ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА
ФБУН ЦНИИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ РОСПОТРЕБНАДЗОРА
НЕКОММЕРЧЕСКОЕ ПАРТНЕРСТВО «НАЦИОНАЛЬНОЕ НАУЧНОЕ ОБЩЕСТВО ИНФЕКЦИОНИСТОВ»

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА | 2017



СБОРНИК ТРУДОВ

IX ВСЕРОССИЙСКОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ

1 том

Москва, 2017 г.

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ
ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ «ЦЕНТРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭПИДЕМИОЛОГИИ» ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

НЕКОММЕРЧЕСКОЕ ПАРТНЁРСТВО «НАЦИОНАЛЬНОЕ НАУЧНОЕ ОБЩЕСТВО ИНФЕКЦИОНИСТОВ»

IX Всероссийская научно-практическая конференция

с международным участием

«МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА 2017»

СБОРНИК ТРУДОВ

Под редакцией академика РАН В.И. Покровского

ГЕНЕРАЛЬНЫЙ СПОНСОР: ООО «ИнтерЛабСервис»

ТОМ I

МОСКВА

2017

УДК 577.21
ББК 28.04
М75

СОСТАВ РЕДАКЦИОННОЙ КОЛЛЕГИИ:

Покровский В.И. (главный редактор)
Шипулин Г.А. (ответственный секретарь)
Альварес Фигероа М.В.
Астахова Т.С.
Веселкин А.А.
Гущин А.Е.
Домонова Э.А.
Карандашова И.В.
Карань Л.С.
Киреев Д.Е.
Маркелов М.Л.
Миронов К.О.
Петров В.В.
Платонов А.Е.
Подколзин А.Т.
Савочкина Ю.А.
Скачкова Т.С.
Творогова М.Г.
Хафизов К.Ф.
Чуланов В.П.
Шипулина О.Ю.
Яцышина С.Б.

М75 **Молекулярная диагностика.** Сб. трудов / колл. авт., под ред. В.И. Покровского. – Т. 1. – Тамбов: ООО фирма «Юлис», 2017. – 544 с.
ISBN 978-5-98407-011-9
ISBN 978-5-98407-012-6

В первом томе сборника трудов конференции «Молекулярная диагностика 2017» представлены результаты научных исследований российских и зарубежных специалистов в области молекулярной диагностики в различных сферах медицины, фармакогенетики и криминалистики.

Значительное место уделено вопросам молекулярной диагностики онкологии, вирусных гепатитов, ВИЧ и ВИЧ-ассоциированных инфекций, туберкулеза, инфекций органов репродукции, папилломавирусной инфекции, инфекций верхних и нижних дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта. Также рассмотрены новые подходы к выявлению возбудителей особо опасных инфекций.

Отдельные главы сборника посвящены вопросам диагностики и изучения моногенных заболеваний, а также применению молекулярных технологий анализа в криминалистике и судебной медицине.

Сборник предназначен для специалистов в области лабораторной диагностики и научных работников и будет интересен врачам клинической лабораторной диагностики, инфекционистам, эпидемиологам, гинекологам, урологам, дерматовенерологам, гастроэнтерологам, гепатологам, пульмонологам, онкологам, судебно-медицинским экспертам, врачам общей практики, студентам медицинских учебных заведений.

Издано в Российской Федерации по решению Организационного комитета IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2017».

УДК 577.21
ББК 28.04

© Коллектив авторов, 2017

ISBN 978-5-98407-012-6

ПРЕДИСЛОВИЕ



XXI век называют веком генетики, веком молекулярной медицины, когда геномные технологии создают базу развития персонализированной медицины будущего. Мы становимся свидетелями разработок новейших методов молекулярной диагностики, технологий лечения и профилактики болезней, формирования основ генетической паспортизации человека. Не вызывает сомнения, что внедрение геномных технологий в практику здравоохранения повышает эффективность мероприятий по диагностике и профилактике социально значимых и генетически обусловленных заболеваний, способствует проведению качественного эпидемиологического надзора за инфекционными заболеваниями, обеспечивает принятие адекватных мер в борьбе с ними, позволяет идентифицировать новые инфекционные угрозы и успешно прогнозировать развитие эпидемиологической ситуации. Методы молекулярной диагностики играют существенную роль в обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия населения РФ, биологической и микробиологической безопасности среды обитания человека. В настоящее время молекулярно-биологические методы востребованы также для обнаружения мутаций, обуславливающих резистентность возбудителей инфекционных заболеваний к антибактериальным и антивирусным препаратам, мутаций как маркеров онкологических и наследственных заболеваний.

Широкое использование высокоэффективных медицинских изделий для молекулярной диагностики инфекционных и неинфекционных заболеваний в условиях in vitro в одном из важнейших компонентов современной системы здравоохранения – клинической лабораторной диагностике – с целью получения достоверной лабораторной информации стало рутинным делом. Все большее распространение получают молекулярные методы в криминалистике и судебной медицине, в ветеринарии, в проведении генетического анализа сельскохозяйственных растений и т.д.

Внедрение молекулярно-биологических исследований в лабораторную практику активно осуществляется в рамках государственного санитарно-эпидемиологического надзора и контроля. Молекулярно-биологические методы в эпидемиологической практике незаменимы для оценки состояния объектов окружающей среды, при расшифровке вспышек и мониторинге заболеваний инфекционной этиологии.

С момента проведения предыдущей конференции молекулярная диагностика получила новый импульс в своем развитии, накопился огромный теоретический и практический опыт по внедрению молекулярных технологий в различные области медицины, криминалистики и ветеринарии. IX Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика 2017» призвана обобщить современные достижения молекулярной диагностики в области инфекционных и неинфекционных заболеваний, перспективы развития и внедрения новых молекулярных технологий в практику здравоохранения, собрать ведущих отечественных и зарубежных специалистов в области инфекционной и неинфекционной патологии, лабораторной диагностики, фармакологии, медицинского оборудования и т.д.

Сотни специалистов в области здравоохранения, санитарно-эпидемиологического надзора и науки из различных регионов Российской Федерации, ближнего и дальнего зарубежья представили результаты своих научных исследований в виде докладов (285), постеров (35) и публикаций в сборнике научных трудов конференции. В двухтомном сборнике научных трудов конференции нашел свое отражение широкий спектр передовых достижений в области молекулярной диагностики и эпидемиологии, которые были представлены на пленарных заседаниях и тематических секциях конференции.

В 830 опубликованных тезисах сборника отражены современные тенденции в развитии молекулярной диагностики в области инфекционных заболеваний человека и биологической безопасности, использовании молекулярных технологий в онкологии, фармакогенетике, судебной медицине, криминалистике, медицинской генетике и ветеринарии, внедрении методов массового параллельного секвенирования в клиническую лабораторную практику и т.д.

Более 7% публикаций сборника принадлежит ученым из стран ближнего (Беларусь, Украина, Казахстан, Узбекистан, Таджикистан) и дальнего (Италия, Германия, Дания, Бельгия, США, Сербия, Словения) зарубежья. Более 96% тезисов представили специалисты в области здравоохранения, санитарно-эпидемического надзора и науки из стран – членов Евразийского экономического союза (ЕАЭС).

Традиционно особое внимание в соответствующих разделах сборника уделено вопросам разработки и использования современных методов молекулярной диагностики социально значимых инфекционных заболеваний, прежде всего ВИЧ-инфекции, вирусных гепатитов, туберкулеза и инфекций, передающихся половым путем. Ряд публикаций посвящены исследованиям в области

молекулярной эпидемиологии, выявления мутаций лекарственной устойчивости, диагностике оппортунистических заболеваний при ВИЧ-инфекции и иммуносупрессивных состояниях. Актуальными на сегодняшний день остаются публикации, отражающие различные стороны применения молекулярных методов в трансфузиологии и трансплантологии с целью обеспечения вирусной безопасности донорской крови и ее компонентов, современные возможности молекулярного анализа в криминалистике и судебной медицине.

Ведущая роль молекулярно-биологических методов при изучении патологии желудочно-кишечного тракта, в диагностике внутриутробных, внутрибольничных инфекций и инфекций с воздушно-капельным и контактно-бытовым путем передачи, в проведении тестирования вируса папилломы человека в профилактике рака шейки матки подчеркнута в соответствующих публикациях сборника.

Несомненный интерес для специалистов представляет актуальная информация по диагностике новых и вновь возникающих инфекций, в числе которых особо опасные и природно-очаговые заболевания.

Большой интерес у специалистов должны вызвать публикации, посвященные роли молекулярной диагностики в генетике моногенных и мультифакторных заболеваний, фармакогенетике и фармакогеномике, онкологии, а также практическому внедрению новых молекулярных технологий, включая новейшие разработки в области массового параллельного секвенирования (NGS).

Отдельно представлены в сборнике работы по использованию молекулярных методов диагностики в ветеринарии, контроле качества и безопасности продуктов питания.

