: 3,3, 30,3, 66,5% соответственно [2].

Эпидемиологические показатели заболеваемости населения Российской Федерации различными типами ОРВИ систематически отслеживаются и публикуются на страницах электронного ресурса ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева» Минздрава РФ [3]. В структуре заболеваемости населения ОРВИ в настоящее время помимо COVID-19 и гриппа представлены инфекции, вызываемые вирусами парагриппа 1-4 типов, аденовирусами, респираторно-синцитиальными (RS) и другими риновирусами, сезонными коронавирусами, метапневмовирусами и др. Интенсивные эпидемиологические показатели суммарной заболеваемости ОРВИ и гриппом в России довольно высокие (рис. 1).

По статистическим показателям Роспотребнадзора в России в 2022 г. ОРВИ переболело 29,1% населения страны, в 2023 г. этот показатель снизился до 23,6%. Одновременно постоянно сообщается о регистрации на территории РФ новых случаев COVID-19 инфекции.

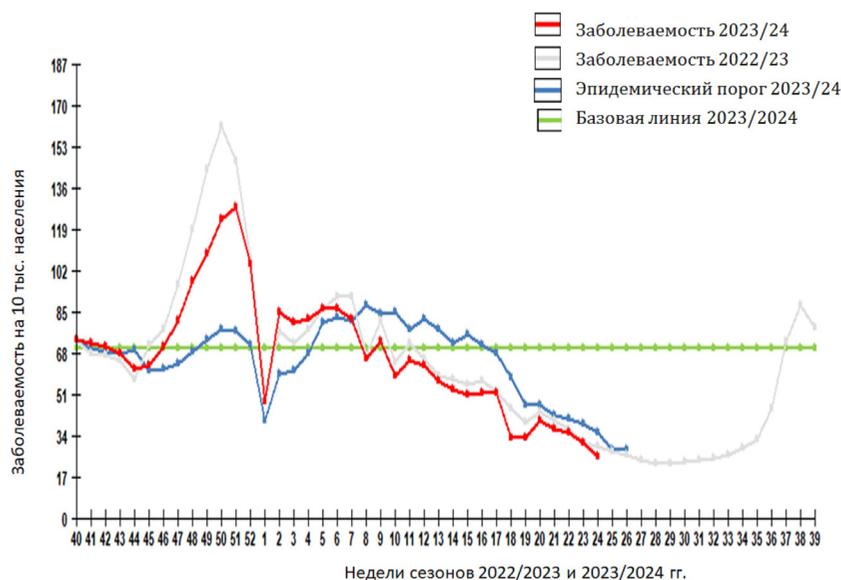


Рис. 1. Сравнительные данные по заболеваемости гриппом и ОРВИ в городах России в сезоны 2022/23 и 2023/24 гг. (цит. по электронному ресурсу ФГБУ НИИ гриппа» Минздрава РФ [3]).

Клиническая картина ОРВИ не имеет чётко выраженных признаков, позволяющих чётко осуществлять дифференциальную диагностику заболевания. Для этого необходимо проводить клинические лабораторные исследования с применением молекулярно-генетических тестов. Для ранней клинической диагностики типа ОРВИ (особенно в случаях тяжёлых острых респираторных инфекций - ТОРИ), и своевременного принятия решения по началу оказания пациентам необходимой лечебной помощи, организации и проведения противоэпидемиологических мероприятий в очагах инфекции в настоящее время регламентируется применение диагностических лабораторных исследований на основе иммунохроматографического анализа (ИХА).

На сайтах ведущих отечественных производителей диагностических средств широко представлены комплекты для проведения ИХА исследований, как в формате обследования с качественным определением антигенов вируса гриппа (типа А и В), RS-вируса, вируса SARS-CoV-2 и других, а также специфических иммуноглобулинов по отношению к большинству этих возбудителей [4-6]. Преимуществами применения технологии ИХА является доступность проведения такого исследования при отсутствии необходимости использования дорогостоящего лабораторного оборудования, при небольших затратах времени на выполнение теста и получении при этом высокоспецифичного и высокочувствительного достоверного результата, длительные сроки годности наборов без снижения аналитических характеристик. Несколько снижает ценность ИХА теста то обстоятельство, что при проведении значительного количества ИХА-тестов исследователь получает только качественный результат, подтверждающий или исключающий содержание определяемого анализата в изучаемой пробе.

Цель исследования: разработка нового отечественного набора реагентов в формате комбинированной иммунохроматографической тест-кассеты для одновременного качественного дифференцированного определения в образцах биоматериала человека (мазках из носо- и ротоглотки или в слюне) антигенов коронавируса SARS-CoV-2, вирусов гриппа А и В для дифференциации этих заболеваний у пациента, и расширенная клиническая оценка разработанного нового медицинского изделия.

Материал и методы. При конструировании новой тестовой ИХ полоски применены технологические подходы и опыт практического создания сложных композитных ИХ мембран, дискретно содержащих различные специфические реагенты для определения нескольких изучаемых вирусных антигенов одновременно, поскольку это обеспечивает возможность выполнения диагностического исследования в рамках одной лабораторной постановки [7-10].

В работе использованы разные виды биологического материала человека: мазки-соскобы со слизистой оболочки носоглотки и ротоглотки, слюна пациентов.

В соответствии с разработанным дизайном применена техника конструирования многослойной ИХ тест-полоски, состоящей из композитов различного предназначения:

подложку полилита формировали бумагой силико-

низированной размером 60x4,0 мм и толщиной 0,2-0,6 мм (фирма ООО «ПКФ Современные технологии», Россия, кат. № ИНА-100);

в качестве иммуносорбента применяли полоску нитроцеллюлозной мембраны, характеризующуюся высокой пропускной способностью, размером 60x4,0 мм и толщиной 185 мкм ± 20% (фирма «MDI», Индия, Type CNPC-SS12, 15 мкм), с нанесёнными реагентами:

- на тестовую линию «В» - моноклональными антителами к вирусу гриппа типа В (в концентрации ≥0,5 мг/мл в фосфатном буфере с pH 7,4; ООО «Хайтест», Россия, кат. № 3IF18);

- на тестовую линию «А» - моноклональными антителами к вирусу гриппа типа А (в концентрации ≥0,5 мг/мл в фосфатном буфере с pH 7,4; ООО «Хайтест», Россия, кат. № 3IN5, клон InA108);

- на тестовую линию «Т» - моноклональными антителами к антигену N SARS-CoV-2 (в концентрации ≥0,5 мг/мл в трисовом буфере; ООО «Хайтест», Россия, кат. № 3CV4);

- на контрольную линия - козьими антителами к иммуноглобулинам класса G (IgG) мыши (в концентрации ≥1 мг/мл в фосфатном буфере с pH 7,4; АО «ЭКОлаб», Россия, кат. №264.4);

на стрип размещали мембрану для нанесения конъюгата размером 9x4,0 мм (фирма «MDI», Индия, Type PT-R1), с нанесёнными и высушенными конъюгатами: антител к вирусу гриппа типа В (в концентрации ≥1 мг/мл в фосфатном буфере с pH 7,4; ООО «Хайтест», Россия, кат. № 3BH9), антител к вирусу гриппа типа А (в концентрации ≥1 мг/мл в фосфатном буфере с pH 7,4; ООО «Хайтест», Россия, кат. № 3IN5, клон InA224), антител к вирусу SARS-CoV-2 (в концентрации ≥1 мг/мл в фосфатном буфере с pH 7,4; ООО «Хайтест», Россия, кат. №3CV4), иммуноглобулинами мыши класса IgG (в концентрации ≥0,5 мг/мл в фосфатном буфере с pH 7,4; АО «ЭКОлаб», Россия, кат. № 264.1) с коллоидными наночастицами золота (размер - 30-80 нм);

в участке для внесения образца размещали впитывающую мембрану размером 20x4,0 мм, толщиной 0,6-0,8 мм и плотностью 270±20 г/м² (фирма «MDI», Индия, Type GFB-R7L);

для адсорбции жидкой фазы с растворами и реагентами, не вступившими в реакцию веществами, применяли мембраны размером 16x4,0 мм, толщиной 0,2-0,5 мм и плотностью 179±5 г/м² (фирма «MDI», Индия, Type AP110).

Для приготовления буферных растворов и растворов реагентов применяли деионизованную воду с удельным сопротивлением 18,2 Ом·м при 25° С (набор сорбирующих колонок «Simplicity System», фирмы «Millipore», США). Стерилизующую фильтрацию неионизированной воды и солевых растворов обеспечивали их пропусканием через фильтрующую колонку со стандартным набором (предфильтр и фильтры с калиброванной величиной пор - 0,45 и 0,22 мкм; фирмы «Millipore», США).

С учётом особого вида биоматериала, применяемого для диагностического исследования с разрабатываемым изделием, в комплектацию набора реагентов включили необходимые комплектующие:

- пластиковую микропробирку с буферным раствором для приготовления образца со встроенной ка-

пельницей (Cangzhou ShengFeng Plastic Product Co., Ltd., Китай), содержащий 0,3 мл 0,01 М фосфатного буфера (pH-7,2-7,4) с твин-20 2,5% (фирмы «ROTH», Германия, кат. № 9127.2) и азидом натрия 0,1% (фирмы ДИА-М, Россия, кат. № 3402);

- зонд медицинский одноразовый стерильный из полиамид-нейлона (длиной 146,0 мм ± 10% и диаметром 2,5 мм ± 10%; длина наконечника – 17,0±5,0 мм; масса зонда 0,5±0,15 г) по РУ №РЗН 2021/13989 от 09.12.2022 (ООО «Фарммедполис РТ»; Россия).

Лабораторные исследования в процесс разработки и проведения внутренних клинических испытаний по оценке диагностических показателей с новым набором реагентов обеспечены клиническими образцами биологических материалов, предоставленными из нескольких медицинских организаций (в соответствии с договорами о безвозмездном сотрудничестве):

ООО «ИНВИТРО» (лицензия ЛО-77-01-012556 от 22.06.2016 г.);

ГБУЗ МО «Электрогорская клиническая больница» (лицензия Л041-01162-50/00344915 от 19 февраля 2015 г.);

Диагностического Центра «El Clinic» АО «ЭКОлаб» (лицензия № Л041-01162-50/00365571 от 08.04.15 г.);

ГБУЗ Орехово-Зуевская станция переливания крови (Лицензия ЛО-50-01-005260 от 02.04.14 г.).

Всего использовано 600 охарактеризованных и заведомо подтвержденных образцов клинического материала (аттестованных на содержание антигенов изучаемых вирусов с помощью наборов реагентов «КовидЭк Директ» (АО «Эколаб», Россия) и ГриппКомплекс А/В (ООО «НПО ДНК-Технология ТС», Россия); из них:

450 мазков из носоглотки, ротоглотки или образцов слюны, полученных от пациентов с диагнозом «COVID-19» или грипп А/В, которые при верификации показывали положительные результаты лабораторных исследований; в том числе 225 проб, одновременно взятых из трёх разных локусов (носоглотка, ротоглотка, слюна);

150 мазков из носоглотки, ротоглотки и образцов слюны, взятых от условно-здоровых людей, не имеющих в анамнезе симптомов ОРВИ и верифицированных с референсными наборами реагентов как отрицательные, то есть не содержавшие вирусов коронавируса SARS-CoV-2 и антигенов вирусов гриппа А и В; в

том числе 75 проб, одновременно взятых из трёх разных локусов (носоглотка, ротоглотка, слюна).

Для изучения возможной интерференции различных эндогенных веществ и лекарственных препаратов на результаты ИХА с набором «ИХА-КОВИГРИПП» смоделированы различные варианты биологических проб (на основе образцов слюны), содержавших и не содержавших один из определяемых антигенов (вируса SARS-CoV-2 или вирусов гриппа типов А и В) и дополнительно содержавших цельную кровь или муцин (n=3) противовирусные препараты (n=9), антибиотики (n=18) или стероидные гормоны (n=9), назальные спреи, мази и муколитики (n=12), анестетики, антипиретики и анальгетики (n=5), витамины (n=4), прочие (n=1); всего смоделировано 244 опытных образца (4 варианта по содержанию одного антигена вирусов или их отсутствию x 61 испытанное лекарственное средство).

Определение вероятной перекрёстной антигенной реактивности и выявление возможности регистрации ложных результатов в ИХА с набором «ИХА-КОВИГРИПП» проведены исследования с 55 клиническими образцами слюны, в которую в условиях лаборатории внесены образцы сопутствующей микрофлоры, наиболее часто циркулирующей в человеческой популяции, в препаративных количествах, позволяющих выявлять эти микроорганизмы лабораторными методами (в ИФА или ПЦР).

Для проведения внутренних доклинических испытаний в стандартных производственных условиях по разработанному ТУ 21.20.23-368-70423725-2024 выпущены 6 опытных серий разработанного набора реагентов «ИХА-КОВИГРИПП»: серии 1, 2, 3 со сроком годности до 01.04.27 г., серии 4, 5, 6 со сроком годности до 10.06.26 года.

В качестве набора сравнения при оценке показателей диагностической информативности нового набора приобретён у производителя «Экспресс-тест для качественного иммунохроматографического определения антигенов коронавируса SARS-CoV-2 и вируса гриппа А/В в биологическом материале «COVINFLUENZA-ИМБИАН-ИХА» по ТУ 21.20.23-064-39271034-2023, Россия (зарегистрированный в Федеральной службе по надзору в сфере здравоохранения - РУ № РЗН 2024/22600 от 08.05.2024), серия 231111 со сроком годности до 24.05.2027 г.

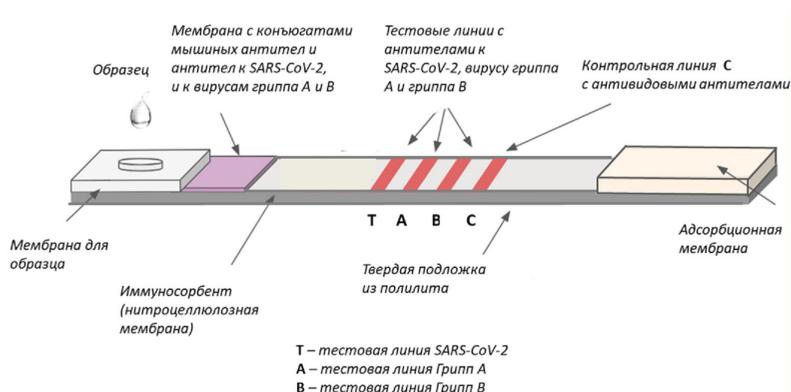


Рис. 2. Структура разработанной комбинированной ИХА тест-полоски набора реагентов по одновременному качественному определению антигенов SARS-CoV-2 и вирусов гриппа А и В.

В качестве референтных тест-систем для верификации результатов ИХА и решения спорных результатов исследований использованы результаты ПЦР-РВ по детекции РНК изучаемых вирусов:

«Набор реагентов «КовидЭк Директ» для выявления РНК вируса SARS-CoV-2 в клиническом материале методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени», РУ № РЗН 2022/17966 от 12.08.2022 (АО «Эколаб», Россия), серия 1025, срок годности до 24.12.2024;

«Набор реагентов для выявления РНК вирусов гриппа А и гриппа В методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени «ГриппКомплекс А/В», РУ № РЗН 2023/19809 от 15 марта 2023 (ООО «НПО ДНК-Технология ТС», Россия), серия 823, срок годности до 12.01.2025.

Все оперативные манипуляции, связанные с забором образцов биологического материала от пациента, их подготовкой и процедурой лабораторного исследования, выполняли с точным соблюдением предписаний, содержащихся в прилагаемых к наборам и приборам инструкциях по применению.