Образование новой экономической формации в мире – Евразийского экономического союза (ЕАЭС) – привело к формированию общего рынка медицинских изделий для стран – членов ЕАЭС. В отдельном разделе сборника отражена актуальная информация по вопросам регулирования медицинских изделий для молекулярной диагностики in vitro в рамках ЕАЭС и национального регулирования, их безопасности и эффективности.

Оргкомитет конференции искренне надеется, что широкий спектр обсуждаемых вопросов, новые данные, полученные с использованием современных молекулярных методов в ходе экспериментальных, клинико-лабораторных и эпидемиологических исследований, найдут своего читателя, будут востребованы специалистами разного профиля – научными сотрудниками, организаторами и работниками практического здравоохранения, ординаторами и аспирантами. Научные труды конференции активно популяризуют последние достижения геномики, протеомики, биоинформатики и генетики, методы молекулярной эпидемиологии, без которых в наши дни невозможна расшифровка любых проявлений эпидемического процесса (от вспышки до пандемии), создание современных диагностических, терапевтических и профилактических препаратов.

Главный редактор
сборника трудов IX Всероссийской
научно-практической конференции
с международным участием
«Молекулярная диагностика 2017»,
Председатель правления
Национального научного
общества инфекционистов,
академик РАН



В.И. Покровский

СОСТАВ ОРГАНИЗАЦИОННОГО КОМИТЕТА IX ВСЕРОССИЙСКОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ «МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА 2017»

Сопредседатели

Попова А.Ю.	Руководитель Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека - Главный государственный санитарный врач Российской Федерации, д.м.н., профессор
Скворцова В.И.	Министр здравоохранения Российской Федерации, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН
Покровский В.И.	Директор ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, д.м.н., профессор, академик РАН

Ответственный секретарь:

Шипулин Г.А.	Заведующий отделом молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора

Члены организационного комитета:

Атшабар Б.Б.	И.о. директора Казахского научного центра карантинных и зоонозных инфекций имени М. Айкимбаева
Баранов В.С.	Заведующий лабораторией пренатальной диагностики врожденных и наследственных заболеваний ФГБНУ «НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта» СЗО РАН, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН
Бейсембаева Ш.А.	Вице-президент Ассоциации медицинской лабораторной диагностики Республики Казахстан
Васин А.В.	Директор ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, к.б.н.
Власов В.В.	Директор ФБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» СО РАН, д.х.н., профессор, академик РАН
Власов Н.А.	Заместитель Руководителя Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору России
Горбунов В.А.	Директор ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» Минздрава Республики Беларусь, к.м.н.
Дятлов И.А.	Директор ФБУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, д.м.н., профессор, академик РАН
Ежлова Е.Б.	Начальник Управления эпидемиологического надзора, к.м.н.
Жибурт Е.Б.	Заведующий кафедрой трансфузиологии и проблем переливания крови ФГБУ «НМХЦ имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, академик РАЕН, д.м.н., профессор
Залетаев Д.В.	Заведующий лабораторией молекулярной генетики человека ФГБОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России, д.б.н., профессор
Зверев В.В.	Директор ФГБУ «НИИВиС им. И.И. Мечникова» РАН, д.б.н., профессор, академик РАН
Иванов П.Л.	Заместитель директора ФГБУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Минздрава России, руководитель специализированного центра молекулярно-генетической экспертизы Минздрава России, д.м.н., профессор
Иванов А.М.	Заведующий кафедрой клинической биохимии и лабораторной диагностики ГБОУ ВПО «ВМедА им. С.М. Кирова», главный лаборант Минобороны России, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН
Исаева Р.Б.	Ректор-председатель Казахского медицинского университета непрерывного образования
Лисица А.В.	Директор ФГБНУ «Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича», д.б.н., академик РАН

Любченко Л.Н.	Заведующая лабораторией клинической онкогенетики ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАН, д.м.н.
Каприн А.Д.	Директор ФГБУ «МНИОИ имени П.А. Герцена» Минздрава России, д.м.н., профессор, академик РАН
Козлов Р.С.	Директор НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава России, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН
Краевой С.А.	Заместитель Министра здравоохранения Российской Федерации, д.м.н.
Кубанова А.А.	Директор ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии», Председатель Российского общества дерматовенерологов и косметологов, д.м.н., профессор, академик РАН
Куличенко А.Н.	Директор ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН
Кутырев В.В.	Директор ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, д.м.н., профессор, академик РАН
Куцев С.И.	Директор ФГБУ «Медико-генетический научный центр» РАН, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН
Максютов Р.А.	Генеральный директор ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, к.б.н.
Малеев В.В.	Заместитель директора ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора по научной работе, д.м.н., профессор, академик РАН
Минкина Г.Н.	Профессор кафедры акушерства и гинекологии лечебного факультета ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова», д.м.н.
Мусабаев Э.И.	Директор Научно-исследовательского института вирусологии Минздрава Республики Узбекистан, д.м.н., профессор
Нетёсов С.В.	Заведующий Лабораторией бионанотехнологии, микробиологии и вирусологии и профессор кафедры молекулярной биологии Новосибирского государственного университета, д.б.н., профессор, член-корреспондент РАН
Покровский В.В.	Руководитель ФНМЦ по профилактике и борьбе со СПИДом ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, д.м.н., профессор, академик РАН
Поляков А.В.	Руководитель лаборатории ДНК-диагностики ФГБУ «Медико-генетический научный центр» РАН, д.б.н., профессор
Потекаев Н.Н.	Директор Московского научно-практического центра дерматовенерологии и косметологии, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН
Пузырев В.П.	Научный руководитель НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, д.м.н., профессор, академик РАН
Раманкулов Е.М.	Генеральный директор Национального центра биотехнологии Республики Казахстан
Святова Г.С.	Руководитель Республиканской медико-генетической консультации Казахстана
Скрябин К.Г.	Директор Центра «Биоинженерия» РАН, д.б.н., профессор, академик РАН
Смоленский В.Ю.	Начальник Управления научного обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения и международной деятельности Роспотребнадзора, к.м.н.
Степанов В.А.	Директор НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, д.б.н., профессор, член-корреспондент РАН
Сухих Г.Т.	Директор ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова», д.м.н., профессор, академик РАН
Сычев Д.А.	Заведующий кафедрой клинической фармакологии и терапии Российской медицинской академии последипломного образования, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН
Тотолян А.А.	Директор Научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, д.м.н., профессор, академик РАН
Тутельян В.А.	Научный руководитель ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», д.м.н., профессор, академик РАН

ОГЛАВЛЕНИЕ

РАЗДЕЛ 1. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТОВ

HUMAN PEGIVIRUS У РЕЦИПИЕНТОВ АЛЛОГЕННОГО КОСТНОГО МОЗГА
Королева О.М., Паровичникова Е.Н., Кузьмина Л.А., Дроков М.Ю., Васильева В.А., Михальцова Е.Д., Дубняк Д.С., Попова Н.Н., Конова З.В., Романова Т.Ю., Тихомиров Д.С., Туполева Т.А., Гапонова Т.В., Савченко В.Г. 39

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВИРУСА ГЕПАТИТА В И ОЦЕНКА ВРЕМЕНИ ЕГО ЭВОЛЮЦИИ В СИБИРИ
Мануйлов В.А., Карандашова И.В., Карлсен А.А., Нетесов С.В., Останкова Ю.В., Семенов А.В., Tallo T., Чуланов В.П. 40

СТРУКТУРА ГЕНОТИПОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА С У ПАЦИЕНТОВ ГЕПАТОЛОГИЧЕСКОГО ЦЕНТРА Г. АЛМАТЫ
Орадова А.Ш., Шопаева Г.А. 41

КОМПЛЕКСНОЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕПАТИТА С У БОЛЬНЫХ ГЕПАТОЛОГИЧЕСКОГО ЦЕНТРА Г. АЛМАТЫ
Орадова А.Ш., Шопаева Г.А. 42

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА А, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ НА ТЕРРИТОРИИ СИБИРИ В 2011-2015 ГГ.
Пименов Н.Н., Карандашова И.В., Комарова С.В., Неверов А.Д., Чуланов В.П. 42

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО АНАЛОГА КАПСИДНОГО БЕЛКА ВИРУСА ГЕПАТИТА Е И ИССЛЕДОВАНИЕ ЕГО АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ
Алаторцева Г.И., Нестеренко Л.Н., Лухверчик Л.Н., Сидоров А.В., Доценко В.В., Нурматов А.З., Нурматов З.Ш., Касымов О.Т., Кюрегян К.К., Михайлов М.И., Зверев В.В. 43

АПРОБАЦИЯ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАЦИЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ВИРУСА ГЕПАТИТА С «АМПЛИСЕНС® HCV-RESIST-SEQ» НА ПАНЕЛИ QCMD-2015
Булатова К.В., Карандашова И.В., Чуланов В.П., Шипулин Г.А. 44