Результаты и обсуждение. Опираясь на имеющийся производственный опыт разработки сложных многопараметрических ИХ тест-полосок [7, 10] решено использовать формат размещения всех тестовых линий на одной удлиненной композитной мембране в следующем порядке: для определения антигена SARS-CoV-2 (Т), для вируса гриппа А (А) и для вируса гриппа В (В), а также зоны общего контроля (С) (рис. 2).

Разработанный композитный ИХ стрип после мастирита вкладывали в индивидуальную пластиковую кассету (контейнер из пластика размером 70x20 мм) с окончатными отверстиями: круглым - для внесения исследуемого образца и прямоугольным - для аналитической зоны (маркирована литерами Т, А, В, зоны контроля, С - Control). Собранный пластиковая тест-кассета является неразборной, тестовые и контрольные линии на мембране визуально не определяются (рис. 3). Каждую кассету вместе с пакетиком силикагеля помещали в индивидуальную упаковку из фольги алюминиевой 120x70 мм (ООО «ПКФ Современные технологии», Россия).

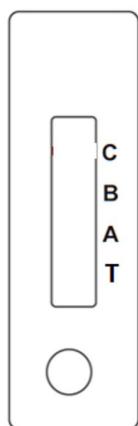


Рис. 3. Внешний вид и маркировка на ИХ тест-кассете для нового набора реагентов по одновременному качественному определению антигенов SARS-CoV-2 и вирусов гриппа А и В.

Для обеспечения процедур внутреннего контроля на этапах производства ИХА набора реагентов, получившего наименование «ИХА-КОВИГРИПП» по ТУ 21.20.23-379-70423725-2024), осуществлена разработка панели стандартных образцов предприятия (СОП-379), содержащих и не содержащих изучаемые ана-

литы (антигены SARS-CoV-2, вируса гриппа А и В) в разных концентрациях:

- образец № 1 содержит антиген коронавируса SARS-CoV-2 в концентрации 20 пг/мл;
- образец № 2 содержит антиген коронавируса SARS-CoV-2 в концентрации 10 пг/мл;
- образец № 3 содержит антиген коронавируса SARS-CoV-2 в концентрации 5 пг/мл;
- образец № 4 содержит антиген коронавируса SARS-CoV-2 в концентрации 2,5 пг/мл;
- образец № 5 содержит антиген коронавируса SARS-CoV-2 в концентрации 1 пг/мл;
- образец № 6 содержит антиген коронавируса SARS-CoV-2 в концентрации 5 мкг/мл;
- образец № 7 содержит антиген вируса гриппа А в концентрации 1 нг/мл;
- образец № 8 содержит антиген вируса гриппа А в концентрации 0,3 нг/мл;
- образец № 9 содержит антиген вируса гриппа А в концентрации 0,1 нг/мл;
- образец № 10 содержит антиген вируса гриппа А в концентрации 0,3 мг/мл;
- образец № 11 содержит антиген вируса гриппа В в концентрации 1 нг/мл;
- образец № 12 содержит антиген вируса гриппа В в концентрации 0,3 нг/мл;
- образец № 13 содержит антиген вируса гриппа В в концентрации 0,1 нг/мл;
- образец № 14 содержит антиген вируса гриппа В в концентрации 0,3 мг/мл;
- образцы № 15-17 не содержат антигены коронавируса SARS-CoV-2, вирусов гриппа А и гриппа В.

Учитывая высокую вариабельность циркулирующих в популяции мутантных штаммов SARS-CoV-2, подготовлена «Панель мутантных штаммов «SARS-CoV-2 антиген», содержащая рекомбинантные антигены коронавируса различных модификаций:

- образцы № 1 и № 2 содержат нуклеокапсидный антиген вируса SARS-CoV-2 штамма Альфа (B.1.1.7);
- образцы № 3 и № 4 содержат нуклеокапсидный антиген вируса SARS-CoV-2 штамма Бета (B.1.351);
- образцы № 5 и № 6 содержат нуклеокапсидный антиген вируса SARS-CoV-2 штамма Гамма (линия PANGO P.1);
- образцы № 7 и № 8 содержат рекомбинантный спайк антиген вируса SARS-CoV-2 штамма Дельта (B.1.617.2);
- образцы № 9 и № 10 содержат нуклеокапсидный антиген вируса SARS-CoV-2 штамма Омикрон (B.1.1.529);
- образцы № 11 и № 12 содержат рекомбинантный спайк антиген вируса SARS-CoV-2 штамма Стелс-Омикрон (BA.2);
- образцы № 13 и № 14 содержат рекомбинантный спайк антиген вируса SARS-CoV-2 штамма Эпсилон (B.1.427, B.1.429);
- образцы № 15 и № 16 содержат рекомбинантный спайк антиген вируса SARS-CoV-2 штамма Эта (B.1.525).

Наличие подобной панели позволяет контролировать производственный продукт и с высокой степенью уверенности гарантировать качество результатов лабораторных исследований.

Лабораторные испытания опытно-производственный серий набора реагентов, «ИХА-КОВИГРИПП», проведённые со всеми образцами СОП-379 и образцами «Панели мутантных штаммов «SARS-CoV-2 антиген», позволили подготовить необходимые нормативные технические документы: технические условия ТУ 21.20.23-379-60423725-2024 и инструкцию по применению набора.

Оценка сроков сохранения специфической активности всех компонентов опытно-производственных серий наборов в условиях их хранения при контролируемой повышенной температуре (искусственное моделирование условий старения) позволила установить гарантируемый срок годности набора, который составил 37 мес. (при хранении медицинского изделия при рекомендуемой температуре от -30 до $+30^{\circ}\text{C}$).

Принцип действия теста. В основе работы набора реагентов применяется метод качественного ИХА. При наличии в исследуемом образце хотя бы одного из определяемых веществ (антигена вируса SARS-CoV-2 или антигенов вируса гриппа А и В) в области внесения исследуемой пробы происходит их взаимодействие со специфичным конъюгатом (представляющим собой антитела к нуклеокапсидному антигену SARS-CoV-2, антитела к антигенам вируса гриппа А (подтипы H_1N_1 и H_3N_2) или В соответственно), меченные частицами индикатора (наночастицы коллоидного золота). При этом формируются иммунные комплексы «антиген-антитело конъюгата», которые мигрирует с током жидкости вдоль тест-полоски. В тестовой зоне происходит взаимодействие образовавшихся иммунных комплексов с соответствующими им по специфичности антителами иммобилизованными на мембране (к антигену вируса SARS-CoV-2 – в тестовой зоне Т или к вирусу гриппа А – тестовая зона А или вируса гриппа В – зона В) с образованием окрашенного комплекса «антитело подложки-антиген-антитело конъюгата». Появление цветной линии в тестовой зоне указывает на положительный результат (выявление в пробе соответствующего анализата), а её отсутствие – на отрицательный (отсутствие в пробе этого анализата). Не вступивший во взаимодействие конъюгат соединяется с антигеновыми антителами в области контрольной зоны (С) с образованием окрашенного иммунного комплекса; эта цветная контрольная линия формируется всегда, независимо от наличия антигенов исследуемых вирусов в образце (свидетельство работоспособности теста и соблюдения условий проведения исследования).

Подготовительные процедуры и порядок исследования.

Исследуемые образцы. Для определения вирусов с помощью разработанного набора используются мазки, полученные из носоглотки, ротоглотки пациента и слюны. Протоколы взятия, транспортировки, хранения исследуемого материала регламентируются в соответствии с МУ¹. Образцы биологического материала следует брать до еды или через 2-3 часа после приёма пищи. Для взятия каждого мазка используют отдельный стерильный зонд-тампон и пробирку для экстракции (входят в комплектацию набора). Буферный раствор содержит натрия азид в безопасной концентрации.

¹МУ 4.2.2039-05. «Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Техника сбора и транспортировки биоматериала в микробиологические лаборатории»

При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки. Все образцы, собранные для лабораторных исследований, должны рассматриваться как потенциально инфицированные, и медицинский персонал, собирающий или перевозящий их, должен строго соблюдать требования биологической безопасности как при работе с микроорганизмами II группы патогенности.

Если мазок не используют в день взятия, то рекомендуется хранить его при температуре $+2 - +8^{\circ}\text{C}$ не более 2 суток или при температуре -20°C не более 2 месяцев.

Рекомендуемый способ получения назофарингеальных мазков представлен на рис. 4.

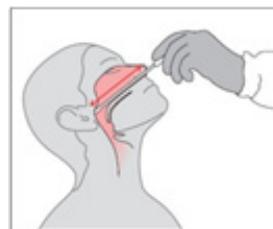


Рис. 4. Взятие мазка из носоглотки.



Рис. 5. Взятие мазка из ротоглотки.

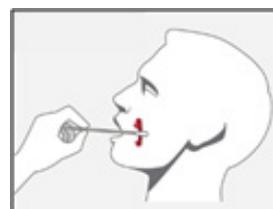


Рис. 6. Взятие образца слюны.

Введите тампон по наружной стенке ноздри параллельно нёбу (не вверх), пока не почувствуете сопротивление или на расстояние равное расстоянию от уха до ноздри пациента; мягкими движениями пальцев несколько раз поверните тампон вокруг своей оси. Образцы можно собирать с обеих сторон одним и тем же тампоном, но не обязательно, если тампон пропитан выделениями из первого сбора.

Рекомендуемый способ получения орофарингеальных мазков представлен на рис. 5.

Пациенту после полоскания рта тёплой кипячённой водой аккуратно введите тампон-зонд между дужками миндалин и язычком. Движением тампона вперед и назад соберите материал с задней поверхности глотки, миндалин и участков воспаления или изъязвления на слизистой оболочке. При взятии пробы не следует касаться щёк, языка, дёсен, а также собирать слюну.

Рекомендуемый способ получения образца слюны представлен на рис. 6.

Введите тампон-зонд в ротовую полость на глубину 2-3 см и вращательным движением соберите мазок с внутренней стороны щёк, под языком, затем обильно пропитайте слюной тампон-зонд в течение 2 минут.

Подготовка образцов. Тампон с биологическим материалом поместите в микропробирку с буферным раствором. Тщательно смойте образец с тампона путём его вращения зонда круговыми движениями в содержимом пробирки (не менее 10 раз). Выдержите тампон в пробирке в течение 1 минуты, приподнимите и отожмите его о внутренние стенки пробирки. Утилизируйте тампон. Закройте пробирку колпачком-капельницей и

перемешайте содержимое пробирки вращательными движениями. Использование зондов, не поставляемых в наборе, может повлиять на качество отбора пробы и результат анализа.

Проведение исследования:

Перед использованием все компоненты набора и исследуемые образцы доводят до комнатной температуры от 18 до 25 °С (пакет с тест-кассетой выдерживают при указанной температуре до вскрытия!). Все реагенты готовы к применению.

Тест-кассету извлекают из индивидуальной упаковки, не касаясь круглого окна для внесения образца; маркируют тест-кассету фамилией или кодовым номером пациента и кладут её на ровную горизонтальную

поверхность.

Из пробирки с ранее подготовленной пробой последовательно вносят по 3 капли (100 мкл) в отверстие для внесения образца на тест-кассете. Для каждого образца используют отдельную тест-кассету.

Запускают таймер.

Результат реакции оценивают визуально через 1-7 минут. Не следует учитывать и интерпретировать результаты позднее 20 минут после внесения пробы.

Учёт и интерпретация результатов. Интенсивность окраски линий зависит от концентрации определяемых антигенов в исследуемом образце; при этом учёту подлежат розовые и красные линии. Интерпретацию результата осуществляют по критериям табл. 1.

Таблица 1

Критерии учета и интерпретации результатов ИХА

Результат исследования		
Положительный	Отрицательный	Недействительный
Проявляются две или более чёткие красные или розовые линии (одна из них должна находиться в контрольной зоне С, другая (другие) - в тестовой): - окрашивание в зоне В - выявлены антигены вируса гриппа В; - в зоне А - выявлены антигены вируса гриппа А; - в зоне Т - выявлены антигены SARS-CoV-2. При микст-инфекциях окрашиваются нескольких тестовых зон	В контрольной зоне С проявляется красная линия, в тестовых зонах (В, А, Т) окрашивания не происходит	В контрольной зоне С не появляется окрашенной линии независимо от наличия линий в тестовых зонах (В, А, Т)

В случае получения недействительного результата исследование следует повторить с использованием другой тест-касеты набора.

Результаты внутренних доклинических испытаний разработанного набора.

Определение аналитических характеристик набора. В серии лабораторных исследований образцов из состава СОП-379, «Панели мутантных штаммов «SARS-CoV-2 антиген» и образцов, приготовленных на основе международных стандартов, проведенных с шестью опытно-производственными сериями набора человека «ИХА-КОВИГРИПП» по ТУ 21.20.23-379-70423725-2024» установлены аналитические характеристики разработанного набора:

- клиническая чувствительность (по СОП-379)
- процентное содержание положительных образцов, определенных набором как положительные - 100%;
- клиническая специфичность (по СОП-379)
- процентное содержание отрицательных образцов, определенных набором как отрицательные - 100%;
- клиническая чувствительность выявления штаммов SARS-CoV-2 (по панели мутантных штаммов «SARS-CoV-2») - 100%;
- аналитическая чувствительность выявления антигена SARS-CoV-2 - 5 пг/мл (образец № 3 из состава СОП-379);
- аналитическая чувствительность выявления

антигена SARS-CoV-2 - 0,1 МЕ/мл (при использовании «1st WHO International Standard for SARS-CoV-2 antigen NIBSC code: 21/368»);

- аналитическая чувствительность выявления антигена SARS-CoV-2 - 100 TCID₅₀/мл (при использовании «SARS-CoV-2 infectious virus (B.1.1.7. lineage) NIBSC code: 101019»);

- аналитическая чувствительность выявления антигена SARS-CoV-2 - 300 БОЕ/мл (при использовании «HEK293T-ACE2-TMPRSS2 NIBSC code: 101008»);

- аналитическая чувствительность выявления вируса гриппа типа А - 0,3 нг/мл (образец № 8 из состава СОП-379 «КовиГрипп А/В-Ag»);

- аналитическая чувствительность выявления антигена вируса гриппа типа А - 1000 ед./мл (по «Working Standard Winter respiratory panel: Influenza A H1N1 NIBSC code 20/180»);

- аналитическая чувствительность выявления антигена вируса гриппа типа А - 1000 ед./мл (по «Working Standard Winter respiratory panel: Influenza A H3N2 NIBSC code 20/182»);

- аналитическая чувствительность выявления вируса гриппа типа В - 0,3 нг/мл (образец № 12 из состава СОП-379 «КовиГрипп А/В-Ag»);

- аналитическая чувствительность выявления антигена вируса гриппа типа В - 1000 ед./мл (по «Working Standard Winter respiratory panel: Influenza B

Таблица 2

Результаты клинических испытаний по определению антигенов коронавируса SARS-CoV-2 и вирусов гриппа А/В методом иммунохроматографии с разработанным набором «ИХА-КОВИГРИПП» (серии 1-6) и набором сравнения «COVINFLU ENZA-ИМБИАН-ИХА» (серия 231111) и верифицирующего определения РНК вируса SARS-CoV-2 с набором реагентов «КовидЭк Директ» методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени» (серия 1025) и вирусов гриппа А и В методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени с набором реагентов «ГриппКомплекс А/В»» (серия 823)

Исследованные образцы биологического материала	n	Результаты исследований с наборами реагентов (n)																	
		«ИХА-КОВИГРИПП»												«COVINFLU ENZA-ИМБИАН-ИХА» серия 231111		«КовидЭк Директ», серия 1025		«Грипп-Комплекс А/В» серия 823	
		серия 01		серия 02		серия 03		серия 04		серия 05		серия 06		пол.	отр.	пол.	отр.	пол.	отр.
		пол.	отр.	пол.	отр.	пол.	отр.	пол.	отр.	пол.	отр.	пол.	отр.						
Мазки из носоглотки, содержащие антигены SARS-CoV-2	25	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
Мазки из носоглотки, содержащие антигены вируса гриппа А	25	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
Мазки из носоглотки, содержащие антигены гриппа В	25	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
Мазки из носоглотки, не содержащие антигены SARS-CoV-2 и вирусов гриппа А/В	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25
Мазки из ротоглотки, содержащие антигены SARS-CoV-2	25	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
Мазки из ротоглотки, содержащие антигены вируса гриппа А	25	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
Мазки из ротоглотки, содержащие антигены гриппа В	25	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
Мазки из ротоглотки, не содержащие антигены SARS-CoV-2 и вирусов гриппа А/В	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25
Образцы слюны, содержащие антигены SARS-CoV-2	25	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
Образцы слюны, содержащие антигены вируса гриппа А	25	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
Образцы слюны, содержащие антигены гриппа В	25	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
Образцы слюны, не содержащие антигены SARS-CoV-2 и вирусов гриппа А/В	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25
Всего	300	225	75	225	75	225	75	225	75	225	75	225	75	225	75	225	75	225	75

Примечание. n - количество образцов; пол. – положительный результат; отр. – отрицательный результат.