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ ГЕПАТИТА С НА ТЕРРИТОРИИ ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ
Афанасьев М.В., Синьков В.В., Соловьев С.Ю. 46

ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОТИПИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ВИРУСА ГЕПАТИТА С (ВГС), ЦИРКУЛИРУЮЩЕГО У НАСЕЛЕНИЯ НИЖЕГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ В 2007-2015 ГГ.
Быстрова Т.Н., Михайлова Ю.В., Полянина А.В., Антипова О.В. 47

ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗА 3А ПОДАВЛЯЕТ ТРАНСКРИПЦИЮ И РЕПЛИКАЦИЮ ВИРУСА ГЕПАТИТА В, НО УВЕЛИЧИВАЕТ УРОВНИ ккзДНК НА МОДЕЛИ КЛЕТОК HEPG2-1.MERHBV _IN VITRO_
Брезгин С.А., Костюшев Д.С., Зуева А.П., Липатников А.Д., Чуланов В.П. 48

ВЫЯВЛЕНИЕ МУТАЦИЙ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ УСТОЙЧИВОСТЬ ВИРУСА ГЕПАТИТА В (HBV) К ПРОТИВОВИРУСНЫМ ПРЕПАРАТАМ
Галиуллин Н.И., Нагимова Ф.И., Шошокин В.А., Герасимов В.В., Уразов Н.Г. 49

БИОИНФОРМАЦИОННАЯ ДИАГНОСТИКА САЙТОВ РЕКОМБИНАЦИИ В ГЕНОМНЫХ СТРУКТУРАХ ШТАММОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА С
Гаращенко Н.Е., Джиоев Ю.П., Злобин В.И., Парамонов А.И., Степаненко Л.А., Малов С.И., Колбасеева О.В., Ботвинкин А.Д., Малов И.В. 50

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА В НА ТЕРРИТОРИИ ХАБАРОВСКОГО КРАЯ
Котова В.О., Балахонцева Л.А., Троценко О.Е. 52

ОСОБЕННОСТИ МЕЖГЕННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ С
Гончарова И.А., Бабушкина Н.П., Белобородова Е.В., Тарасенко Н.В., Марков А.В., Пузырев В.П. 53

ДЕЙСТВИЕ ИНГИБИТОРОВ ГИСТОНОВЫХ АЦЕТИЛТРАНСФЕРАЗ И ДЕАЦЕТИЛАЗ НА РЕПЛИКАТИВНЫЙ ЦИКЛ ВИРУСА ГЕПАТИТА В И УРОВНИ ккзДНК *IN VITRO*
Зуева А.П., Костюшев Д.С., Брезгин С.А., Чуланов В.П. 54

РЕКОМБИНАНТЫ ВИРУСА ГЕПАТИТА С: РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ, ПРОБЛЕМЫ ДИАГНОСТИКИ, КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ
Калинина О.В., Дементьева Н.Е., Дудина К.Р., Белопольская М.А., Козина А.Н., Климова Е.А., Знойко О.О. 55

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ РЕКОМБИНАНТНОЙ ФОРМЫ RF1_2K/1B ВИРУСА ГЕПАТИТА С В РОССИИ
Карандашова И.В., Булатова К.В., Чуланов В.П. 56

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПАНЕЛИ ОБРАЗЦОВ QCMD-2015 HBV DR С ПОМОЩЬЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ «АМПЛИСЕНС® HBV-RESIST-SEQ»
Карандашова И.В., Чуланов В.П., Шипулин Г.А. 57

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ В ПОЗИЦИЯХ 70 И 91 БЕЛКА CORE ВИРУСА ГЕПАТИТА С НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ И В ДРУГИХ РЕГИОНАХ МИРА
Кичатова В.С., Соболева Н.В., Карлсен А.А., Исаева О.В., Кюрегян К.К., Михайлов М.И. 59

ФИЛОДИНАМИКА И ЭВОЛЮЦИОННАЯ ИСТОРИЯ ГЕНОТИПА 3 ВИРУСА ГЕПАТИТА Е В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Карлсен А.А., Солонин С.А., Потёмкин И.А. , Исаева О.В., Лукашев А.Н., Кюрегян К.К., Михайлов М.И. 60

КОМПЛЕКСНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ИНТЕРЛЕЙКИНА 28В В ЛОКУСАХ rs12979860 И rs8099917 У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ С В КРАСНОДАРСКОМ КРАЕ
Книжник Т.А., Ерёмина Г.А., Моренец Т.М., Городин В.Н., Яковчук Е.Е. 60

ПРИМЕНЕНИЕ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ (NGS) ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ЭСКЕЙП-МУТАЦИЙ HBV У БОЛЬНЫХ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ КРОВИ
Коноплева М.В., Соколова М.В., Беленикин М.С., Кирьянов С.А., Шанько А.В., Баженов А.И., Ярош Е.В., Туполева Т.А., Семененко Т.А., Нестеренко В.Г., Суслов А.П. 62

ВИРУС ГЕПАТИТА В ВЫЗЫВАЕТ ФОРМИРОВАНИЕ ФОКУСОВ ФОСФОРИЛИРОВАННОГО γH2A.X SER139 ГИСТОНА НА МОДЕЛЯХ *IN VITRO* И *IN VIVO* В ГЕПАТОЦИТАХ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ В И B+D
Костюшев Д.С., Брезгин С.А., Зуева А.П., Липатников А.Д., Glebe D., Симирский В.Н., Чуланов В.П. 63

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕНОТИПОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА В В РЕГИОНАХ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Костюшев Д.С., Мамонова Н.А., Карандашова И.В., Лебедева Е.Б., Чуланов В.П. 64

ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ-ФАКТОРОВ РЕПАРАЦИИ ДНК DNA-PKcs И MRE−11 В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК HEPG2-1.MERHBV
Липатников А.Д., Брезгин С.А., Зуева А.П., Костюшев Д.С., Чуланов В.П. 65

ГЕНОТИПЫ ВИРУСА ГЕПАТИТА В СРЕДИ НЕКОТОРЫХ КОНТИНГЕНТОВ НАСЕЛЕНИЯ НИЖНЕГО НОВГОРОДА В 2011-2015 ГГ.
Полянина А.В., Быстрова Т.Н. 66

РАСПРОСТРАНЁННОСТЬ ГЕНОТИПОВ/ПОДГЕНОТИПОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА С В БЕЛАРУСИ В 2004–2016 ГОДАХ
Гасич Е.Л., Еремин В.Ф., Сосинович С.В. 67

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЯ И ДИАГНОСТИКА ГЕПАТИТА Е
Михайлов М.И., Малинникова Е.Ю., Кюрегян К.К. 68

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА В СРЕДИ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ С ВИРУСОЛОГИЧЕСКОЙ НЕЭФФЕКТИВНОСТЬЮ АРВТ
Останкова Ю.В., Семенов А.В., Чурина М.А., Тотолян Арег А. 69

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ МУТАЦИЙ УСТОЙЧИВОСТИ ВИРУСА ГЕПАТИТА С К ИНГИБИТОРАМ БЕЛКА NS5A СРЕДИ ПАЦИЕНТОВ, НЕ ПОЛУЧАВШИХ ЛЕЧЕНИЕ ПРЕПАРАТАМИ ПРЯМОГО ПРОТИВОВИРУСНОГО ДЕЙСТВИЯ
Булатова К.В., Карандашова И.В., Чуланов В.П. 70

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ГЕПАТИТА С СРЕДИ НЕОБСЛЕДОВАННОГО НАСЕЛЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ САХА (ЯКУТИЯ)
Семенов С.И., Скляр И.В., Зуева А.П., Слепцова С.С., Никитина С.Г., Максимова С.С., Карандашова И.В., Чуланов В.П. 72

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ВИРУСА ГЕПАТИТА В СРЕДИ НЕОБСЛЕДОВАННОГО НАСЕЛЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ САХА (ЯКУТИЯ)
Скляр И.В., Семенов С.И., Зуева А.П., Слепцова С.С., Никитина С.Г., Максимова С.С., Карандашова И.В., Чуланов В.П. 73

ВЫЯВЛЕНИЕ АНТИТЕЛ К БЕЛКУ CORE+1/ARFP HCV В СЫВОРОТКЕ КРОВИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА
Личная Е.В., Климашевская С.Н., Вербов В.Н., Эсауленко Е.В., Калинина О.В. 74

РАСПРОСТРАНЁННОСТЬ ГЕНОТИПОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА В В ГВИНЕЙСКОЙ РЕСПУБЛИКЕ
Скляр И.В., Карандашова И.В., Карань Л.С., Чуланов В.П. 75

КЛИНИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ ХРОНИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА D (ДЕЛЬТА) ПРИ РАЗЛИЧНОЙ РЕПЛИКАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ВИРУСОВ ГЕПАТИТА В И D В РЕСПУБЛИКЕ САХА (ЯКУТИЯ)
Семенов С.И., Максимова С.С., Писарева М.М., Тихонова Н.Н., Слепцова С.С. 76

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВИРУСА ГЕПАТИТА А В МОСКВЕ В 2014-2016 ГГ.
Волкова В.М., Карандашова И.В., Чуланов В.П., Бургасова О.А. 77

ЭКСПРЕССИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ПОЛИПЕПТИДА НЕСТРУКТУРНОГО БЕЛКА NS4 ВИРУСА ГЕПАТИТА С В ПРОКАРИОТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ
Семижон П.А., Фомина Е.Г., Счеслёнок Е.П., Школина Т.В., Касницкая Т.Н., Дубков Н.А., Владыко А.С. 78

ВЫЯВЛЕНИЕ ДНК ВИРУСА ГЕПАТИТА В, РНК ВИРУСА ГЕПАТИТА С В ОБРАЗЦАХ КРОВИ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ В ЛАБОРАТОРИЯХ Г. ЧИТЫ
Зимина А.В., Страмбовская Н.Н., Дутова А.А. 79

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВРЕМЕНИ НАЧАЛА ЦИРКУЛЯЦИИ СУБТИПА 3А ВИРУСА ГЕПАТИТА С НА ТЕРРИТОРИИ СССР
Мануйлов В.А., Чуб Е.В., Кичатова В.С., Соболева Н.В., Исаева О.В., Нетесов С.В. 80

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ МАРКЕРОВ ЭНТЕРАЛЬНЫХ ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТОВ СРЕДИ ТРУДОВЫХ МИГРАНТОВ, ПРИБЫВАЮЩИХ В РОССИЙСКУЮ ФЕДЕРАЦИЮ
Алсалих Н.Д., Сычев Д.А., Потемкин И.А., Кюрегян К.К., Михайлов М.И. 81

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ПОДГЕНОТИПОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА В В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ
Гасич Е.Л., Еремин В.Ф., Немира А.С. 82

ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ МАРКЕРОВ ГЕПАТИТА С СРЕДИ УСЛОВНО ЗДОРОВОГО НАСЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Соболева Н.В., Карлсен А.А., Кожанова Т.В., Кичатова В.С., Клушкина В.В., Исаева О.В., Игнатьева М.Е., Романенко В.В., Ооржак Н.Д., Малинникова Е.Ю., Кюрегян К.К., Михайлов М.И. 83

ПЦР КАК МЕТОД В КОМПЛЕКСНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ГЕПАТИТА С
Хайтович А.Б., Колесникова И.О....84

ОСОБЕННОСТИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ПОДГЕНОТИПОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА С В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ
Гасич Е.Л., Еремин В.Ф., Сосинович С.В. 85

HEPATITIS C VIRUS RESISTANCE TO ANTIVIRAL TREATMENT: DIAGNOSTICS AND CLINICAL VALUE
Francesca Ceccherini-Silberstein 86

PHENOTYPIC EVALUATION OF VIRAL INFECTIVITY AND ANTIVIRAL RESISTANCE PROFILES OF HEPATITIS B VIRUS *IN VITRO*
Glebe D. 86

HEPATITIS B VACCINES: HISTORY, ACHIEVEMENTS, PROBLEMS, AND PERSPECTIVES
Gerlich W.H. 87

РАЗДЕЛ 2. ВПЧ-ТЕСТИРОВАНИЕ И ПРОФИЛАКТИКА РАКА ШЕЙКИ МАТКИ

АНАЛИЗ ВЫЯВЛЯЕМОСТИ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА ВЫСОКОГО КАНЦЕРОГЕННОГО РИСКА И РАСПРОСТРАНЁННОСТИ ГЕНОТИПОВ ВИРУСА У ПАЦИЕНТОВ ЗАО «МЕДИЦИНСКАЯ КОМПАНИЯ ИДК», САМАРА
Никонорова И.В., Воронова Е.А., Кирилина Е.С. 89

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ПЕРСИСТЕНЦИЕЙ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА
Морозова О.А., Миктадова А.В., Сараев К.Н., Коваленко К.А., Машкина Е.В. 90

ХАРАКТЕР ЛОКАЛЬНЫХ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ШЕЙКИ МАТКИ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ
Андосова Л.Д., Конторщикова К.Н., Шахова К.А. 91

ОЦЕНКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВПЧ В МОЧЕ ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО СКРИНИНГА
Шарипова И.П., Мустафаев Х.М., Латыпов Р.Р. 92

ВИРУСНАЯ НАГРУЗКА КАК ФАКТОР, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЙ ВЕРОЯТНОСТЬ ОБНАРУЖЕНИЯ КОЙЛОЦИТАРНОЙ АТИПИИ В ТРАДИЦИОННОЙ И ЖИДКОСТНОЙ ЦИТОЛОГИИ У ЖЕНЩИН, ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИРУСОМ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА 16 ТИПА
Ворошилина Е.С., Владимирова Н.Б., Игнатова К.Ю., Куклин Е.С., Плотко Е.Э. 93

АЛГОРИТМ ДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ ШЕЙКИ МАТКИ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ПАПИЛЛОМАВИРУСАМИ
Дианова Т.В., Свердлова Е.С., Комарова Ю.В. 94

ДИАГНОСТИКА ЗАБОЛЕВАНИЙ ШЕЙКИ МАТКИ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ У ВИЧ-ПОЗИТИВНЫХ ЖЕНЩИН
Дианова Т.В., Свердлова Е.С. 95

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ ВПЧ 16 ТИПА У ВПЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ЖЕНЩИН Г. МОСКВЫ
Дмитрюкова М.Ю., Романюк Т.Н., Шипулина О.Ю. 96

ОБНОВЛЕННАЯ ПРОГРАММА ЦЕРВИКАЛЬНОГО СКРИНИНГА АВСТРАЛИИ, ОСНОВАННАЯ НА ПЕРВИЧНОМ ВПЧ-ТЕСТИРОВАНИИ. ПОСТУЛАТЫ И ТРЕБОВАНИЯ К ЛАБОРАТОРНЫМ ТЕСТАМ
Куевда Д.А. 97

ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ ИНТЕГРИРОВАННЫХ ВПЧ 16, 18 И 45 ТИПОВ У ЖЕНЩИН С РАЗЛИЧНЫМ ЦИТОЛОГИЧЕСКИМ ДИАГНОЗОМ
Дмитрюкова М.Ю., Романюк Т.Н., Шипулина О.Ю. 99

ГЕНОТИПЫ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА ВЫСОКОГО ОНКОГЕННОГО РИСКА, ВЫЯВЛЯЕМЫЕ У ЖЕНЩИН РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
Еремин В.Ф., Гасич Е.Л., Сосинович С.В. 100

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА ВЫСОКОГО ОНКОГЕННОГО РИСКА
Еремин В.Ф., Гасич Е.Л., Сосинович С.В. 101

ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИРКУЛЯЦИИ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА 16 И 18 ТИПОВ
Олюнина Е.А., Дуванова Е.А., Николаева Т.Н. 102

СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДВОЙНОЙ И МОНОЭКСПРЕССИИ БЕЛКОВ P16/KI67 И P16 ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ПОРАЖЕНИЙ ШЕЙКИ МАТКИ ТЯЖЕЛОЙ СТЕПЕНИ У ВПЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ЖЕНЩИН
Лешкина Г.В., Шипулина О.Ю., Романюк Т.Н., Шабалова И.П. 103

ВЕДЕНИЕ ПАЦИЕНТОК С ВПЧ-ИНФЕКЦИЕЙ, РОЛЬ КЛЕТОЧНЫХ МАРКЕРОВ В ВЫЯВЛЕНИИ ПРЕДРАКА ШЕЙКИ МАТКИ
Минкина Г.Н., Шипулина О.Ю., Лешкина Г.В., Романюк Т.Н., Фириченко С.В. 104

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВПЧ-ИНФЕКЦИИ ПРИ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ОРОФАРИНГЕАЛЬНОЙ ОБЛАСТИ
Поляков А.П., Славнова Е.Н., Никифорович П.А. 106

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ВПЧ-ИНФЕКЦИИ ВЫСОКОГО ОНКОГЕННОГО РИСКА СРЕДИ ЖЕНЩИН РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА САНКТ-ПЕТЕРБУРГА
Морозова С.Е., Каменева О.А., Косякова К.Г., Пунченко О.Е. 106

ОЦЕНКА ВЫЯВЛЕНИЯ *ВПЧ* У ЖЕНЩИН С ФОНОВЫМИ ПРОЦЕССАМИ ШЕЙКИ МАТКИ
Туркина И.А., Пепеляева А.В., Хайруллина А.М., Елекова Е.Ю., Денисова Е.В. 107

ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА И СВЯЗАННЫХ С НИМ ПАТОЛОГИЙ ШЕЙКИ МАТКИ У ЖЕНЩИН С ВИЧ-ПОЗИТИВНЫМ И ВИЧ-НЕГАТИВНЫМ СТАТУСОМ
Попова А.А., Шипулина О.Ю., Кравченко А.В., Деулина М.О., Дмитрюкова М.Ю., Романюк Т.Н., Зуева А.Г. 108

ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА У ЖЕНЩИН С ВИЧ-ПОЗИТИВНЫМ СТАТУСОМ И ДАННЫЕ РАСШИРЕННОЙ КОЛЬПОСКОПИИ
Попова А.А., Шипулина О.Ю., Кравченко А.В., Деулина М.О., Дмитрюкова М.Ю., Романюк Т.Н., Зуева А.Г. 109

СКРИНИНГ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА У ЖЕНЩИН С ВПЧ-АССОЦИИРОВАННОЙ ПАТОЛОГИЕЙ ШЕЙКИ МАТКИ
Синицына О.В., Коваленко В.В., Попова А.А. 110

ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ЦЕРВИКАЛЬНЫХ ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ НЕОПЛАЗИЙ И ИНВАЗИВНОГО РАКА ШЕЙКИ МАТКИ ПАЦИЕНТОВ МЕДИЦИНСКОГО ЦЕНТРА Г. ОБНИНСКА КАЛУЖСКОЙ ОБЛАСТИ
Киселева В.И., Мкртчян Л.С., Любина Л.В., Безяева Г.П., Панарина Л.В., Замулаева И.А., Крикунова Л.И. 111

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВСТРЕЧАЕМОСТИ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА У ПАЦИЕНТОВ РАЗЛИЧНОЙ ВОЗРАСТНОЙ КАТЕГОРИИ, ОБСЛЕДОВАННЫХ НА БАЗЕ СЕТИ КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЙ «ОЛИМП» В РЕСПУБЛИКЕ КАЗАХСТАН ЗА 2015-2016 ГГ.
Сулейменов Е.М., Балась А.Н., Кретова И.А., Усенова О.П., Левина И.А. 113

ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ НАЛИЧИЯ ИНТЕГРАЦИИ ВПЧ 16 ПРИ ЦЕРВИКАЛЬНЫХ ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ НЕОПЛАЗИЯХ
Киселева В.И., Мкртчян Л.С., Любина Л.В., Безяева Г.П., Панарина Л.В., Замулаева И.А., Шипулина О.Ю., Крикунова Л.И. 115

МНОГОФАКТОРНЫЙ РЕГРЕССИОННЫЙ АНАЛИЗ В ПРОГНОЗЕ РАЗВИТИЯ ЦЕРВИКАЛЬНЫХ ПОРАЖЕНИЙ ИНФЕКЦИОННОГО ГЕНЕЗА
Андосова Л.Д., Конторщикова Л.Д., Шахова К.А. 116

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ЦЕРВИКАЛЬНОГО СКРИНИНГА ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ЖЕНЩИН В МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ В 2016 ГОДУ
Подчуфарова Д.Е., Лебедева Н.Н., Оводова Ю.В., Енаева М.В., Серков И.Л., Пронин А.Ю. 117

ПЕЙЗАЖ ГЕНОТИПОВ ПАПИЛЛОМАВИРУСОВ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ СРЕДИ ЖЕНЩИН НИЖНЕГО НОВГОРОДА
Бруснигина Н.Ф., Махова М.А., Орлова К.А., Колесникова Е.А., Черневская О.М., Барышева Н.Н., Скобло Л.Е. 119

РЕЗУЛЬТАТЫ ВПЧ-ГЕНОТИПИРОВАНИЯ В СКРИНИНГЕ
Гончаревская З.Л., Роговская С.И., Теребнева Л.А., Шипулина О.Ю. 120

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДОСТОВЕРНОГО ПОРОГА НАЛИЧИЯ ИНТЕГРАЦИИ НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ ВПЧ ВКР СКРИН-ТИТР 14 С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА СРАВНЕНИЯ DROPLET DIGITAL PCR
Кулешова О.Б., Романюк Т.Н., Куевда Д.А., Шипулина О.Ю., Шипулин Г.А., Лебедева Ю.А. 121

ВЫЯВЛЕНИЕ ПАТОЛОГИИ ШЕЙКИ МАТКИ В ТРАДИЦИОННОЙ И ЖИДКОСТНОЙ ЦИТОЛОГИИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ СОВМЕСТНОГО ВПЧ-ПАП-ТЕСТА
Шипулина О.Ю., Романюк Т.Н., Лешкина Г.В. 122

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ЦЕРВИКАЛЬНОГО СКРИНИНГА И ОПЫТ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ
Шипулина О.Ю., Лешкина Г.В., Романюк Т.Н., Дмитрюкова М.Ю 123

ПЦР-ДИАГНОСТИКА ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ВНУТРЕННЕМ ЭНДОМЕТРИОЗЕ
Орадова А.Ш., Сапаргалиева А.Д., Шумкова Э.Н., Джардемалиева Н.Ж. 125

РАЗДЕЛ 3. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА В ОНКОЛОГИИ

СИНДРОМ МЭН 2А: КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ПРИ ЦИСТЕИНОВЫХ МУТАЦИЯХ В 10 И 11 ЭКЗОНАХ ГЕНА *RET*
Северская Н.В., Ильин А.А., Исаев П.А., Шинкаркина А.П., Дербугов Д.Н., Семин Д.Ю., Желонкина Н.В., Чеботарева И.В. 126

ДЕРЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *RARG* И *RXRA* ПРИ ОПУХОЛИ КЛАТСКИНА
Снежкина А.В., Федорова М.С., Калинин Д.В., Пудова Е.А., Краснов Г.С., Кудрявцева А.В. 126

ВЛИЯНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ДРАЙВЕРНЫХ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ *SDHx* НА ТРАНСКРИПТОМНЫЙ ПРОФИЛЬ ПРИ КАРОТИДНЫХ ХЕМОДЕКТОМАХ
Кудрявцева А.В., Снежкина А.В., Краснов Г.С., Федорова М.С., Степанов О.А., Жевелюк Е.А., Головюк А.В., Покровский А.В., Калинин Д.В., Зарецкий А.Р. 128

ОВЕРЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *HK2* КОРРЕЛИРУЕТ С ПОНИЖЕННОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ микроРНК LET-7G И LET-7C ПРИ ОПУХОЛИ КЛАТСКИНА
Снежкина А.В., Федорова М.С., Калинин Д.В., Краснов Г.С., Кудрявцева А.В. 129

DETECTION OF MOLECULAR CYTOGENETIC ABERRATIONS IN BONE MARROW CELLS IN RELAPSE OF MULTIPLE MYELOMA
Korets K.V., Andreieva S.V., Ruzhinskay E.E. 129

АКТИВАЦИЯ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ – НОВЫЙ ТИП БИОМАРКЕРОВ ДЛЯ НАЗНАЧЕНИЯ ТАРГЕТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ ОНКОЗАБОЛЕВАНИЯХ
Буздин А.А., Сорокин М.И., Глускер А.А., Гаража А.В., Поддубская Е.В., Широкорад В.И., Насхлеташвили Д.Р., Баранова М.П., Кашинцев К.Ю., Соков Д.Г., Сунцова М.В., Румянцев С.А., Гайфуллин Н.М., Ткачев В.С., Борисов Н.М. 130

КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ BRCA-АССОЦИИРОВАННОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ПАЦИЕНТОК САМАРСКОГО ОНКОДИСПАНСЕРА
Торопова Н.Е., Закамова Е.В. 131

ОПЫТ ГЛУБОКОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ ДНК КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО
Иванов М.В., Лактионов К.К., Бредер В.В., Черненко П.А., Баранова А.В., Стрельников В.В., Милейко В.А. 132

FISH-МЕТОД В ОНКОЦИТОЛОГИИ
Славнова Е.Н. 133

NEXAPROOF: ВОСЬМИГЕННАЯ ЭКСПРЕССИОННАЯ «ПОДПИСЬ» ПРЕДСКАЗЫВАЕТ ОТВЕТ НА СОРАФЕНИБ У ПАЦИЕНТОВ С РАКОМ ПОЧКИ
Сунцова М.В., Сорокин М.И., Анисенко А.Н., Широкорад В.И., Кашинцев К.Ю., Соков Д.Г., Румянцев С.А., Ткачев В.С., Борисов Н.М., Буздин А.А., Гаража А.В. 134

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ SNP rs 662 ПАРАОКСОНАЗЫ 1*(PON1)* НА ПОКАЗАТЕЛИ МЕТАБОЛИЗМА ЖЕЛЕЗА И ЛИПИДОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЖЕНЩИН С ДИАГНОЗОМ «ЭНДОМЕТРИОИДНАЯ АДЕНОКАРЦИНОМА»
Иванова Т.И., Полуэктова М.В., Хорохорина В.А., Чиркова Т.В., Мкртчян Л.С., Сыченкова Н.И., Рябченко Н.И., Крикунова Л.И. 135