NIBSC code 20/184»).

Хук-эффект (эффект воздействия избыточного количества антигена, когда как захватывающие, так и детектирующие антитела насыщаются высокой концентрацией, что приводит к ложноотрицательному результату) отсутствует при концентрациях антигена SARS-CoV-2 до 5 мкг/мл (образец № 6 в панели СОП-379) и до 20 тыс МЕ/мл (по образцу NIBSC code: 21/368), при концентрациях антигена вируса гриппа типа А - до 0,3 мг/мл (образец № 10 в панели СОП-379) и до 1000000 ед./мл (по образцам NIBSC code 20/180 и NIBSC code 20/182), антигена вируса гриппа типа В - до 0,3 мг/мл (образец № 14 в СОП-379) и 1000000 ед./мл по образцу NIBSC code 20/184).

Время достижения устойчивых результатов исследования составило 1-7 минут, хроматографическая скорость потока по тест-полоске - не менее 1 мм/сек.

Внутрисерийная и межсерийная повторяемость результатов (воспроизводимость) - 100%

Изучение клинической информативности результатов тестирования. В сравнительных испытаниях исследованы по 25 образцов биологического материала (мазки из носоглотки, ротоглотки, слюна), содержащих антиген коронавируса SARS-CoV-2 или гриппа А или гриппа В и не содержащих антигены ни одного из изучаемых вирусов; каждый образец тестирован с использованием шести опытно-производственных серий нового набора реагентов «ИХА-КОВИГРИПП» и набора реагентов сравнения «COVINFLUENZA-ИМБИАН-ИХА». Дополнительно все образцы подвергнуты референсному исследованию в полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с целью детекции вирусной РНК.

Результаты ИХ исследований с использованными наборами реагентов полностью совпадали: при визуальной регистрации получены однозначно положительные или отрицательные результаты, недействительных результатов ни в одном случае получено не было. Не выявлено межсерийной вариации результатов применения нового набора «КОВИГРИПП».

Все продемонстрированные в ИХА данные полностью подтверждены результатами исследования вирусной РНК в ОТ-ПЦР (табл. 2).

Полученные данные позволили определить показатели клинической информативности нового набора (с учётом результатов исследования с набором сравнения и с исследованиями референсным методом):

- *клиническая чувствительность* (процент положительных результатов с аттестуемым набором «ИХА-КОВИГРИПП» по отношению к соответствующему количеству, полученных с набором реагентов сравнения и подтвержденных референс-методом) - 100%;

- *клиническая специфичность* (процент отрицательных результатов с аттестуемым набором «ИХА-КОВИГРИПП» по отношению к соответствующему количеству, полученных с набором реагентов сравнения и подтвержденных референс-методом) - 100%;

- *воспроизводимость* как положительных, так и отрицательных результатов исследований с шестью сериями набора оценена в 100%.

Изучение информативности разных видов биологического материала. Для изучения сравнительной информативности результатов ИХА в зависимости от используемых для диагностики видов анализа органи-

зовано одномоментное взятие трёх проб от пациента (соскобы из носоглотки, ротоглотки и слюны). Комплекты из трёх проб представлены от больных с клиническим лабораторным подтверждением в отношении инфекции SARS-CoV-2 ($n=25$), гриппа А ($n=25$) или В ($n=25$) (положительные результаты в ОТ-ПЦР) и от условно здоровых людей без COVID-19, гриппа А/В в анамнезе ($n=25$) (отрицательные результаты ОТ-ПЦР); всего получено 100 комплектов образцов каждого клинического варианта ($n=25 \times 4$) или 300 клинических образцов для исследования ($n=100 \times 3$).

Лабораторное исследование 300 образцов выполнено с каждой из шести опытно-производственных серий набора «ИХА-КОВИГРИПП» и набором реагентов сравнения «COVINFLUENZA-ИМБИАН-ИХА». Всего получено 2100 результатов. Анализ полученных данных позволил установить полное соответствие результатов, полученных с разными наборами и сериями реагентов, и видами анализа, что позволило высоко оценить клиническую специфичность и чувствительность исследований с новым ИХ набором, воспроизводимость результатов теста с разными сериями реагентов. Показана эквивалентность результатов, полученных при исследовании образцов, взятых со слизистой оболочки из разных локусов: носо-, ротоглотки или слюны.

Изучение потенциального интерферирующего воздействия. В серии из 3172 исследований (244 образцов исследованы с набором реагентов сравнения «COVINFLUENZA-ИМБИАН-ИХА» до внесения интерферентов и с шестью сериями набора «ИХА-КОВИГРИПП» как до, так и после внесения интерферентов) установлено полное отсутствие интерферирующего влияния на результаты ИХА исследований с набором «ИХА-КОВИГРИПП» разнообразных эндогенных факторов и лекарственных средств ($n=61$) в представленной концентрации (табл. 3). Не получено расхождений в результатах исследования с изучаемым набором и набором сравнения, а также межсерийных вариаций результатов.

Изучение перекрёстного реагирования. В рамках внутренних доклинических испытаний изучаемого набора реагентов «ИХА-КОВИГРИПП» определено возможное перекрёстное воздействие на процесс исследования антигенных эпитопов ряда микроорганизмов, поражающих или колонизирующих носоглотку и ротоглотку человека. Не определено такого влияния с образцами, содержащими вирусы, бактерии, грибы: эндемические коронавирусы человека (HKU₁, OC₄₃, NL₆₃, 229E, SARS-CoV, MERS-CoV (Florida/USA Saudi Arabia 2014), аденовирус (типы 1-5, 7, 8, 11, 18, 21, 23, 55, В, С, Е), бокавирус, ВГА, ВГС, HBsAg, вирус Коксаки (типы В₂, В₃, В₄, В₅), вирус краснухи, норовирус, ревматоидный фактор, ротавирус, эховирус, вирус парагриппа 1-4 типа, метапневмовирус человека, энтеровирусы 68-71, RS-вирус (А и В), риновирус, вирус эпидемического паротита, кори, герпесвирусы (ветряной оспы, Эпштейна-Барра, цитомегаловирус, HHV-6), *Bordetella pertussis*, *Mycoplasma pneumoniae* (Mutant 22, FH strain of Eaton Agent (NCTC 101191), *Chlamydia pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes* (Typing strain T₁ [NCIB 11841] SF 1301), *Haemophilus influenzae* (серотипы А,

B, C, D, E, F), *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila* (Bloomington-2, Los Angeles-1,82A3 105), *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Corynebacterium Diphtheriae*, *E. coli*, *Fusobacterium necrophorum*, *Haemophilus parahaemolyticus*, *Mycobacterium tuberculosis* (K, Erdman, HN878, CDC155UH37RV), *Neisseria spp.* (*Neisseria lactamica*), *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus*

saprophyticus, *Streptococcus pneumonia*, *Streptococcus salivarius*, *Toxoplasma gondii*.

Заключение. На предприятии АО «ЭКОлаб» (г. Электрогорск Московской обл.) при выполнении плана научных исследований и в целях обеспечения учреждений здравоохранения России доступными диагностическими медицинскими изделиями для оказания медицинской помощи населению разработан новый отечественный набор реагентов «ИХА-КОВИ-ГРИПП» Тест-система иммунохроматографическая

Таблица 3

Эндогенные и экзогенные вещества, в отношении которых не установлено интерферирующего влияния в указанных дозах на результаты ИХА при индикации антигенов коронавируса SARS-CoV-2 и вирусов гриппа А и В с набором «ИХА-КОВИГРИПП»

Эндогенные интерферирующие вещества	
Муцин в концентрации до 5%	Образцы, полученные от беременных - 100%
Цельная кровь в концентрации до 5%	
Экзогенные интерферирующие вещества	
Противовирусные препараты	
Альфа-интерферон 40 мг/мл	Занамивир 282 нг/мл
Рибавирин 30 мг/мл	Осельтамивир 30 мг/мл
Перамивир 2 мг/мл	Лопинавир 40 мг/мл
Ритонавир 30 мг/мл	Арбидола гидрохлорида моногидрат 30 мг/мл
Перамивир 40,0 мг/л	
Антибактериальные препараты	
Меропенем 30 мг/мл	Цефтриаксон 40 мг/мл
Левифлоксацин 40 мг/мл	Налидиксовая кислота 3 мг/мл
Азитромицин 3 мг/мл	Ванкомицина гидрохлорид 1 мг/мл
Метронидазол (таблетки) 1 мг/мл	Тобрамицин 24 мг/мл
Цефрадин 50 мг/мл	Цефалексин 10мг/мл
Ампициллин 152,0 мкмоль/л	Амоксициллин (капсулы) 1 мг/мл
Бензилпенициллин 3,0 мг/мл	Гваякол глицериновый эфир 20,0 мг/мл
Мупирицин 12,0 мг/мл	Стрептомицин 3,0 мг/мл
Доксициклина гиклат 67,5 мкмоль/л	Тетрациклин 3,0 мг/мл
Стероидные препараты	
Дексаметазона ацетат 0,8 мг/мл	Триамцинолон 1,5 мг/мл
Будесонид 200 мкг/мл	Флунизолит 6,8 нг/мл
Мометазон 2 мг/мл	Гидрокортизон 1 мг/мл
Флутиказон 2,5 нг/мл	Дифенгидрамин 5,0 мг/мл
Мометазон 1,28 нг/мл	
Назальные спреи, мази, муколитики	
Беклометазон 4,79 мг/мл	Натрия хлорид с консервантами 4,44 мг/мл
Оксиметазолин 10 мг/мл	Фенилэфрина гидрохлорид 0,002мг/мл
Бромгексина гидрохлорид 0,016 мг/мл	Амброксола гидрохлорид 0,003 мг/мл
Гистамина гидрохлорид 30,0 мг/л	Декстрометорфан 20,0 мг/мл
Ксилометазолин 10,0 мг/мл	Фенилэфрин 100,0 мг/мл
Хлорфенирамина Малеват 5,0 мг/мл	Эфедрина гидрохлорид 20,0 мг/мл
Анестетики, анальгетики, антипиретики	Витамины
Бензокаин 1 мг/мл анестетик	Витамин В12, гранулы 1 мг/мл
Ацетаминофен 10 мг/мл	Пантотеновая кислота 0,3 мг/мл
Ацетилсалициловая кислота 20 мг/мл	Аскорбиновая кислота 0,3 мг/мл
Ибупрофен 0,04 мг/мл	Пиридоксина гидрохлорид 0,3 мг/мл
Парацетамол 0,065 мг/мл	
Прочие	
Фенилпропаноламин 20,0 мг/мл	

для качественного определения антигена коронавируса SARS-CoV-2 и антигенов вирусов гриппа А и В в биологическом материале человека» по ТУ 21.20.23-379-70423725-2024».

Проведенными внутренними доклиническими испытаниями с новым ИХ набором реагентов «ИХА-КОВИГРИПП» при исследовании 300 клинических образцов (в том числе 225 - содержащих антиген коронавируса SARS-CoV-2 или вирусов гриппа А и В в биологическом материале человека (мазки из носоглотки, ротоглотки и слюне), и 75 аналогичных образцов, не содержащих ни один изучаемый вирус), показано полное совпадение результатов исследования с реагентами шести производственных серий изучаемого набора, набора реагентов сравнения и в референс-методе, что позволило высоко оценить клиническую чувствительность, специфичность и воспроизводимость результатов с новым разработанным медицинским изделием. Установленные показатели аналогичны тест-системе сравнения.

Аттестована аналитическая чувствительность нового набора «ИХА-КОВИГРИПП» в отношении стандартных образцов предприятия (СОП-379) и международных вирусосодержащих стандартов.

Изучение разных видов биологического материала (мазки из носо-, ротоглотки, слюна), одновременно полученные от пациентов с разными клиническими формами инфекции и без неё, продемонстрировало полную эквивалентность результатов исследования в ИХА с новым набором.

Изучены разнообразные факторы и лекарственные средства ($n=61$), которые могут присутствовать в исследуемой пробе у пациентов с подозрением на ОРВИ, не установлено их интерферирующего влияния в изученных концентрациях, на положительные и отрицательные результаты в ИХА с набором «ИХА-КОВИГРИПП».

Не выявлено и перекрёстного реагирования с микрофлорой ($n=55$), способной колонизировать или поражать носоглотку, ротоглотку, полость рта человека при ОРВИ.

Полученные в доклинических испытаниях данные позволили в установленном законом порядке начать процедуру государственной регистрации в Российской Федерации Набора реагентов «Тест-система иммунохроматографическая для качественного определения антигена коронавируса SARS-CoV-2 и антигенов вирусов гриппа А и В в мазках из биологического материала человека «ИХА-КОВИГРИПП» по ТУ 21.20.23-379-70423725-2024».

ЛИТЕРАТУРА

1. Заболеваемость населения Российской Федерации по основным классам болезней. Федеральная служба государственной статистики. Официальная статистика. Здравоохранение. Электронный ресурс. <https://rosstat.gov.ru/folder/13721> (Дата обращения 02.08.2024).
2. Еропкин М.Ю., Коновалова Н.И. Грипп в постковидную эру в России с точки зрения вирусолога. В сб.: IV Международный форум Дни вирусологии. СПб: ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России; 2023: 16-18.
3. Еженедельный национальный бюллетень по гриппу и ОРВИ за 24 неделю 2024 года. (10.06.24 - 16.06.24). Электронный ресурс ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава РФ.

- https://www.influenza.spb.ru/system/epidemic_situation/laboratory_diagnostics/ (Дата обращения 03.08.2024).
4. АО «ЭКОлаб» - Производитель диагностических наборов и лекарственных препаратов. Каталог продукции. Быстрые тесты ИХА. Электронный ресурс. <https://ekolab.ru/catalog/bystrye-testy-ikha/ekspress-diagnostika-ikha/diagnostika-respiratornogo-trakta> (Дата обращения 03.08.2024).
5. АО «Вектор-Бест». Каталог. Иммунохимия. Экспресс-диагностика. Электронный ресурс. <https://www.vector-best.ru/catalog/ifa/nabory/ekspress-diagnostika/#> (Дата обращения 03.08.2024).
6. ООО "РЭД" – Российская экспресс диагностика. Продукция. Электронный ресурс. <https://red-test.ru/catalog/> (Дата обращения 03.08.2024).
7. Акиншина Ю.А., Марданлы С.Г., Ротанов С.В., Малышев В.В., Змеева Т.А., Гумилевский Б.Ю. и др. Разработка иммунохроматографического набора реагентов для выявления ротавирусов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (11): 672-9. DOI: <https://doi.org/10.15620/0869-2084-2024-68-11-672-679>.
8. Акиншина Ю.А., Марданлы С.Г., Ротанов С.В., Ханина М.А. Об иммунохроматографическом выявлении *Helicobacter pylori* у человека. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69 (4): 123-30. DOI: <https://doi.org/10.15620/0869-2084-2024-69-4-123-130>.
9. Ротанов С.В., Марданлы С.Г., Попова Т.В., Акиншина Ю.А. О распространении *Helicobacter pylori* среди населения Павлово-Посадского района Московской области. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2024; 29 (2): 82-9. DOI: [10.51620/3034-1981-2024-29-2-82-89](https://doi.org/10.51620/3034-1981-2024-29-2-82-89).
10. Акиншина Ю.А., Марданлы С.Г., Ротанов С.В., Гашенко Т.Ю. Одноэтапное выявление маркеров возбудителей острых кишечных вирусных инфекций у человека. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2024; 29 (2): 97-106. DOI: [10.51620/3034-1981-2024-29-2-97-106](https://doi.org/10.51620/3034-1981-2024-29-2-97-106).