ИНФОРМАТИВНОСТЬ ВЫЯВЛЕНИЯ МОЛЕКУЛ MICA В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ
Абакушина Е.В., Абакушин Д.Н. 136

ИЗМЕНЕНИЕ КОПИЙНОСТИ ГЕНОВ ПРИ АДЕНОКАРЦИНОМЕ ЖЕЛУДКА
Тимошкина Н.Н., Водолажский Д.И., Маслов А.А., Татимов М.З., Колесников Е.Н. 137

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА *UGT1A1* У ПАЦИЕНТОВ С КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ
Тимошкина Н.Н., Водолажский Д.И., Миташок И.С., Кабанов С.Н., Калабанова Е.А., Жуженко И.А., Снежко Т.А., Попова И.Л., Владимирова Л.Ю. 138

ОЦЕНКА ВКЛАДА ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ СЕМЕЙСТВ МЕТИЛТРАНСФЕРАЗ *(DNMT)* И МЕТИЛДИОКСИГЕНАЗ *(TET)* В ВОЗРАСТАНИЕ РИСКА РАЗВИТИЯ СПОРАДИЧЕСКИХ ФОРМ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
Снытков Е.В., Кипень В.Н., Мельнов С.Б. 139

МОЛЕКУЛЯРНО-ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОПУХОЛЕЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ – ВКЛАД ГЕНОВ *DNMT1, DNMT3A* И *TET1*
Снытков Е.В., Кипень В.Н., Мельнов С.Б. 140

РОЛЬ МЕЖГЕННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ФОРМИРОВАНИИ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К СПОРАДИЧЕСКОМУ РАКУ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (НА ПРИМЕРЕ ГЕНОВ *DNMT1, DNMT3A* И *TET1)*
Снытков Е.В., Кипень В.Н., Мельнов С.Б. 141

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НЕАЛЛЕЛЬНЫХ ГЕНОВ В ФОРМИРОВАНИИ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К СПОРАДИЧЕСКОМУ РАКУ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (НА ПРИМЕРЕ ГЕНОВ СЕМЕЙСТВА ЦИТОХРОМА Р450 – *CYP1B1, CYP2D6, CYP1A1)*
Смольник Н.С., Кипень В.Н., Мельнов С.Б. 142

ЧАСТОТА РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ПОЛИМОРФНОГО ВАРИАНТА p.P34S (rs1065852) ГЕНА *CYP2D6* СРЕДИ ПАЦИЕНТОВ СО СПОРАДИЧЕСКИМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ИЗ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
Смольник Н.С., Кипень В.Н., Мельнов С.Б. 143

ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ И ПРОГНОСТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ МУТАЦИОННЫХ ТЕСТОВ ПРИ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ОПУХОЛЯХ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
Зарецкий А.Р.,3, Качко В.А., Платонова Н.М., Ванушко В.Э. 144

ОСОБЕННОСТИ ПОЛИМОРФИЗМА A2455G ГЕНА CYP 1A1 У БОЛЬНЫХ ХМЛ
Каримов Х.Я., Абдурахманова Н.Н., Бобоев К.Т. 145

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА РЕТИНОБЛАСТОМЫ: СОВРЕМЕННЫЙ ПОДХОД
Алексеева Е.А., Бабенко О.В., Козлова В.М., Саакян С.В., Танас А.С., Стрельников В.В., Залетаев Д.В. 146

ВАРИАНТНАЯ РЕАРАНЖИРОВКА МЕЖДУ ХРОМОСОМАМИ 15 И 17 ПРИ ПЕДИАТРИЧЕСКОМ ОПЛ, ВЫЯВЛЕННАЯ ТЕХНИКОЙ GTG-БЕНДИНГА
Ассесорова Ю.Ю., Аланазарова Б.Р., Мустафина Л.К., Бабаханова Н.Н. 147

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА БРЕМЕНИ АЛЛЕЛИ V617F ГЕНА JAK2 МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ У БОЛЬНЫХ С ПОРАЖЕНИЕМ МИЕЛОИДНОГО РОСТКА КРОВЕТВОРЕНИЯ
Бердюгина О.В. 148

ГЕНЫ СИСТЕМЫ РЕПАРАЦИИ: ПОПУЛЯЦИОННЫЕ РАЗЛИЧИЯ НАСЛЕДСТВЕННЫХ РАКОВ ЯИЧНИКОВ И МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, ВЫЯВЛЯЕМЫЕ МЕТОДОМ NGS
Бровкина О.И., Гордиев М.Г., Сакаева Д.Д., Еникеев Р.Ф., Дружков М.О., Шигапова Л.Х., Шагимарданова Е.И., Гусев О.А., Ходырев Д.С., Никитин А.Г. 150

ВЫЯВЛЕНИЕ ДРАЙВЕРНЫХ МУТАЦИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С РАКОМ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
Левина Т.А., Ткачев Г.А., Бодунова Н.А., Кирьянов С.А. 151

АНАЛИЗ АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФНЫХ ЛОКУСОВ rs7766585 И rs741581 С РАЗВИТИЕМ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
Бермишева М.А., Тахирова З.Р., Хуснутдинова Э.К. 153

АНАЛИЗ НАРУШЕНИЙ В ЭКСПРЕССИИ микроРНК ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С РАЗЛИЧНЫМ СТАТУСОМ ПО HER-2/NEU
Гутковская Е.А. 154

КОМПЛЕКС МЕТОДИК, ОСНОВАННЫХ НА ТЕХНОЛОГИИ ПИРОСЕКВЕНИРОВАНИЯ, ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ Ph-НЕГАТИВНЫХ ХРОНИЧЕСКИХ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ НЕОПЛАЗИЙ
Дунаева Е.А., Миронов К.О., Субботина Т.Н., Ольховский И.А., Шипулин Г.А. 155

ГИПЕРМЕТИЛИРОВАНИЕ ПРОМОТОРНЫХ ОБЛАСТЕЙ ГЕНОВ *AMOTL1, ZNF43, ZNF134* И *CHFR* – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ МАРКЕР CIMP+ ОПУХОЛЕЙ ТОЛСТОЙ КИШКИ
Краснов Г.С., Кудрявцева А.В., Мельникова Н.В., Бениаминов А.Д., Дмитриев А.А. 157

ВЫЯВЛЕНИЕ И КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА СОМАТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ В 12 ЭКЗОНЕ ГЕНА JAK2 МЕТОДОМ ПИРОСЕКВЕНИРОВАНИЯ
Дунаева Е.А., Субботина Т.Н., Миронов К.О., Ольховский И.А., Шипулин Г.А. 158

ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФИЗМА ТРОМБОЦИТАРНОГО РЕЦЕПТОРА КОЛЛАГЕНА С РАЗВИТИЕМ ХМН
Шайхутдинова Р.В., Субботина Т.Н., Кочмарева Г.Ю., Серова Е.А., Васильев Е.В., Михалёв М.А., Ольховский И.А. 159

ОСОБЕННОСТИ ПОЛИМОРФИЗМА C3435T ГЕНА MDR1 ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ МИЕЛОЛЕЙКОЗЕ
Каримов Х.Я., Абдурахманова Н.Н., Мохаммад А.Д., Эгамова С.К., Икрамов О.А., Маликова Н.Н., Бобоев К.Т. 161

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ микроРНК У ПАЦИЕНТОВ СО СВЕТЛОКЛЕТОЧНОЙ ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМОЙ
Климентова Е.А., Гилязова И.Р., Кунсбаева Г.Б., Султанов И.Р., Измайлов А.А., Павлов В.Н., Хуснутдинова Э.К. 161

АНАЛИЗ ТРОМБОГЕННЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМИ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫМИ НЕОПЛАЗМАМИ
Кочмарева Г.Ю., Субботина Т.Н., Шайхутдинова Р.В., Васильев Е.В., Михалёв М.А., Азаренко Г.Н., Осадчая М.Г., Смелянская М.Г., Ольховский И.А. 162

АЛЛЕЛИ AH8. ГАПЛОТИПА ПОВЫШАЮТ ОБЩУЮ ВЫЖИВАЕМОСТЬ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
Маливанова Т.Ф., Осташкин А.С., Кретова Е.Ю., Мазуренко Н.Н. 164

МАРКЕРЫ МЕТИЛИРОВАНИЯ И ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА У ДЕТЕЙ
Руденко В.В., Казакова С.А., Танас А.С., Попа А.В., Немировченко В.С., Кузнецова Е.Б., Залетаев Д.В., Стрельников В.В. 165

УРОВЕНЬ ЛИГАНДОВ РЕЦЕПТОРА NKG2D СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННЫХ МОЛЕКУЛ ULBP В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ
Абакушина Е.В., Абакушин Д.Н., Пасова И.А., Гельм Ю.В., Каприн А.Д. 166