REFERENCES

1. Morbidity of the population of the Russian Federation by main classes of diseases. Federal State Statistics Service. Official Statistics. Healthcare. [Zabolevaemost' naseleniya Rossiyskoy Federatsii po osnovnym klassam bolezney. Federal'naya sluzhba gosudarstvennoy statistiki. Ofitsial'naya statistika. Zdravookhranenie]. Web resource: <https://rosstat.gov.ru/folder/13721>. (date of the application: 02.08.2024). (in Russian)
2. Eropkin M.Yu., Konovalova N.I. Influenza in the post-COVID era in Russia from the point of view of a virologist. In the collection: IV International Forum Days of Virology 2023. - St. Petersburg: Research Institute of Influenza named after A.A. Smorodintsev of the Ministry of Health of the Russian Federation, 2023. 16-18. (in Russian)
3. Weekly national bulletin on influenza and acute respiratory viral infections for the 24th week of 2024. (10.06.24 - 16.06.24). [Ezhenedel'nyy natsional'nyy byulleten' po grippu i ORVI za 24 nedelyu 2024 goda. (10.06.24 - 16.06.24)]. Web resource: https://www.influenza.spb.ru/system/epidemic_situation/laboratory_diagnostics/ (date of the application: 03.08.2024). (in Russian)
4. JSC "ECOlab" - Manufacturer of diagnostic kits and medicinal products. Product catalog. Rapid ICHA tests. [AO «EKOlab» - Proizvoditel' diagnosticheskikh naborov i lekarstvennykh preparatov. Katalog produktsii. Bystrye testy IKhA]. Web resource: <https://ekolab.ru/catalog/bystrye-testy-ikha/ekspress-diagnostika-ikha/diagnostika-respiratornogo-trakta> (date of the application: 03.08.2024). (in Russian)
5. JSC Vector-Best. Catalog. Immunochemistry. Express diagnostics. [AO «Vektor-Best». Katalog. Immunokhimiya. Ekspress-diagnostika]. <https://www.vector-best.ru/catalog/ifa/nabory/ekspress-diagnostika/#> (date of the application: 03.08.2024). (in Russian)
6. LLC "RED" - Russian express diagnostics. Products. [OOO "RED" – Rossiyskaya ekspress diagnostika. Produktsiya.] Web resource: <https://red-test.ru/catalog/> (date of the application: 03.08.2024). (in Russian)
7. Akinshina Yu.A., Mardanly S.G., Rotanov S.V., Malyshev V.V., Zmeeva T.A., Gumilevskiy B.Yu. et al. Development of an immunochromatographic kit of reagents for the detection of rotaviruses. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2023; 68 (11): 672-9. DOI: [http://doi.org/10.15620/0869-2084-2024-68-11-672-679](https://doi.org/10.15620/0869-2084-2024-68-11-672-679). (in Russian)

8. Akinshina Yu.A., Mardanly S.G., Rotanov S.V., Chanina M.A. On the immunochromatographic detection of *Helicobacter pylori* in humans. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2024; 69 (4): 123-130. DOI: <https://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2024-69-4-123-130>. (in Russian.)
9. Rotanov S.V., Mardanly S.G., Popova T.V., Akinshina Yu.A. On the spread of *Helicobacter pylori* among the population of the Pavlovo-Posad district of the Moscow region. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni*. 2024; 29 (2): 82-89. DOI: <https://doi.org/10.51620/3034-1981-2024-29-2-82-89>. (in Russian)
10. Akinshina Yu.A., Mardanly S.G., Rotanov S.V., Gashenko T.Yu. One-stage detection of markers of causes of acute intestinal viral infection in humans. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni*. 2024; 29 (2): 97-106. DOI: <https://doi.org/10.51620/3034-1981-2024-29-2-97-106>. (in Russian)



Экспресс-диагностика антибиотикорезистентности
бактериальных штаммов

ИХА-CARBA-5

Быстрый мультиплексный иммуноанализ
для фенотипического обнаружения
и дифференциации пяти распространенных
семейств карбапенемаз с целью выявления
устойчивости колоний микроорганизмов
к антибиотикам группы карбапенемов

Выявление и дифференциация карбапенемаз типов KPC, OXA, VIM, IMP и NDM
— мультирезультат на одной тест-полоске

Исследуемый образец — суточная бактериальная культура, выделенная из биологического материала человека (кровь, моча, фекалии, гной и др.).

Помощь в выборе противомикробной терапии

- своевременного назначения антибиотикотерапии
- коррекция антибиотикотерапии в отсутствие эффекта

Легко внедрить в любые лабораторные условия

- Необходимо только стандартное оснащение микробиологической лаборатории

Удобная комплектация

- для исследования 1 и 20 образцов

Быстрый результат

- определение карбапенемаз через 10 минут
- сокращение преаналитического этапа по сравнению со стандартными методами определения антибиотикорезистентности



г. Электрогорск,
ул. Буденного, д. 1



8-800-333-33-47



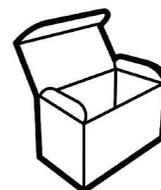
www.ekolab.ru



ekolab-sbyt@mail.ru

ИНОЗИТОЛ МЕТИЛФОЛАТ

- Улучшает гормональный фон
- Регулирует работу репродуктивной системы
- Восстанавливает подвижность сперматозоидов
- Корректирует метаболические нарушения



на курс

Покупайте
на маркетплейсах

БАД. Не является лекарственным средством

Точный диагноз не выходя из дома



Экспресс-тест
для диагностики
АНГИНЫ
«ИХА-СтрептоА»



Исследуемый
материал:
Мазок

Экспресс-тест
для определения
уровня Витамина Д
«ИХА-Витамин D»



Исследуемый
материал:
Капля крови
из пальца

Экспресс-тест
для диагностики
Гриппа А и В
«ИХА-Грипп А и В»



Исследуемый
материал:
Мазок

Экспресс-тест
для диагностики
COVID-19
«ИХА-SARS-CoV-2-Ag»



Исследуемый
материал:
Мазок

Экспресс-тест
для диагностики
кишечных паразитов
«ИХА-Лямблии»



Исследуемый
материал:
Образцы кала

WILDBERRIES

OZON



г. Электрогорск,
ул. Буденного, д. 1



8-800-333-33-47



www.ekolab.ru



ekolab-sbyt@mail.ru

ЭКОФРИН

Средство для слизистой оболочки носа



Увлажняет



Защищает



Заживляет

Витамин

E

эфирное
масло
лимона

гиалуро-
новая
кислота



Не имеет
побочных
эффектов

Выгодный
объем 50 мл

Без привыкания

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Борисова О.Ю.^{1,2}, Андриевская И.Ю.¹, Гадуа Н.Т.¹, Пименова А.С.¹, Чагина И.А.¹, Миронов А.Ю.^{1,3}, Кафарская Л.И.²

АНАЛИЗ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ КОКЛЮШНОЙ ИНФЕКЦИИ В РОССИИ В 2023 ГОДУ

¹ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора, 125212, г. Москва, Россия;

²ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова Минздрава РФ, 117997, г. Москва, Россия;

³Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА, 115682, г. Москва, Россия

В 2023 году в Российской Федерации регистрируется резкий подъем заболеваемости коклюшем и увеличение количества обследованных лиц. При обследовании на коклюш регламентировано применение трёх методов исследования: культурального, молекулярно-генетического (ПЦР-диагностика), серологического, использование которых определяется сроком развития заболевания.

Цель: анализ состояния лабораторной диагностики коклюша на территории России в динамике развития эпидемического процесса с учётом осложнившейся эпидемиологической обстановки по коклюшной инфекции в 2023 году.

Материал и методы. Оценка лабораторной диагностики коклюша в РФ в 2018-2023 гг. проведена на основании аналитических данных, присланных в Референс-центр по мониторингу за коклюшем и дифтерией ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора из субъектов РФ. Анализ эффективности ПЦР-тест-систем проведён на 111 клинических образцах, поступивших в Референс-центр из субъектов РФ и с использованием трёх наборов реагентов: «АмплиСенс Bordetella multi-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия); «РеалБест ДНК Bordetella species/ Bordetella pertussis/ Bordetella bronchiseptica» (Вектор Бест, Россия); «АмплиПрайм Bordetella» (ООО «НекстБио», Россия).

Результаты и обсуждение. Анализ состояния лабораторной диагностики коклюша показал, что за период 2018-2023 гг. на территории России проведено 487345 исследований на коклюш, из них большинство исследований проведено в 2023 году. В структуре используемых методов в 2023 г. превалировала ПЦР-диагностика (59% случаев). Лабораторное подтверждение диагноза коклюш в 2023 г. получено в 95,4% случаев и в большинстве случаев (61% случаев) с помощью ПЦР-диагностики. Этиологическая структура возбудителей коклюша в 2023 г.: Bordetella pertussis - 91,65%, Bordetella holmesii - 5%, Bordetella parapertussis - 2,5%, Bordetella bronchiseptica - 0,85%. **Заключение.** В 2023 г. показано интенсивное использование ПЦР-диагностики при обследовании с подозрением на коклюш с применением отечественных ПЦР-тест-систем, активное обследование очагов коклюшной инфекции и недостаточное применение ИФА-диагностики. На основании полученных данных внесены изменения в СанПин в части обследования в очагах инфекции с использованием различных методов диагностики.

Ключевые слова: коклюш; лабораторная диагностика; бактериологическая диагностика; ПЦР-диагностика; серологическая диагностика; иммуноферментный анализ

Для цитирования: Борисова О.Ю., Андриевская И.Ю., Гадуа Н.Т., Пименова А.С., Чагина И.А., Миронов А.Ю., Кафарская Л.И. Анализ лабораторной диагностики коклюшной инфекции в России в 2023 году. Клиническая лабораторная диагностика. 2024; 69 (10): 548-555.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-10-548-555>

Для корреспонденции: Борисова Ольга Юрьевна, д-р мед. наук, проф., рук. лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского; e-mail: olgaborisova@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Поступила 27.08.2024

Принята к печати 28.08.2024

Опубликовано 00.10.2024

Borisova O. Yu.^{1,2}, Andrievskaya I. Yu.¹, Gadua N. T.¹, Pimenova A. S.¹, Chagina I. A.¹, Mironov A. Yu.^{1,3}, Kafarskaya L. I.²

ANALYSIS OF LABORATORY DIAGNOSTICS OF PERTUSSIS INFECTION IN RUSSIA IN 2023

¹G. N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, 125212, Moscow, Russia;

²Pirogov Russian National Research Medical University, 117997, Moscow, Russia;

³Federal Research and Clinical Center of Specialized Medical Care and Medical Technologies FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation

In 2023, a sharp rise in the incidence of pertussis and an increase in the number of examined persons are recorded in the Russian Federation. When examining for pertussis, the use of three research methods is regulated – bacteriological, molecular genetic (PCR

diagnostics) and serological, the use of which is determined by the period of development of the disease. **Purpose:** analysis of the state of laboratory diagnostics of pertussis in Russia in the dynamics of the development of the epidemic process, taking into account the complicated epidemiological situation for pertussis infection in 2023.

Material and methods. Assessment of laboratory diagnostics of pertussis in the Russian Federation in 2018-2023. was carried out on the basis of analytical data sent to the Reference Center for Monitoring Pertussis and Diphtheria G. N. Gabrichevsky Research Institute of Epidemiology and Microbiology from the constituent entities of the Russian Federation. Analysis of the effectiveness of PCR test systems was carried out on 111 clinical samples received at the Reference Center from the constituent entities of the Russian Federation and using three sets of reagents: «AmpliSence Bordetella multi-FL» (Central Research Institute of Epidemiology, Russia); «RealBest DNA Bordetella species/Bordetella pertussis/Bordetella bronchiseptica» (Vector Best, Russia); «AmpliPrime Bordetella» (NecstBio LLC, Russia).

Results and discussion. An analysis of the state of laboratory diagnostics of pertussis showed that for the period 2018 - 2023. in Russia, 487,345 studies for pertussis were carried out, of which most of the studies were carried out in 2023. PCR diagnostics prevailed in the structure of the methods used in 2023 (59% of cases). Laboratory confirmation of the diagnosis of pertussis in 2023 was obtained in 95.4% of cases and in most cases (61% of cases) using PCR diagnostics. Etiological structure of pertussis pathogens in 2023: *Bordetella pertussis* - 91.65%, *Bordetella holmesii* - 5%, *Bordetella parapertussis* - 2.5%, *Bordetella bronchiseptica* - 0.85%.

Conclusion. In 2023, the intensive use of PCR diagnostics for examination with suspected pertussis using domestic PCR test systems, active examination of foci of pertussis infection and insufficient use of ELISA diagnostics were shown. Based on the data obtained, changes were made to Sanitary and epidemiological rules in terms of examination in the foci of infection using various diagnostic methods.

Key words: pertussis; laboratory diagnostics; bacteriological diagnostics; PCR diagnostics; serological diagnostics; enzyme-linked immunosorbent assay

For citation: Borisova O. Yu., Andrievskaya I. Yu., Gadua N. T., Pimenova A. S., Chagina I. A., Mironov A. Yu., Kafarskaya L. I. Analysis of laboratory diagnostics of pertussis infection in Russia in 2023. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (10): 548-555 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-10-548-555>

For correspondence: Borisova Olga Yurievna, Dr. Sci. Med., Professor, Head of laboratory for the diagnosis of diphtheria and pertussis infections G. N. Gabrichevsky Research Institute of Epidemiology and Microbiology; e-mail: olgborisova@mail.ru

Information about authors:

Borisova O. Yu., <https://orcid.org/0000-0001-6316-5046>;
Andrievskaya I. Yu., <https://orcid.org/0000-0003-2997-942X>;
Gadua N. T., <https://orcid.org/0000-0001-6247-6176>;
Pimenova A. S., <https://orcid.org/0000-0002-6914-3531>;
Chagina I. A., <https://orcid.org/0000-0003-2867-9548>;
Mironov A. Yu., <https://orcid.org/0000-0002-8544-5230>;
Kafarskaya L. I., <https://orcid.org/0000-0002-5488-5786>.

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

Acknowledgment. The work was performed within the framework of the sectoral program of Rospotrebnadzor.

Received 27.08.2024

Accepted 28.08.2024

Published 00.10.2024

Введение. В 2023 г. в Российской Федерации зарегистрировано 52 783 случаев коклюша; показатель заболеваемости составил 35,98 на 100 тыс. населения, что в 16,4 раза выше уровня заболеваемости в 2022 году (2,2 на 100 тыс. населения) и в 7,6 раз выше среднесноголетнего показателя (4,76 на 100 тыс. населения). В последние годы наблюдается тенденция роста случаев коклюшной инфекции, что связано как с накоплением неиммунной прослойки населения, так и увеличением количества выявленных лиц, заболевших коклюшем, в том числе с лёгкими и средней тяжести формами заболевания, которые ранее практически не выявлялись. В структуре форм клинического течения коклюша преобладали лёгкие формы - 40,6%, что практически в два раза больше, чем в год предыдущего циклического подъёма (2019 г.) - 29,5%. Доля среднетяжёлых, тяжёлых и типичных форм клинического течения составляла в 2023 году 48,1%, 0,4%, 2,0% соответственно. Заболеваемость коклюшем регистрировалась во всех субъектах, кроме Ненецкого автономного округа. В 26 субъектах показатель заболеваемости превышал среднероссийский показатель. Анализ возрастной заболе-

ваемости коклюшем в 2023 году показал, что удельный вес детей в возрасте до 14 лет среди всех заболевших составляет 82,6% [1].

В 2018-2020 годах для лабораторной диагностики коклюша регламентировано использование культурального метода не позднее третьей недели заболевания, ПЦР-диагностики в 1-3 недели заболевания, серологического метода (реакция агглютинации (РА), реакция пассивной гемагглютинации (РПГА), иммуноферментный анализ (ИФА)) не ранее третьей недели болезни¹. С 2021 года регламентировано три метода исследования: культуральный, молекулярно-генетический (ПЦР-диагностика), но для серологической диагностики применение только ИФА^{2,3}. Культуральный метод используется на 1-2 неделе заболевания в период

¹МР 3.1.2.0072 -13 Методические рекомендации «Диагностика коклюша и паракоклюша». Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2013. (утратили силу).

²СанПин 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2021.

³МУК 4.2.3701-21 Методические указания «Лабораторная диагностика коклюша и заболеваний, обусловленных другими бордетеллами». Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2021.

спазматического кашля, ПЦР-диагностика - на 1-4 неделе заболевания, ИФА - с 3-й недели заболевания. При коклюшной инфекции проводится два вида исследований: 1) с диагностической целью; 2) по эпидемиологическим показаниям.

В рамках научных исследований в разные годы проводилась оценка эффективности методов микробиологической диагностики, используемых при обследовании больных с подозрением на коклюш.

Культуральный метод считается «золотым стандартом» в клинической лабораторной диагностике коклюшной инфекции. Однако, культуральное исследование обладает рядом недостатков: низкой эффективностью выделения *Bordetella pertussis* в практических условиях, не превышающей 10%-20%, обусловленной как биологическими особенностями самого возбудителя, так и недостатками на преаналитическом этапе исследования; само исследование требует продолжительного времени (от 5 до 8 дней) и высокой квалификации лабораторного персонала; *B. pertussis* биохимически малоактивны, поэтому возникают сложности на этапе идентификации микроорганизма при изучении его ферментативных свойств [2 - 4].

Эффективность ПЦР-диагностики в практических условиях отмечена на уровне 88,0% и показана у пациентов с различными формами клинического течения болезни независимо от вакцинального статуса и прохождения ими курса антибактериальной терапии. Применение метода ПЦР для идентификации возбудителя коклюша эффективно у детей в возрасте до 1 года, у взрослых со стёртой клинической картиной, при обследовании очагов с целью установления источника инфекции [5 - 10].

Использование ИФА для выявления антител класса IgA, IgG, IgM в сыворотке крови обследуемых лиц в практическом здравоохранении Российской Федерации позволяет подтвердить диагноз коклюша при лёгких и стёртых формах заболевания, информативно для непривитых детей старше 1 года и взрослых. Недостатками серологической диагностики является то, что этот метод используется в основном ретроспективно (с 3-й недели заболевания), существует сложность интерпретации диагноза на основе полученных данных у привитых и детей первого года жизни, у которых на ранних сроках болезни могут быть получены отрицательные результаты и только обследование таких детей в динамике (на 4-5-й неделях болезни) позволяет подтвердить диагноз [11 - 18].

Цель работы: анализ состояния лабораторной диагностики коклюша на территории России в динамике развития эпидемического процесса с учётом осложнившейся эпидемиологической обстановки по коклюшной инфекции в 2023 году.

Материал и методы. Согласно Приказу Роспотребнадзора от 01.12.2017 г. № 1116 «О совершенствовании системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации», «Положения об эпидемиологическом мониторинге» от 29.11.2023 № 02/20475-2-23-27 и функциональным обязанностям, Референс-центром по мониторингу за коклюшем и дифтерией ФБУН МНИИ-ЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора проведён анализ состояния лабораторной диагностики коклюша на территории России в 2018-2023 годах с учётом осложнившейся эпидемиологической обстановки по коклюшной

инфекции в 2023 году. Референс-центром по мониторингу за коклюшем и дифтерией разработаны анкеты-опросники, направленные в Управления Роспотребнадзора всех субъектов РФ (от 13.02.2024 № 77-52-09/103-2024), и проведён анализ собранных данных. Анализ эффективности ПЦР-тест-систем проведён на 111 клинических образцах, поступивших в Референс-центр из субъектов РФ (согласно Письма Роспотребнадзора «О направлении штаммов в Референс-центр» от 30.01.2023 № 02/1385-2023-27), с использованием трёх наборов реагентов: Набор реагентов для выявления и дифференциации ДНК возбудителей коклюша (*Bordetella pertussis*), паракоклюша (*Bordetella parapertussis*) и бронхисептикоза (*Bordetella bronchiseptica*) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс *Bordetella* multi-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия); Набор реагентов для выявления ДНК *Bordetella species* с дифференциацией видов *Bordetella pertussis* и *Bordetella bronchiseptica* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «РеалБест ДНК *Bordetella species/ Bordetella pertussis/ Bordetella bronchiseptica*» (Вектор Бест, Россия); Набор реагентов для выявления и дифференциации ДНК *Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis, Bordetella bronchiseptica* и *Bordetella holmesii* методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени «АмплиПрайм *Bordetella*» (ООО «НекстБио», Россия).

Результаты. Анализ состояния клинической лабораторной диагностики коклюша показал, что за период 2018-2023 гг. на территории России проведено 487 345 исследований на коклюш, из них большинство (51,3%) проведено в 2023 году (рис. 1).

В динамике использования методов исследования в 2018-2022 годах превалировала серологическая диагностика (38,1%-54,9%), бактериологический метод использовался в 25,5%-33,8% случаев и ПЦР-диагностика - в 19,6%-28,6% случаев. С 2022 года на территории России интенсивно внедрялась ПЦР-диагностика и в 2023 году в структуре используемых методов при диагностике коклюша стала превалировать ПЦР-диагностика (59% случаев), бактериологический метод применялся в 26,6% случаев и серодиагностика - в 18,5% случаев (см. рис. 1).

С диагностической целью за период 2018-2023 гг. проведено 403 377 исследований, из которых большинство (47,4%) проведено в 2023 году. В динамике использования методов микробиологической диагностики с диагностической целью в 2018-2022 годах превалировала серологическая диагностика (38,9%-50,1%), культуральный метод использован в 28%-33,5% случаев, ПЦР-диагностика - в 21,9%-29,2% случаев. В 2023 году в структуре используемых методов микробиологической диагностики с диагностической целью стала превалировать ПЦР-диагностика (59,3% случаев), культуральный метод применялся в 18,7% случаев, значительно сократилось использование серодиагностики - до 22% случаев.

По эпидемиологическим показаниям за период 2018-2023 гг. проведено 83 968 исследований, из которых большинство (69,9%) проведено в 2023 году. В динамике использования методов микробиологической диагностики по эпидемиологическим показаниям в 2018-2019 гг. превалировал культуральный метод (47,9%-48,1%), сероди-

агностика использована в 40,6%-27,8% случаев, ПЦР-диагностика - в 11,5%-24,1% случаев. В 2020 и 2022 году преваляло использование серодиагностики, в 2021 г. - ПЦР-диагностики. В 2023 году в структуре используемых методов микробиологической диагностики по эпидемическим показателям преваляла ПЦР-диагностика (56,2% случаев), культуральный метод применялся в 36,2% случаев, значительно сократилось использование серодиагностики - до 7,6% случаев.

Лабораторное подтверждение диагноза коклюш в 2018-2022 гг. преимущественно основывалось на результатах использования серологической диагностики; в 2023 году - на основании результатов ПЦР-

диагностики (рис. 2). Лабораторное подтверждение диагноза коклюш в 2023 году составило 95,4% случаев; без лабораторного подтверждения поставлено 4,6% диагнозов. Лабораторное подтверждение диагноза коклюш на территории РФ в большинстве случаев (61% случаев) осуществлено с помощью ПЦР-диагностики, в 35,2% случаев – серологически, 3,8% случаев - культуральным методом, т. е. наиболее интенсивно применялась ПЦР-диагностика (рис. 3). По сравнению с 2019 г., большинство диагнозов коклюша поставлено на основании серодиагностики (50% случаев), ПЦР-диагностики - 44% случаев и культурального метода - 6% случаев (рис. 3).

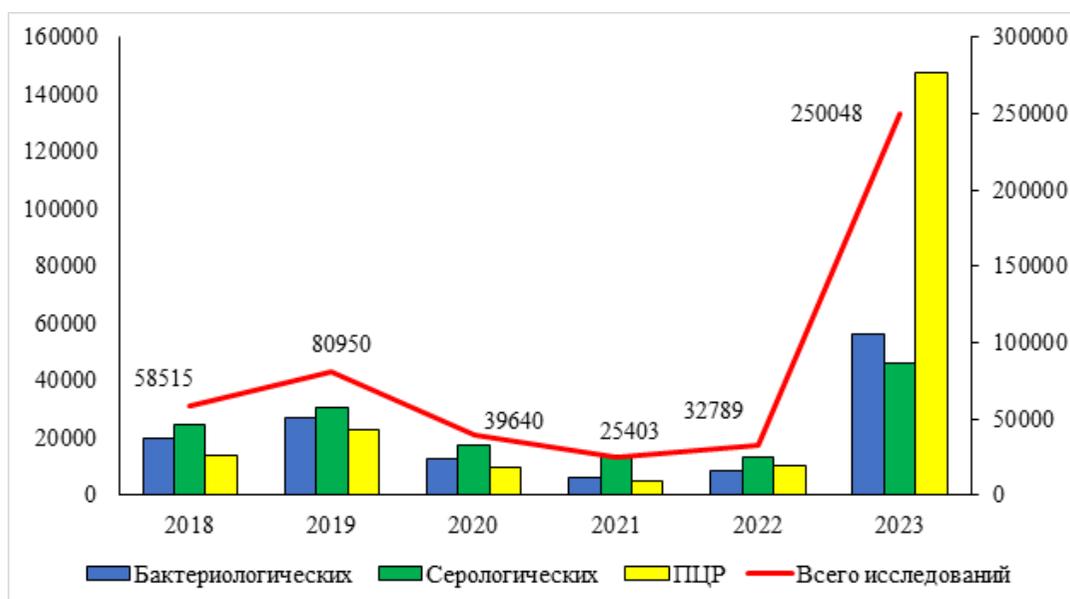


Рис. 1. Количество проведенных исследований при обследовании с подозрением на коклюш.

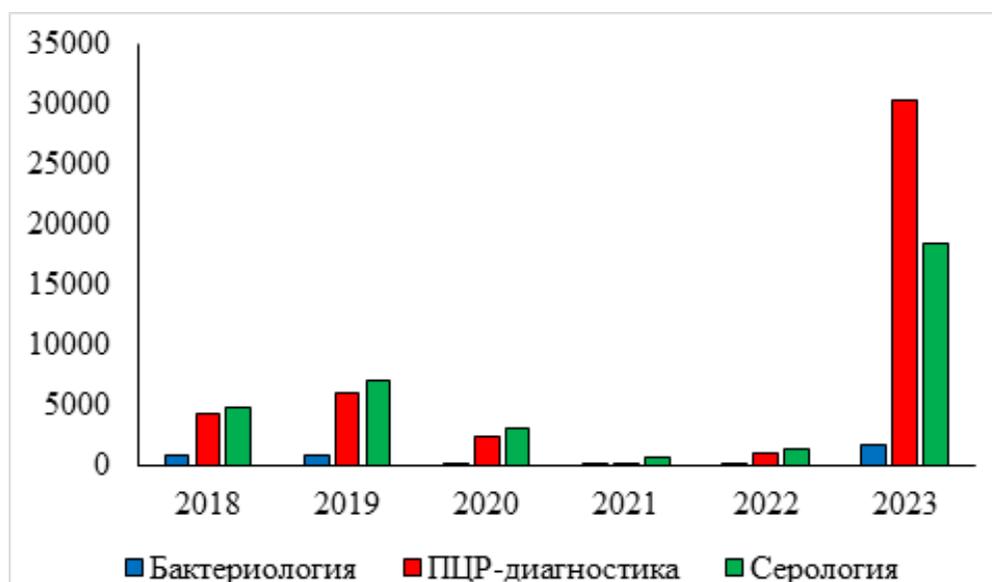


Рис. 2. Лабораторное подтверждение диагноза коклюш методами микробиологической диагностики.

В 2023 году на 31 территории России регистрировались случаи коклюша без лабораторного подтверждения диагноза. На 89,4% территориях России без

лабораторного подтверждения поставлено до 5% диагнозов, на 5,9% территорий - от 5% до 10% диагнозов, более 10% диагнозов поставлено на 4,7% территорий.

Большинство диагнозов коклюша без лабораторного подтверждения поставлено в трёх регионах РФ.

Этиологическая структура возбудителей коклюша в 2023 году в целом по России с учётом всех методов микробиологической диагностики представлена следующим образом: *B. pertussis* - 91,65%, *B. holmesii* -

5%, *B. parapertussis* - 2,5%, *B. bronchiseptica* - 0,85%. В ряде регионов страны регистрировали случаи коинфекции: *B. pertussis* + *B. parapertussis*, *B. pertussis* + *B. bronchiseptica*, что сопровождалось утяжелением клинического течения болезни и развитием бронхопневмоний [19].

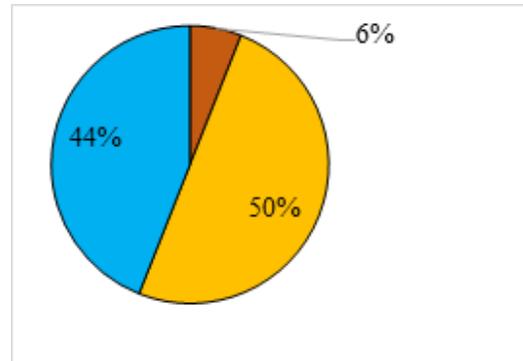
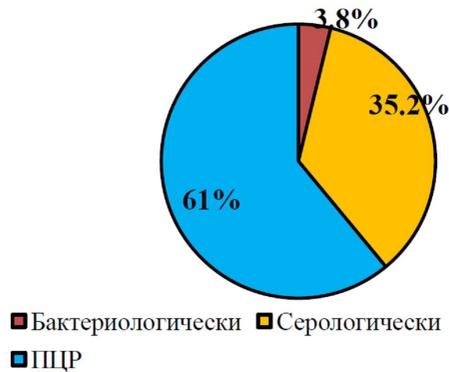


Рис. 3. Удельный вес использования методов микробиологической диагностики для лабораторного подтверждения диагноза коклюш в 2023 (А) и 2019 (Б) годах.

Проанализировано применение трёх методов лабораторной микробиологической диагностики в зависимости от интенсивности эпидемического процесса коклюшной инфекции на территориях РФ (см. таблицу). Так, на территориях с высокой заболеваемостью коклюшем (ПЗ - от 15,0 и более на 100 тыс. населения) лабораторное подтверждение диагноза коклюш проведено в основном с помощью ПЦР-диагностики - 55,1-61,9% и серологического метода - 32,8-35,4%. Количе-

ство случаев коклюша без лабораторного подтверждения клинического диагноза варьировало в пределах 1,5-5,8%. На территориях с ПЗ 5-15,0 на 100 тыс. населения уменьшается количество случаев лабораторного подтверждения клинического диагноза с помощью ПЦР-диагностики - до 54,8%, серологического метода - до 28,4%; значительно увеличивается количество случаев заболевания без лабораторного подтверждения клинического диагноза - до 15,2%.