ТЕХНОЛОГИЯ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОГО НАЗНАЧЕНИЯ НЕОАДЪЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ БОЛЬНЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
Литвяков Н.В., Казанцева П.В., Цыганов М.М., Ибрагимова М.К., Слонимская Е.М., Чердынцева Н.В. 167

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ *TLR2* (Arg753Gln) У БОЛЬНЫХ ПРОЛИФЕРАТИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ И РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ЗАБАЙКАЛЬСКОМ КРАЕ
Марковский А.В., Страмбовская Н.Н. 168

ПОЛИМОРФИЗМ thr399Ile И asp299Gly ГЕНА *tlr4* И УРОВЕНЬ tlr4 В ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ У БОЛЬНЫХ ПРОЛИФЕРАТИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
Марковский А.В., Страмбовская Н.Н., Номоконова В.Б. 169

МАРКЕРЫ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК В ОЦЕНКЕ ОТВЕТА НА НЕОАДЪЮВАНТНУЮ ХИМИОТЕРАПИЮ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
Танас А.С., Сигин В.О., Кекеева Т.В., Кузнецова Е.Б., Поддубская Е.В., Керимов Р.А., Литвяков Н.В., Руденко В.В., Залетаев Д.В., Стрельников В.В. 170

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ РНК ИЗ ОСАДКОВ МОЧИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭКСПРЕССИИ ОПУХОЛЕВЫХ МАРКЕРОВ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
Алатырев А.Г., Кирьянов С.А. 171

АНАЛИЗ АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ ИММУННОГО ОТВЕТА И ВОСПАЛЕНИЯ С РИСКОМ РАЗВИТИЯ РАКА ЯИЧНИКОВ
Мингажева Э.Т., Прокофьева Д.С., Сакаева Д.Д., Хуснутдинова Э.К. 173

ДЕТЕКЦИЯ МУТАЦИЙ ГЕНОВ JAK2 И MPL ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ХРОНИЧЕСКИХ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ
Каримов Х.Я., Мохаммад Дин Асмо, Бобоев К.Т. 174

НЕКОТОРЫЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ СЛИЗИСТЫХ АДЕНОКАРЦИНОМ ТОЛСТОЙ КИШКИ У РОССИЙСКИХ ПАЦИЕНТОВ
Поспехова Н.И., Майновская О.А., Шелыгин Ю.А., Кашина И.Ю., Фролов С.А., Шубин В.П. 174

АНАЛИЗ СТАТУСА МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОВ БЕЛКОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА И ТРАНСМЕМБРАННЫХ РЕЦЕПТОРОВ В НОРМЕ И ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
Симонова О.А., Кузнецова Е.Б., Поддубская Е.В., Керимов Р.А., Танас А.С., Руденко В.В., Стрельников В.В., Залетаев Д.В. 175

ДЕЛЕЦИИ И ТОЧКОВЫЕ МУТАЦИИ ГЕНА ABL1 КАК ПРИЧИНА РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ИНГИБИТОРАМ ТИРОЗИНКИНАЗ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОЛЕЙКОЗОМ
Нестерова О.Ю., Михайлов И.А., Абдуллаев А.О., Сударикова А.Б. 176

РОЛЬ НАРУШЕНИЙ В ГЕНАХ *PALB2* И *RAD51D* В ПАТОГЕНЕЗЕ РАКА ЯИЧНИКОВ
Прокофьева Д.С., Мингажева Э.Т., Сакаева Д.Д., Хуснутдинова Э.К. 177

ПАТТЕРН ЭКСПРЕССИИ микроРНК КАК НОВЫЙ ПЕРСПЕКТИВНЫЙ МАРКЕР РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ И ПРОГНОЗА РИСКА РАЗВИТИЯ РАКА ЖЕЛУДКА КИШЕЧНОГО ТИПА
Рубцов В.А., Поморгайло Е.Г., Федотова Ю.А. 179

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ И ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ РАКА ЛЕГКОГО НА ОСНОВЕ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ДНК И РНК
Рыкова Е.Ю., Запорожченко И.А., Пономарева А.А., Морозкин Е.С., Скворцова Т.Э., Гайнетдинов И.В., Капицкая К.Ю., Власов В.В., Чердынцева Н.В., Ажикина Т.Л., Лактионов П.П. 180

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ СОЧЕТАНИЯ МУТАЦИЙ JAK2V617F И CALR P.K385FS*47 У ПАЦИЕНТА С ПЕРВИЧНО ДИАГНОСТИРОВАННЫМ ХМН
Субботина Т.Н., Николаева П.А., Васильев Е.В., Хоржевский В.А., Горбенко А.С., Абдуллаев А.О., Сударикова А.Б., Ольховский И.А. 181

РОЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ МУТАЦИОННОГО СТАТУСА КИНАЗНОГО ДОМЕНА *BCR-ABL* БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОЛЕЙКОЗОМ ПРИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ТЕРАПИИ ИНГИБИТОРАМИ ТИРОЗИНКИНАЗЫ В УЗБЕКИСТАНЕ
Каримов Х.Я., Султанова Ш.Х., Казакбаева Х.М., Бобоев К.Т. 182

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА GLAD-ПЦР ДЛЯ АНАЛИЗА МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОВ-ОНКОМАРКЕРОВ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА
Евдокимов А.А., Нетесова Н.А., Сметанникова Н.А., Абдурашитов М.А., Акишев А.Г., Малышев Б.С., Давидович Е.С., Федотов В.В., Кузнецов В.В., Карпов А.Б., Дегтярев С.Х. 183

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ СКРИНИНГА КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА
Перфильева А.В., Абдикерим С., Кузовлева Е.Б., Жунусова Г.С., Хусаинова Э.М., Афонин Г.А., Бекманов Б.О., Джансугурова Л.Б. 185

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ МЕЖДУ ОПУХОЛЬЮ И ЕЁ МЕТАСТАЗАМИ В ПЕЧЕНИ ПРИ МЕТАСТАТИЧЕСКОМ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ
Шубин В.П., Пономаренко А.А., Шелыгин Ю.А., Кашина И.Ю., Майновская О.А., Рыбаков Е.Г., Фролов С.А., Поспехова Н.И., Цуканов А.С. 186

ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ГЕКСОКИНАЗ И ЕНОЛАЗ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
Кудрявцева А.В., Пудова Е.А., Дмитриев А.А., Федорова М.С., Садритдинова А.Ф., Краснов Г.С., Снежкина А.В. 187

АНАЛИЗ КЛИНИЧЕСКОГО ЭКЗОМА РАКА ЖЕЛУДКА
Кекеева Т.В., Хашимов Л.Х., Лядов В.К., Танас А.С., Андреева Ю.Ю., Завалишина Л.Э., Поддубная И.В., Стрельников В.В., Залетаев Д.В., Франк Г.А. 188

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ИММУННОГО ОТВЕТА И АКТИВНОСТИ СЫВОРОТОЧНОЙ ТИМИДИНКИНАЗЫ В ДЕБЮТЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ И МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ
Назарова Е.Л., Шардаков В.И., Наговицина А.С., Зотина Е.Н., Докшина И.А., Крюкова М.Г. 188

АНАЛИЗ ЧАСТОТЫ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ У ПАЦИЕНТОВ С ПЛОСКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ РОТОВОЙ ПОЛОСТИ
Голуб Е.В., Полькин В.В., Михайлова Г.Ф., Медведев В.С. 189

КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПАПИЛЛЯРНОГО РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ НАЛИЧИИ МУТАЦИИ В «ГОРЯЧЕЙ ТОЧКЕ» 15 ЭКЗОНА ГЕНА *BRAF*
Маньковская С.В., Фридман М.В. 190

ДНК-МАРКЕРЫ В КРОВИ ПРИ РАКЕ ЛЕГКОГО: ИЗМЕНЕНИЕ СТАТУСА МЕТИЛИРОВАНИЯ LINE-1 В ОТВЕТ НА ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ ЛЕЧЕНИЕ
Пономарева А.А., Добродеев А.Ю., Бондарь А.А., Чердынцева Н.В., Завьялов А.А., Тузиков С.А., Власов В.В., Лактионов П.П., Рыкова Е.Ю. 192

ОСОБЕННОСТИ АЛЛЕЛЬНОГО ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ФЕРМЕНТОВ МЕТИОНИНОВОГО И ФОЛАТНОГО ЦИКЛОВ У БОЛЬНЫХ МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ И ОСТРЫМ МИЕЛОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ
Сидорова Ж.Ю., Кострома И.И., Дрижун Ю.С., Свитина С.П., Керус Е.В., Щеглова К.А., Грицаев С.В., Капустин С.И 193