Лабораторное подтверждение диагноза коклюш с учётом ранжирования территорий по уровню заболеваемости

Методы диагностики	Территории с различным уровнем заболеваемости			
	ПЗ более 50,0	ПЗ 30,0-50,0	ПЗ 15,0-30,0	ПЗ 5-15,0
Количество территорий	12	18	12	30
ПЦР-диагностика, %	59,1	55,1	61,9	54,8
Серодиагностика, %	32,9	35,4	34,9	28,4
Бактериология, %	3,8	3,7	1,7	1,6
Без лабораторного подтверждения, %	4,2	5,8	1,5	15,2

Проведён анализ использования каждого метода исследования в клинической лабораторной диагностике коклюша.

С помощью культурального метода в 2023 году проведено 35 868 исследований с диагностической целью и 19 840 исследований по эпидемическим показаниям. Культуральные исследования проводились на 45,3% территорий РФ. До 5% диагнозов поставлено с помощью культурального метода микробиологической диагностики на 89,4% территорий, от 5% до 10% диагнозов - на 5,9% территорий; более 10% диагнозов подтверждено на 4,7% территорий. В 2018-2023 годах в 53,3% случаях заболевания выделены штаммы *B. pertussis*, в 13,9% случаях - штаммы *B. parapertussis*, в 4,4% случаях - штаммы *B. bronchiseptica*; интересно, что в 28,4% случаях заболевания выделены штаммы других пред-

ставителей *Bordetella* spp. Удельный вес положительных находок при проведении культурального исследования составил 1,5%.

С помощью ПЦР-диагностики в 2023 году проведено всего 147 577 исследований, из них 76,8% с диагностической целью и 23,2% исследований по эпидемическим показаниям. ПЦР-диагностику не использовали при обследовании с подозрением на коклюш в двух регионах. Более 70% диагнозов поставлено с помощью ПЦР-диагностики на 45,3% территорий, от 50% до 70% диагнозов - на 28,6% территорий, от 15 до 50% диагнозов - на 17,8% территорий; менее 15% диагнозов - на 8,3% территорий. Менее 10% диагнозов коклюш с помощью ПЦР-диагностики поставлено в трёх регионах РФ, что свидетельствует о недостаточном уровне внедрения молекулярно-генетического метода в практическом здра-

вохранении. В 2023 году на территории РФ для проведения ПЦР-диагностики использованы три зарегистрированные в установленном порядке отечественные ПЦР-тест-системы: Набор реагентов для выявления и дифференциации ДНК возбудителей коклюша (*Bordetella pertussis*), паракоклюша (*Bordetella parapertussis*) и бронхисептикоза (*Bordetella bronchiseptica*) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс *Bordetella* multi-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия); Набор реагентов для выявления ДНК *Bordetella species* с дифференциацией видов *Bordetella pertussis* и *Bordetella bronchiseptica* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «РеалБест ДНК *Bordetella species/ Bordetella pertussis/ Bordetella bronchiseptica*» (Вектор Бест, Россия); Набор реагентов для выявления и дифференциации ДНК *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica* и *Bordetella holmesii* методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени «АмплиПрайм *Bordetella*» (ООО «НекстБио», Россия). В 2023 году большинство ПЦР-исследований (70,9%) проведено с помощью ПЦР-тест-системы «АмплиСенс *Bordetella* multi-FL», 22,9% исследований - с помощью ПЦР-тест-системы «АмплиПрайм *Bordetella*»; 6,2% исследований - с помощью ПЦР-тест-системы «РеалБест ДНК *Bordetella species/ Bordetella pertussis/ Bordetella bronchiseptica*».

Проведены исследования по оценке эффективности данных ПЦР-тест-систем. При сравнении ПЦР-тест-систем «АмплиСенс *Bordetella* multi-FL» и «АмплиПрайм *Bordetella*» совпадение результатов составило 84,3%, расхождение по результатам идентификации вида возбудителя отмечено в 9,1% случаев; при этом ПЦР-тест-система «АмплиПрайм *Bordetella*» позволяла дополнительно идентифицировать 6,6% образцов, которые при применении ПЦР-тест-системы «АмплиСенс *Bordetella* multi-FL» давали отрицательный результат. При сравнении ПЦР-тест-систем «Ампли-

Сенс *Bordetella* multi-FL» и «РеалБест ДНК *Bordetella species/ Bordetella pertussis/ Bordetella bronchiseptica*» совпадение результатов составило 93,5%; при этом ПЦР-тест-система «РеалБест ДНК *Bordetella species/ Bordetella pertussis/ Bordetella bronchiseptica*» позволяла дополнительно идентифицировать 6,5% образцов, которые при применении ПЦР-тест-системы «АмплиСенс *Bordetella* multi-FL» давали отрицательный результат. При сравнении ПЦР-тест-систем «РеалБест ДНК *Bordetella species/ Bordetella pertussis/ Bordetella bronchiseptica*» и «АмплиПрайм *Bordetella*» совпадение результатов составило 78,6%, расхождение по результатам идентификации вида возбудителя составило 19,8%; при этом ПЦР-тест-система «АмплиПрайм *Bordetella*» позволяла дополнительно идентифицировать 1,6% образцов, которые при применении ПЦР-тест-системы «РеалБест ДНК *Bordetella species/ Bordetella pertussis/ Bordetella bronchiseptica*» давали отрицательный результат. Полученные результаты позволили сделать вывод, что чувствительность тест-систем ($n=111$ образцов) следующая: «АмплиСенс *Bordetella* multi-FL» - 91,9%, «РеалБест ДНК *Bordetella species/ Bordetella pertussis/ Bordetella bronchiseptica*» - 99,1%, «АмплиПрайм *Bordetella*» - 99,1%.

С помощью серологического метода микробиологической диагностики в 2023 году проведено 42 145 исследований с диагностической целью и 4153 исследований по эпидемическим показаниям. Серодиагностику использовали при обследовании лиц с подозрением на коклюш на 90,8% территорий РФ. Более 70% диагнозов поставлено с помощью серодиагностики на 12,7% территорий, от 50% до 70% диагнозов - на 10,1% территорий, от 15% до 50% диагнозов на 44,3%, менее 15% диагнозов - на 32,9% территорий. Более 84% диагнозов коклюша лабораторно подтверждено в пяти регионах РФ, что свидетельствует о том, что диагноз коклюша поставлен не ранее чем на третьей неделе болезни, т. е. ретроспективно. До 2021 года на территориях РФ для проведения серологической диа-

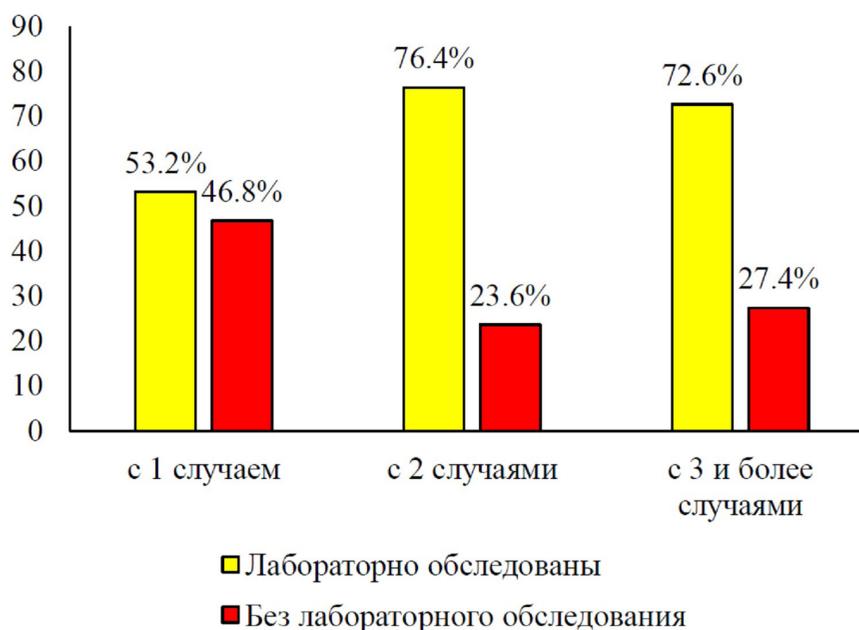


Рис. 4. Удельный вес лабораторно подтвержденных случаев коклюша в очагах инфекции.

гностики применяли РА, РПГА, ИФА; с 2021 года для диагностических целей регламентирован только ИФА. Вместе с тем, только 61,0% серологических исследований проведен с помощью ИФА, а 39,0% исследований с помощью РА и РПГА, которые в настоящее время не регламентированы для этих целей.

В 2023 году на территории РФ зарегистрировано 19 470 очагов коклюша и 352 046 контактных лиц. В 78,73% случаев зарегистрированы очаги с одним случаем заболевания и в 21,27% - очаги с 2-мя и более случаями заболевания. В очагах коклюша лабораторно обследованы только 39,7% лиц и зарегистрировано 5% положительных находок возбудителя. При анализе лабораторного обследования контактных лиц установлено (рис. 4), что в очагах с одним случаем коклюша лабораторное подтверждение диагноза отмечено в 53,2% случаев, в очагах с 2 случаями – в 76,4% случаев, в очагах с 3 и более случаями – в 72,6% случаев.

Применение разных методов микробиологической диагностики показало, что в очагах с 1 случаем коклюша ПЦР-диагностику применяли в 77,8% случаях, в очагах с 2 случаями - в 75,2%, в очагах с 3 и более случаями - в 85,8% случаев. Анализ идентифицированных положительных находок показал, что увеличение применения ПЦР-диагностики в очагах коклюша привело к росту числа положительных находок с 3,3% в очагах с 1 случаем до 9,9% в очагах с 3 и более случаями.

В Референс-центре проведено исследование секционного материала от больных, умерших от коклюша. В качестве секционного материала поступали образцы лёгочной ткани, трахеи, бронхов и кровь, в двух случаях на исследование присланы образцы селезёнки. При проведении молекулярно-генетического исследования во всех образцах секционного материала присутствовал ДНК *B. pertussis*.

Обсуждение. В последние годы наблюдается тенденция роста случаев коклюшной инфекции и значительный подъём заболеваемости в 2023 году, связанный с накоплением неиммунной прослойки населения и улучшением выявления заболевших коклюшем, в том числе с лёгкими и средней тяжести формами заболевания. Анализ состояния клинической лабораторной диагностики показал интенсивное внедрение в 2023 году ПЦР-диагностики в субъектах РФ для проведения диагностических исследований и при обследовании очагов коклюшной инфекции по эпидемическим показаниям, что позволило в максимально сжатые сроки выявлять больных коклюшем и при регистрации групповых очагов в образовательных или медицинских коллективах организовывать профилактические и противоэпидемические мероприятия по максимальному разобщению детей и взрослых, находившихся в прямом близком контакте с заболевшими, от остального коллектива для предупреждения распространения инфекции. Культуральный метод показал свою эффективность только при обследовании больных с наличием спазматического кашля и низкую эффективность при обследовании очагов инфекции. В связи с этим в новой редакции СанПин лабораторное обследование контактных лиц в очагах коклюша рекомендуется осуществлять методом ПЦР-диагностики и/или ИФА (с определением антител IgM и IgG классов) без учёта длительности очага; при положительном результате ИФА и отсутствии кашля

проводить однократное ПЦР-исследование, в случае наличия кашля дополнительные исследования можно не проводить. В связи с большим количеством летальных случаев среди детей раннего возраста в новой редакции СанПин в семейных очагах рекомендуется устанавливать медицинское наблюдение за контактными лицами в течение 14 календарных дней; в очагах инфекции, где проживает ребёнок до 1 года, источник инфекции изолируется сроком до 25 календарных дней от начала заболевания или выявления носительства; всем контактным лицам проводить ПЦР-исследование; у контактировавших лиц осуществлять однократное ИФА-исследование (с определением трёх классов антител IgA, IgM, IgG), при положительном результате в ИФА и отсутствии кашля проводить однократное ПЦР-исследование, в случае наличия кашля - дополнительные исследования можно не проводить. На территориях, где клинические диагнозы в основном подтверждаются с помощью серологического метода микробиологической диагностики, необходимо обратить внимание на то, что данный метод является ретроспективным и не позволяет выявлять заболевание на ранних сроках, что может способствовать распространению возбудителя инфекции, особенно в организованных коллективах. При проведении серологических исследований следует использовать только регламентированный нормативной документацией метод – ИФА.

В настоящее время с учётом продолжающего роста случаев заболеваний коклюшем, отсутствия ревакцинирующих прививок у детей школьного возраста и взрослых из декретированных групп населения, необходимо своевременно и быстро выявлять больных коклюшем, проводить обследование лиц с длительным кашлем, с «остаточным кашлем» после выздоровления от простудных и других инфекционных заболеваний, расследовать каждый случай коклюшной инфекции как в организованных коллективах, так и в семейных очагах для предупреждения распространения возбудителя инфекции.

Заключение. Анализ клинической лабораторной диагностики коклюша на территории Российской Федерации показал интенсивное в 2023 году использование метода ПЦР-диагностики при обследовании лиц с подозрением на коклюш с использованием отечественных ПЦР-тест-систем, активное обследование очагов коклюшной инфекции и недостаточное применение ИФА с целью серодиагностики, позволил внести изменения в санитарно-эпидемиологические правила в части обследования в очагах инфекции с использованием различных методов микробиологической диагностики.

ЛИТЕРАТУРА (П. 16 СМ. REFERENCES)

1. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2023 году: Государственный доклад. М: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2024.
2. Зверякина Н.Н., Ценева Г.Я., Курова Н.Н., Лосева Л.В., Курова Г.А., Лямина В.П. К вопросу о повышении эффективности бактериологического метода диагностики коклюшной инфекции. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2002; 2:44-5.
3. Степаншина В.Н., Алексеева Л.Н., Коробова О.В., Логачева Л.В., Шепелин А.П., Анисимов Г.А. и др. Взаимосвязь состава питательных сред с ростовыми и биологическими свойствами *B. per-*

- tussis. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 1994; 6:26-7.
- Ценева Г.Я., Курова Н.Н. Микробиологическая характеристика возбудителя коклюша и лабораторная диагностика коклюша. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2003; 5(4):329-41.
 - Пименова А.С., Андриевская И.Ю., Гадуа Н.Т., Чагина И.А., Борисова О.Ю. Анализ результатов проведения внешнего контроля качества исследований по выявлению возбудителя коклюша бактериологическим методом (2016-2022 гг.). *Проблемы медицинской микологии*. 2024; 26(2):185-86.
 - Медкова А.Ю., Аляпкина Ю.С., Синяшина Л.Н., Амелина И.П., Алексеев Я.И., Каратаев Г.И. и др. Распространенность стертых форм коклюша и анализ фазовых состояний бактерий *Bordetella pertussis*. *Детские инфекции*. 2010; 9(4): 19-22.
 - Пименова А.С., Борисова О.Ю., Цвиркун О.В., Басов А.А., Алешкин В.А., Афанасьев С.С. и др. Эффективность применения молекулярно-генетической диагностики при обследовании очагов коклюшной инфекции. *Инфекция и иммунитет*. 2017; 7(2): 162-70.
 - Нестерова Ю.В., Медкова А.Ю., Бабаченко И.В., Семин Е.Г., Калисникова Е.Л., Синяшина Л.Н. и др. Клинико-диагностическое значение генетических маркеров *Bordetella pertussis* у контактных лиц в семейных очагах. *Журнал инфектологии*. 2019; 11(1): 17-24.
 - Прадед М.Н., Яцышина С.Б., Селезнева Т.С., Малинина С.В., Бирюлева Н.В., Любимова Т.Е. и др. ПЦР-диагностика инфекций, вызванных *B. pertussis*, *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica*. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; 1: 53-6.
 - Пименова А.С., Борисова А.Б., Гадуа Н.Т., Борисова О.Ю., Афанасьев С.С., Петрова М.С. и др. Применение метода ПЦР для видовой идентификации возбудителя коклюша в Российской Федерации. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66(1):52-8.
 - Бабаченко И.В. Клинико-лабораторные особенности коклюшной инфекции у детей в современных условиях. Дисс. ... д-ра мед. наук. СПб; 2007.
 - Попова О.П., Скирда Т.А., Федорова И.М., Петрова М.С., Борисова О.Ю., Комбарова С.Ю. и др. Диагностическая ценность метода ИФА при коклюше у детей. *Детские инфекции*. 2016; 15(2):36-40.
 - Попова О.П., Скирда Т.А., Федорова И.М., Котелева С.И. Особенности специфического гуморального ответа и цитокиновой регуляции при коклюше у детей. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2015; 20(5):42-8.
 - Бабаченко И.В., Нестерова Ю.В., Чернышова Ю.Ю., Карасев В.В., Починяева Л.М., Калисникова Е.Л. Клинико-эпидемиологические аспекты коклюша у детей в условиях массовой вакцинопрофилактики. *Журнал инфектологии*. 2019; 11(2):88-96.
 - Петрова М.С., Борисова А.Б., Скирда Т.А., Сметанина С.В., Базарова М.В., Борисова О.Ю. и др. Особенности клиники и диагностики коклюша у взрослых. *Инфекционные болезни*. 2020; 18(3):104-10.
 - Скирда Т.А., Борисова О.Ю., Петрова М.С., Борисова А.Б. Серологическая диагностика коклюша у лиц старшего возраста. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65(8):492-5.
 - Скирда Т. А., Борисова О. Ю., Борисова А. Б., Комбарова С. Ю., Пименова А. С., Гадуа Н. Т. и др. Определение противокклюшних антител у школьников с длительным кашлем. *Журнал инфектологии*. 2023; 15(1):93-100.
 - Борисова А.Б., Мурашова Е.А., Андриевская И.Ю., Пурская О.Г., Борисова О.Ю., Пименова А.С. и др. Выявление ко-инфекции, вызванной *Bordetella pertussis* и *Bordetella bronchiseptica*. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2024; 2:71-81.
 - of the bacteriological method for diagnosing pertussis infection. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2002; 2:44-5. (in Russian)
 - Stepanshina V.N., Alekseeva L.N., Korobova O.V., Logacheva L.V., Shepelin A.P., Anisimov G.A. et al. Relationship of culture media composition with growth and biological properties of *B. pertussis*. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii I immunobiologii*. 1994; 6:26-7. (in Russian)
 - Tseneva G.Ya., Kurova N.N. Microbiological characteristics of the causative agent of pertussis and laboratory diagnostics of pertussis. *Klinicheskaya mikrobiologiya I antimikrobnaya khimioterapiya*. 2003; 5(4):329-41. (in Russian)
 - Pimenova A.S., Andrievskaya I.Yu., Gadua N.T., Chagina I.A., Borisova O.Yu. Analysis of the results of external quality control of studies to identify the causative agent of pertussis by the bacteriological method (2016-2022). *Problemy meditsinskoy mikologii*. 2024; 26(2):185-6. (in Russian)
 - Medkova A. Yu., Alyapkina Yu. S., Sinyashina L.N., Amelina I.P., Alekseev Ya. I., Karataev G.I. et al. The prevalence of subclinical forms of pertussis and analysis of phase states of bacteria *Bordetella pertussis*. *Detskie infektsii*. 2010; 9(4): 19-22. (in Russian)
 - Pimenova A.S., Borisova O.Yu., Tsvircun O.V., Basov A.S., Aleshkin V.A., Afanasiev S.S. et al. Effectiveness of molecular-genetic diagnostics during pertussis infection foci examination. *Infektsiya I immunitet*. 2017; 7(2): 162-70. (in Russian)
 - Nesterova Yu.V., Medkova A.Y., Babachenko I.V., Semin E.G., Kalisnikov E.L., Sinyashina L.N. et al. Clinical-diagnostic significance of genetic markers *Bordetella pertussis* in contacts in family centers. *Zhurnal infekologii*. 2019; 11(1): 17-24. (in Russian)
 - Praded M.N., Yatsyschyna S.B., Selezneva T.S., Malinina S.V., Birulyeva N.V., Lubimova T.Ye. et al. The kit of reagents for polymerase chain reaction diagnostic of infections caused by *B.pertussis*, *B.parapertussis* and *B.bronchiseptica*. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2013; 1: 53-6. (in Russian)
 - Pimenova A.S., Borisova A.B., Gadua N.T., Borisova O.Yu., Afanasiev S.S., Petrova M.S., et al. Application of PCR method for species identification of pertussis pathogen in the Russian Federation. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2021; 66(1):52-8. (in Russian)
 - Babachenko I.V. Clinical and laboratory features of pertussis infection in children in modern conditions. Diss.... St. Petersburg; 2007. (in Russian)
 - Popova O.P., Skirda T.A., Fedorova I.M., Petrova M.S., Borisova O.Yu., Kombarova S.Yu., et al. Diagnostic value of the pertussis ELISA method in children. *Detskie infektsii*. 2016; 15(2):36-40. (in Russian)
 - Popova O.P., Skirda T.A., Fedorova I.M., Koteleva S.I. Features of a specific humoral response and cytokine regulation in pertussis in children. *Epidemiologiya I infektsionnye bolezni*. 2015; 20(5):42-8. (in Russian)
 - Babachenko I.V., Nesterova Yu.V., Chernyshova Yu.Yu., Karasev V.V., Pochinyaeva L.M., Kalisnikova E.L. Clinical and epidemiological aspects of pertussis in children in the context of mass vaccine prophylaxis. *Zhurnal infekologii*. 2019; 11(2):88-96. (in Russian)
 - Petrova M.S., Borisova A.B., Skirda T.A., Smetanina S.V., Bazarova M.V., Borisova O.Yu. et al. Features of the clinic and diagnosis of pertussis in adults. *Infektsionnye bolezni*. 2020; 18(3):104-10. (in Russian)
 - Kurova N., Timofeeva E.V., Guiso N., Macina D. A cross-sectional study of *Bordetella pertussis* seroprevalence and estimated duration of vaccine protection against pertussis in St.Petersburg, Russia. *Vaccine*. 2018; 36:7936-42.
 - Skirda T.A., Borisova O.Yu., Petrova M.S., Borisova A.B. Serological diagnosis of pertussis in older people. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2020; 65(8):492-5. (in Russian)
 - Skirda TA, Borisova OYu, Borisova AB, Kombarova SYu, A.S. Pimenova AS, Gadua NT, et al. Determination of anti-pertussis antibodies in schoolchildren with prolonged cough. *Zhurnal infekologii*. 2023; 15(1):93-100. (in Russian)
 - Borisova A.B., Murashova E.A., Andrievskaya I.Yu., Purskaya O.G., Borisova O.Yu., Pimenova A.S. et al. Detection of co-infection caused by *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Epidemiologiya I infektsionnye bolezni*. 2024; 2:71-81. (in Russian)

REFERENCES

- On the state of sanitary and epidemiological well-being of the population in the Russian Federation in 2023: State report. Moscow: Federal'naya sluzhba po nadzoru v sfere zashchity prav potrebiteley I blagopoluchiya cheloveka; 2024. (in Russian)
- Zveryakina N.N., Tseneva G.Ya., Kurova N.N., Loseva L.V., Kurova G.A., Lyamina V.P. On the issue of increasing the effectiveness

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Теслова О.Е.^{1,2}, Муталинова Н.Е.^{1,2}, Рудакова С.А.¹, Кузьменко Ю.Ф.^{1,2}, Рудаков Н.В.^{1,2}

АНАЛИЗ ГЕНОВИДОВОЙ СТРУКТУРЫ ЗАБОЛЕВАНИЙ НАСЕЛЕНИЯ ИКСОДОВЫМИ КЛЕЩЕВЫМИ БОРРЕЛИОЗАМИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИММУНОБЛОТТИНГА

¹ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора, г. Омск, 644080, Россия;

²ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, г. Омск, 644099, Россия

*Геновидовые особенности боррелий находят отражение в характере органических поражений, что обуславливает полиморфизм клинической картины в зависимости от этиологии заболевания. Проанализированы результаты исследования методом иммуноблоттинга сывороток крови больных иксодовыми клещевыми боррелиозами и изучена возможность применения данного метода для установления геновидового разнообразия патогенных боррелий комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Определена роль различных геновидов боррелий в развитии заболеваний иксодовыми клещевыми боррелиозами на территории юга Западной Сибири. Проведено исследование 982 образцов сывороток крови лиц, пострадавших от нападения клещей, из которых у 181 обследованного обнаружены антитела к боррелиям. Специфические антитела классов IgM и IgG к боррелиям определяли методом ИФА с использованием коммерческих наборов. В последующем 63 положительные сыворотки отобраны для постановки иммуноблоттинга. В результате исследования методом иммуноблоттинга специфические антитела к *B. garinii* обнаружены в 53,8% случаев из общего числа положительных образцов, 15,4% - *B. afzelii*, 7,7% приходится на *B. sensu stricto* и 3,8% на *B. spielmanii*. В подавляющем большинстве выявлены антитела к антигенам *B. garinii* (в 3,5 раза чаще, чем к *B. afzelii*).*

Ключевые слова: иксодовые клещевые боррелиозы; серологическая диагностика; иммуноблоттинг

Для цитирования: Теслова О.Е., Муталинова Н.Е., Рудакова С.А., Кузьменко Ю.Ф., Рудаков Н.В. Анализ геновидовой структуры заболеваний населения иксодовыми клещевыми боррелиозами с использованием иммуноблоттинга. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69 (10): 556-560.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-10-556-560>

Для корреспонденции: Рудакова Светлана Анатольевна, д-р мед. наук, зав. лаб. молекулярной диагностики с группой клещевых боррелиозов, гл. науч. сотр.; зав. отделом природно-очаговых бактериальных зоонозов; e-mail: svetruda@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила	17.11.2023
Принята к печати	15.07.2024
Опубликовано	00.10.2024

Teslova O.E.^{1,2}, Mutalinoва N.E.^{1,2}, Rudakova S.A.¹, Kuzmenko J.F.^{1,2}, Rudakov N.V.^{1,2}

ANALYSIS OF THE GENE SPECIES STRUCTURE OF IXODID TICK-BORNE BORRELIOSIS DISEASES USING IMMUNOBLOTTING

¹ Omsk Research Institute of Natural Focal Infections, 644080, Omsk, Russia;

² Omsk State Medical University, 644099, Omsk, Russia

The gene-species characteristics of Borrelia are reflected in the nature of organ lesions, which causes clinical polymorphism depending on the etiology of the disease. The results of the study of blood sera of patients with ixodic tick-borne borreliosis using immunoblotting was presented, the possibility of using this method to establish the genotypes diversity of borrelia of the Borrelia burgdorferi sensu lato complex have been studied. The role of different genotypes of borrelia in the development of tick-borne borreliosises in the south of Western Siberia has been determined. The blood serum samples of 982 persons who affected by tick bite was investigated, 181 examined persons had antibodies to borrelia. Specific antibodies of IgM and IgG classes to borrelia were determined by ELISA using commercial kits. Subsequently, 63 positive sera were analysed by immunoblotting. Specific antibodies to B. garinii were found in 53,8 % of the total number of positive samples, 15, 4 % - to B. afzelii, 7,7 % to B. sensu stricto and 3,8 % to B. spielmanii as a result of immunoblot analysis. Most of them the antibodies to B. garinii (3,5 times more often than to B. afzelii) were found.

Key words: tick-borne borreliosises; serological diagnosis; immunoblotting

For citation: Teslova O.E., Mutalinoва N.E., Rudakova S.A., Kuzmenko J.F., Rudakov N.V. Analysis of the gene species structure of ixodic tick-borne borreliosises diseases using immunoblotting. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (10): 556-560 (in Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-10-556-560>

For correspondence: Rudakova S.A., MD, DSc, Head of the Laboratory for Molecular Diagnostics with a Group of Tick-Borne Borreliosises, Chief Scientific Officer; Head of the Department of Zoonotic Infections; e-mail: svetruda@mail.ru

Information about authors:

Teslova O.E.,	https://orcid.org/0000-0002-1897-5522 ;
Mutalinoва N.E.,	https://orcid.org/0000-0002-9572-7792 ;
Rudakova S.A.,	https://orcid.org/0000-0001-6262-129X ;
Kuzmenko J.F.,	https://orcid.org/0000-0001-8267-7012 ;

Rudakov N.V., <https://orcid.org/0000-0001-9566-9214>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 17.11.2023

Accepted 15.07.2024

Published 00.10.2024

Введение. Иксодовые клещевые боррелиозы (ИКБ) занимают ведущее место в Российской Федерации среди природно-очаговых инфекций, передающихся клещами [1,2].

Иксодовые клещевые боррелиозы - инфекционное природно-очаговое заболевание с трансмиссивным путём передачи, вызываемое бактериями рода *Borrelia* семейства *Spirochaetaceae*, характеризующееся полиморфизмом клинических проявлений с преимуществом поражением кожи, нервной системы, сердца, опорно-двигательного аппарата, имеющее склонность к хроническому и рецидивирующему течению [3,4]. Возбудителями иксодовых клещевых боррелиозов являются различные геновиды боррелий, относящиеся к комплексу *Borrelia burgdorferi sensu lato*, включающему более 20 генотипов по всему миру [5-7].

Установление видовой принадлежности возбудителя является важным аспектом при лабораторной диагностике и лечении клещевого боррелиоза. Генотипические особенности возбудителя в определённой мере влияют на клинические проявления болезни. С геновидом боррелий связывают особенности органного характера поражений, например, мигрирующая эритема наблюдается наиболее часто (до 90%) при инфицировании *B. afzelii*, тогда как *B. garinii* обуславливает преимущественно поражение нервной системы (до 40%). *B. burgdorferi sensu stricto* обуславливает преимущественное поражение опорно-двигательного аппарата.

В 2022 году в Российской Федерации зарегистрировано 7264 случая ИКБ, по сравнению с 2021 годом произошёл рост в 1,9 раза, показатель заболеваемости составил 4,98 на 100 тыс. населения и соответствует среднемноголетнему показателю заболеваемости ИКБ в России за последние двенадцать лет (СМП₂₀₁₀₋₂₀₂₁ составил 4,62 на 100 тыс. населения). Рост заболеваемости отмечается во всех федеральных округах России.

Для диагностики ИКБ разработан широкий круг различных по своей диагностической ценности лабораторных тестов. Используют прямые методы, направленные на обнаружение в исследуемом материале самих боррелий или их генетического материала. К таким методам относятся: бактериологический (культивирование на питательной среде с последующей идентификацией), микроскопический, молекулярно-биологический (обнаружение нуклеиновых кислот возбудителя). Применяют непрямые методы исследования: серологические, направленные на обнаружение антител к боррелиям в сыворотке крови.

Прямые методы выявления возбудителей ИКБ (посев на питательные среды, ПЦР) из клинического материала, взятого от больного (обычно кровь), мало информативны в связи с низким содержанием боррелий (их ДНК). В связи с этим, методы выявления боррелий, в большинстве случаев, не позволяют проводить видоспецифическую верификацию случаев ИКБ у больных.

Определение антител к боррелиям в биологическом материале является основным методом лабораторной диагностики клещевых боррелиозов. Для установления диагноза используют методы серологической диагностики, такие как ранее применявшаяся реакция непрямой иммуофлюоресценции (РНИФ), так и современные высокочувствительные методы диагностики на основе непрямого иммуоферментного анализа (ИФА) и иммунного блоттинга (ИБ) [8-10].

На первом этапе серологического исследования следует использовать скрининговый метод ИФА, на втором этапе полученные положительные образцы подтверждать методом ИБ, поскольку ИБ позволяет выявлять не суммарные антитела ко всему спектру антигенных детерминант, а антитела к конкретным антигенам боррелий, что снижает вероятность ложноположительных результатов [11-12]. При правильной интерпретации результатов комбинации ИФА и ИБ, как показывает опыт, вполне достаточны для серологической диагностики описанного заболевания [12]. На практике в Российской Федерации такой двухшаговый алгоритм тестирования используют редко ввиду его высокой стоимости. Серологические методы лабораторной диагностики на ранних этапах малоэффективны в силу особенностей иммунного ответа при боррелиозной инфекции. Необходимо повторное исследование (через 3-4 недели от предыдущего) сывороток больных с подозрением на ИКБ [13,14]. Результаты серологического обследования зависят от многих факторов, среди которых большое значение имеют сроки обследования, формы и стадии болезни, проведение антибактериальной терапии.

Цель работы - проанализировать результаты ИБ сывороток крови больных ИКБ как метода выявления антител к различным геновидам боррелий комплекса *B. burgdorferi sensu lato* и оценки их вклада в заболеваемость иксодовыми клещевыми боррелиозами на территории юга Западной Сибири.

Материал и методы. В качестве материала для исследования использованы сыворотки крови, полученные от больных различными формами иксодового клещевого боррелиоза в разные периоды заболевания, от лиц, подвергшихся нападению клещей, поступившие в лабораторию НИИ природно-очаговых инфекций за эпидемический сезон 2019 года.

На первом этапе исследования проведён анализ образцов сывороток крови методом ИФА на наличие антител к антигенам *B. burgdorferi s.l.*, используя тест-систему «ЛаймБест-IgM» и «ЛаймБест-IgG» (АО «Вектор-Бест», Новосибирск). Регистрация результатов проведена с помощью фотометра для микропланшет модель 680 (ООО «Био-Рад Лаборатория», Москва). При обработке результатов использованы значения оптической плотности (ОП) с последующим расчетом значений (ОП_{крит.}) и коэффициента серопозитивности сыворотки по формулам, приведенным в

инструкциях. Измеряли оптическую плотность в двух-волновом режиме: основной фильтр - 450 нм, референс-фильтр - в диапазоне 620-655 нм.

На втором этапе из числа исследованных методом ИФА проб отобраны положительные в ИФА сыворотки крови, для постановки реакции ИБ с высоко очищенными рекомбинантными антигенами *B. burgdorferi s.l.* для выявления антител к боррелиям комплекса *B. burgdorferi sensu lato*. Используются тест-системы recomLine Borrelia IgG и recomLine Borrelia IgM (Mikrogen Diagnostik, Германия). Высоко специфичные антигены p100 (*B. afzelii*), VlsE (различные штаммы), p58 (*B. garinii*), p41 (*B. burgdorferi sensu stricto*), p39 (*B. afzelii*), OspA (*B. afzelii*), OspC (*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. spielmanii*), p18 (*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. spielmanii*, *B. bavariensis*), нанесенные на нитроцеллюлозную мембрану тест-стрипа, после инкубации с образцами сывороток человека и реагентами, входящими в состав набора, проявятся в виде темноокрашенных полос в соответствующем месте. Проявленные полосы соответствуют антителам к различным геновидам боррелий, связавшимся со специфическими антигенами, фиксированными на тест-стрипе.

Данная тест-система позволяет выявлять специфические антитела к антигенам не только *B. afzelii* и *B. garinii* – основным патогенным геновидам, циркулирующим в России, но и к *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. spielmanii*, *B. bavariensis*.

Анализ тест-полосок проводился визуально, по оценке степени интенсивности окрашивания полос по отношению к cut-off полосе, согласно инструкции к тест-системе (рис. 1, табл. 1).

Анализ тест-полосок проводился визуально, по оценке степени интенсивности окрашивания полос по отношению к cut-off полосе, согласно инструкции к тест-системе (рис. 1, табл. 1).

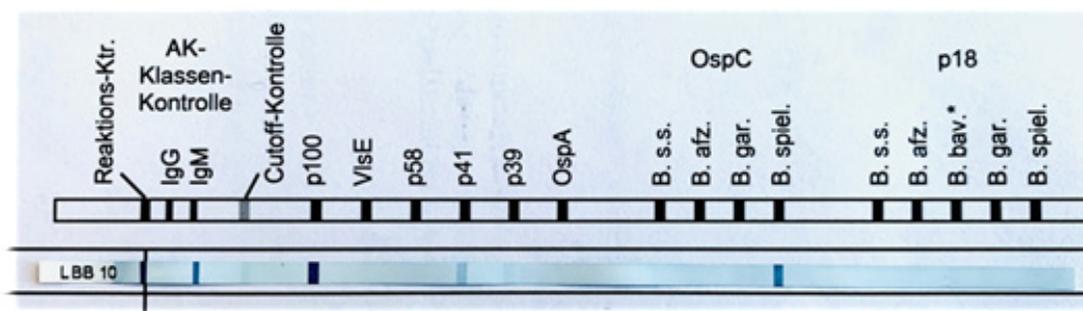


Рис. 1. Шаблон для оценки результатов с тест-стрипом.

Таблица 1

Оценка интенсивности полос по отношению к cut-off полосе

Интенсивность окрашивания полос	Оценка
Нет реакции	-
Очень слабая (слабее, чем у полосы cut-off)	+/-
Слабая (такая же, как у полосы cut-off)	+
Сильная (сильнее, чем у полосы cut-off)	++
Очень сильная	+++

Результат теста интерпретировали по суммарному количеству баллов в соответствии с табл. 2 и индивидуальной реактивности полос по отношению к полосе cut-off.

Таблица 2

Оценка баллов по обнаруженным антигенам

Антиген	Баллы IgG	Баллы IgM
p100	5	5
VlsE	6	5
p58	4	4
p41	1	1
p39	5	4
OspA	5	5
OspC	5	8
p18	5	5

По полученной сумме баллов ставили оценку образцу (положительный, отрицательный или сомнительный) в соответствии с табл. 3.

Интерпретация результата по суммарному количеству баллов

Сумма баллов	Оценка IgG	Сумма баллов	Оценка IgM
≤ 5	Отрицательная	≤ 5	Отрицательная
6-7	Сомнительная	6	Сомнительная
≥ 8	Положительная	≥ 7	Положительная

Результаты и обсуждение. На первом этапе методом ИФА исследовано 982 образца сывороток крови от лиц, подвергшихся нападению клещей. Их них 181 образец крови положительный, в них выявлены антитела классов IgM и IgG в различных разведениях от 1/100 до 1/12800, что составило 18,4% от всех исследованных проб. Антитела класса IgM обнаружены в 105 образцах крови (58,0%), IgG - в 57 образцах (31,5%), сочетание обоих классов антител наблюдалось в 19 случаях (10,5% из всех положительных образцов соответственно).

На втором этапе исследования для реакции ИБ отобрано 63 образца из числа проб, положительных в ИФА. В результате проведения теста второго уровня положительный результат подтвердился в 26-ти пробах, что составило 41,3% из отобранных образцов, у 22 проб

результат оказался отрицательным, что составило 34,9%. У 23,8% образцов методом ИФА обнаружены антитела класса IgG к цитомегаловирусу и вирусу Эпштейн-Барра, что объясняет появление неспецифической реакции при определении антител класса IgM в ИБ.

Видовая структура возбудителей ИКБ распределилась следующим образом: специфические антитела к *B. garinii* обнаружены в 53,8% случаев из общего числа положительных образцов, 15,4% - *B. afzelii*, 7,7% приходится на *B. sensu stricto* и 3,8% на *B. spielmanii*. Присутствуют образцы с сочетанным содержанием двух или трех видов боррелий, их доля составляет 3,8-7,7% от общего количества положительных образцов (рис. 2). В подавляющем большинстве выявлены антитела к антигенам *B. garinii*, в 3,6 раза чаще, чем к *B. afzelii*.

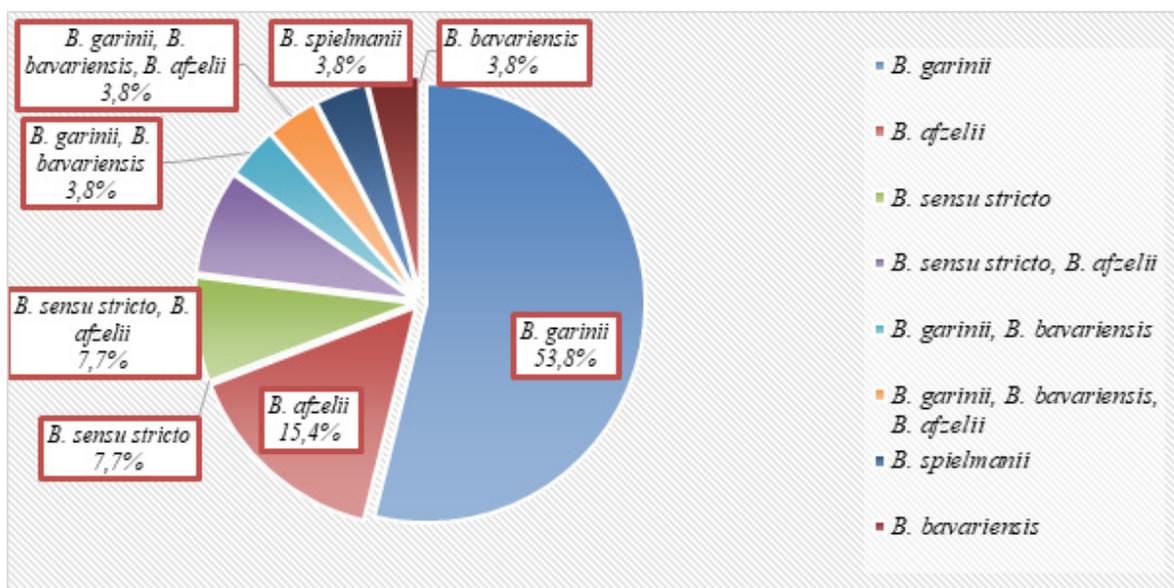


Рис. 2. Видовая структура возбудителей иксодовых клещевых боррелиозов.

За последние десятилетия накоплен огромный опыт по диагностике иксодовых клещевых боррелиозов, однако до сих пор остаются сложности в постановке окончательного клинического диагноза. Не вызывает сомнения, что диагностика ИКБ должна проводиться комплексно, учитывая эпидемиологический анамнез, клинические проявления пациента и лабораторные тесты. Прямые методы диагностики успешно реализуются в отношении переносчиков, снятых с пациентов и из природных стадий, давая лишь оценку возможного риска заражения.

Серологические методы являются основными в клинической лабораторной диагностике ИКБ. ИБ может быть рекомендован в качестве подтверждающего теста и дополнительного метода определения геновидовой принадлежности случаев ИКБ. Проблема диагностики клещевых трансмиссивных инфекций остается по-прежнему актуальной, поэтому необходимо дальнейшее совершенствование различных методов лабораторного подтверждения этой группы инфекций, включая использование метода ИБ для их дифференциальной лабораторной диагностики.

ЛИТЕРАТУРА (ПП. 3-8, 10, 11, 14 СМ. REFERENCES)

1. Коренберг Э.И. Инфекции, передающиеся иксодовыми клещами в лесной зоне, и стратегия их профилактики: изменение приоритетов. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2013; 5:7-17.
2. Рудакова С.А., Пенъевская Н.А., Блох А.И., Рудаков Н.В., Транквилевский Д.В., Савельев Д.А., Теслова О.Е., Канешова Н.Е. Обзор эпидемиологической ситуации по иксодовым клещевым боррелиозам в Российской Федерации в 2010-2020 гг. и прогноз на 2021 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 2:52-61. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-52-61.
9. Манзенюк И.Н., Манзенюк О.Ю. Клещевые боррелиозы (болезнь Лайма): пособие для врачей. ЗАО «Вектор-Бест». — Кольцово; 2005.
12. Ананьева Л.П., Насонова В.А., Барскова В.Г., Стир А. Применение вестерн-иммуноблоттинга для определения сывороточных IgG-антител к антигенам различных генотипов боррелий - *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia afzelii* и *Borrelia garinii*. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 2002; 2:5-8.
13. Лобзин Ю.В., Усков А.Н., Козлов С.С. Лайм-боррелиоз (иксодовые клещевые боррелиозы). СПб: Фолиант; 2000.

REFERENCES

1. Korenberg E.I. Infections transmitted by ixodid ticks in the forest zone and a strategy for their prevention: changing priorities. *Epidemiologiya i Vaksino profilaktika*. 2013; 5:7-17. (in Russian)
2. Rudakova S.A., Pen'evskaya N.A., Blokh A.I., Rudakov N.V., Trankvilevsky D.V., Savel'ev D.A., Teslova O.E., Kaneshova N.E. Review of the epidemiological situation on ixodic tick-borne Borreliosis in the Russian Federation in 2010-2020 and prognosis for 2021. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsiy*. 2021; 2:52-61. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-52-61. (in Russian)
3. Stanek G., Wormser G.P., Gray J., Strle F. Lyme borreliosis. *Lancet*. 2012; 379:461-73. DOI: 10.1016/S0140-6736(11)60103-7.
4. Wilske B. Diagnosis of Lyme Borreliosis in Europe. *Vector-Borne*

5. Richter D., Postic D., Sertour N., Livey I., Matuschka F.R., Baranton G. Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu lato* species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2006; 56(Pt 4):873-81. DOI: 10.1099/ijs.0.64050-0.
6. Wang G., Liveris D., Mukherjee P., Jungnick S., Margos G., Schwartz I. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi*. *Curr. Protoc. Microbiol.* 2014; 34:12C.5.1-12C.5.31. DOI: 10.1002/9780471729259.mc12c05s34.
7. Wang G., van Dam A.P., Schwartz I., Dankert J. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi sensu lato*: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:633-53. DOI: 10.1128/CMR.12.4.633.
8. Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for test performance and interpretation from the Second national Conference on Serologic Diagnosis of Lyme Disease. *MMWR Morbid Mortal Wkly Rep.* 1995; 44: 590-1.
9. Manzenyuk I.N., Manzenyuk O.Yu. Tick-borne borreliosis (Lyme disease): a guide for physicians. Koltsovo; Vector-best; 2005.
10. Goossens H.A., van den Bogaard A.E., Nohlmans M.K. Serodiagnosis of Lyme borreliosis using detection of different immunoglobulin (sub) classes by enzyme-linked immunosorbent assay and Western blotting. *Clinical Laboratory*. 2001; 47(1-2):41-9.
11. Robertson J., Guy E., Andrews N., Wilske B., Anda P., Granström M. et. al. A European multicenter study of immunoblotting in serodiagnosis of lyme borreliosis. *Journal of clinical microbiology*. 2000; 38(6):2097-102. DOI: 10.1128/JCM.38.6.2097-2102.2000.
12. Anan'eva L.P., Nasonova V.A., Barskova V.G., Stir A. Use of western-immunoblotting to determine serum IgG-antibodies to antigens of different genotypes of *Borrelia* - *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia afzelii*, and *Borrelia garinii*. *Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni*. 2002; 2:5-8. (in Russian)
13. Lobzin Yu.V., Uskov A.N., Kozlov S.S. Lyme borreliosis (Ixodid tick-borne borreliosis). St. Petersburg: Foliant; 2000. (in Russian)
14. Brunner M., Sigal L.H. Immune complexes from serum of patients with Lyme disease contain *Borrelia burgdorferi* antigen and antigen-specific antibodies: potential use for improved testing. *Journal of Infection Diseases*. 2000; 182(2):534-9. DOI: 10.1086/315724.