АНАЛИЗ МУТАЦИЙ ГЕНОВ *BRAF* И *NRAS* ПРИ МЕТАСТАТИЧЕСКОЙ МЕЛАНОМЕ КОЖИ
Шинкаркина А.П., Конова М.В., Новиков Н.Ю., Двинских Н.Ю., Мозеров С.А. 194

АБЕРРАНТНОЕ МЕТИЛИРОВАНИЕ РЯДА ГЕНОВ ХРОМОСОМЫ 3(3P), ВКЛЮЧАЮЩЕЕСЯ В ПАТОГЕНЕЗ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
Рябчиков Д.А., Челышева Д.С., Логинов В.И., Бурденый А.М., Пронина И.В., Брага Э.А., Чхиквадзе Н.В., Воротников И.В., Казубская Т.П., Сельчук В.Ю 195

ВОЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ВЫСОКОТЕХНОЛОГИЧНЫХ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В КЛИНИЧЕСКОЙ ОНКОЛОГИИ
Немцова М.В. 196

ДИАГНОСТИКА НАСЛЕДСТВЕННЫХ ФОРМ ЗАБОЛЕВАНИЯ САРКОМАМИ И ПЕРВИЧНО-МНОЖЕСТВЕННЫМИ НЕОПЛАЗИЯМИ У ДЕТЕЙ
КазубскаяТ.П., Козлова В.М., Стрельников В.В., Поспехова Н.И., Кондратьева Т.Т., Михайлова С.М., Соколова И.Н., Трофимов Е.И. 197

ДИСБАЛАНС АДГЕЗИОННОЙ И ТРАНСКРИПЦИОННОЙ ФУНКЦИЙ β-КАТЕНИНА В КЛЕТКАХ ТИРЕОИДНОГО ЭПИТЕЛИЯ ПРИ УЗЛОВОЙ ПАТОЛОГИИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
Исаева А.В., Зима А.П., Васильева О.А., Саприна Т.В., Прохоренко Т.С., Березкина И.С., Касоян К.Т., Шабалова И.П., Новицкий В.В. 198

НОВЫЙ ЭФФЕКТИВНЫЙ СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ СВОБОДНО ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ ДНК ИЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ И МОЧИ
Ткачев Г.А., Левина Т.А., Кирьянов С.А. 199

ПРОФИЛЬ ЭКСПРЕССИИ микроРНК ПРИ МЕЛАНОМЕ КОЖИ
Якимова М.В., Смирнов С.Ю., Пашкевич А.М., Усович Т.О., Субоч Е.И. 200

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *PCA3* И *TMPRSS2:ERG* В ОСАДКЕ МОЧИ ПРИ АДЕНОКАРЦИНОМЕ И ДРУГИХ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЯХ В ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЕ
Михайленко Д.С., Жинжило Т.А., Ефремов Г.Д., Григорьева М.В., Сивков А.В., Беляндинов М.Р., Немцова М.В. 201

КОМБИНАЦИИ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА
Тихонов А.А., Бутвиловская В.И., Савватеева Е.Н., Рагимов А.А., Салимов Э.Л., Сидоров Д.В., Черниченко М.А., Рубина А.Ю. 201

ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ РЯДА ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ С РИСКОМ РАЗВИТИЯ РАКА ЖЕЛУДКА В РЕСПУБЛИКЕ БАШКОРТОСТАН
Юсупова Л.Ф., Ямангулова Н.Р., Нургалиева А.Х., Мунасыпов Ф.Р., Хуснутдинов Ш.М., Хуснутдинова Э.К. 202

АНАЛИЗ ВЗАИМОСВЯЗИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СЕМЕЙСТВА GST И РАННЕГО ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ У ПАЦИЕНТОК С ОТЕЧНО-ИНФИЛЬТРАТИВНЫМ И ПЕРВИЧНО-ДИССЕМИНИРОВАННЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
Третьяк И.В., Костюк С.А., Руденкова Т.В., Демидчик Ю.Е., Симирский В.В. 203

НАРУШЕНИЯ ГЕНОВ ТЯЖЕЛЫХ ЦЕПЕЙ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЦИТАРНЫМ ЛЕЙКОЗОМ, ВЫЯВЛЯЕМЫЕ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ IN SITU ГИБРИДИЗАЦИИ КЛЕТОК
Шкаврова Т.Г., Михайлова Г.Ф., Голуб Е.В., Цепенко В.В. 205

РОЛЬ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В ПРОГНОЗЕ В-КЛЕТОЧНОГО ХРОНИЧЕСКОГО ЛИМФОЛЕЙКОЗА
Каримов Х.Я., Эгамова С.К., Маликова Н.Н., Бобоев К.Т. 206

СОМАТИЧЕСКИЕ МУТАЦИИ ГЕНА *KRAS* У ПАЦИЕНТОВ С НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО, ПРОЖИВАЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ БЕЛАРУСИ
Щаюк А.Н., Михаленко Е.П., Крупнова Э.В., Шепетько М.Н., Чеботарёва Н.В. 206

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ *FLT1* И *KDR* В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МУТАЦИОННОГО СТАТУСА ГЕНА *VHL*
Жинжило Т.А., Михайленко Д.С., Колпаков А.В., Кекеева Т.В., Стрельников В.В., Немцова М.В., Кушлинский Н.Е. 207

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ БИОТРАНСФОРМАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ И ФОЛАТНОГО ЦИКЛА У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ
Мякошина Л.А., Поляков А.С., Колюбаева С.Н., Киссель А.В., Викторова Н.А., Титова А.А., Иванов А.М. 208

РАЗДЕЛ 4. ИНФЕКЦИИ С ВОЗДУШНО-КАПЕЛЬНЫМ, КОНТАКТНО-БЫТОВЫМ МЕХАНИЗМОМ ПЕРЕДАЧИ ВОЗБУДИТЕЛЯ И ИХ ОСЛОЖНЕНИЯ

АНТИГЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ИММУННЫХ КОМПЛЕКСОВ В КРОВИ ДЕТЕЙ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ
Горина Л.Г., Гончарова С.А., Раковская И.В., Бархатова О.И., Крылова Н.А. 210

ВЫЯВЛЕНИЕ МУТАЦИЙ УСТОЙЧИВОСТИ К МАКРОЛИДАМ В ГЕНЕ 23S рРНК *Mycoplasma pneumoniae* У ГОСПИТАЛИЗИРОВАННЫХ ВОЕННОСЛУЖАЩИХ С ПНЕВМОНИЕЙ
Эйдельштейн И.А., Романов А.В., Эйдельштейн М.В., Зайцев А.А., Раковская И.В., Антипушина Д.Н., Путков С.Б., Акимова С.В., Бархатова О.И., Козлов Р.С. 211

СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ И СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ РЕСПИРАТОРНОЙ АДЕНОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ
Агеева М.Р., Яцышина С.Б., Львов Н.И. 212

РОЛЬ АДЕНОВИРУСОВ В ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ
Агеева М.Р., Яцышина С.Б., Петухова Е.В., Паркина Н.В., Шипулина О.Ю. 213

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ НА БАЗЕ БУЗ ВО «ВОРОНЕЖСКИЙ ОБЛАСТНОЙ КЛИНИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ПРОФИЛАКТИКИ И БОРЬБЫ СО СПИД»
Донская М.А., Попович Ю.С., Ситник Т.Н. 214

ВАЛИДАЦИЯ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ПЦР-ДИАГНОСТИКИ ДИФТЕРИИ
Яцышина С.Б., Елькина М.А., Селезнева Т.С., Щелокова В.Г., Коновалова К.А., Вайтович М.А., Краус О.А., Липатова Л.А., Белоусова Л.В., Куземцева С.В., Кобяков А.И. 215

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА ГРИППА A/H1N1pdm09 И A/H3N2
Трушакова С.В., Абрамов Д.Д., Краснослободцев К.Г., Мукашева Е.А., Гарина Е.О., Колобухина Л.В., Бурцева Е.И. 216

РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДНК *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* И *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ (ПЦР) С ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ
Елькина М.А., Яцышина С.Б., Рентеева А.Н., Томская Ю.О. 217

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ В ДИАГНОСТИКЕ РЕСПИРАТОРНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ
Маркарян А.Ю., Поляков В.С., Артебякин С.В., Вялых И.В., Бурнатова Е.Н., Рябухин И.В., Григорьева Ю.В., Мальчиков И.А. 218

ВОЗРАСТАНИЕ ВИРУЛЕНТНОСТИ ПАНДЕМИЧЕСКИХ ВИРУСОВ H1N1/2009 ПРИ АДАПТАЦИИ К МЫШАМ BALB/C
Ломакина Н.Ф., Садыкова Г.К., Боравлёва Е.Ю., Прилипов А.Г., Гамбарян А.С. 219

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ И ВИРУСОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА H5N8, ВЫДЕЛЕННЫХ ВО ВРЕМЯ ВСПЫШЕК В РОССИИ В 2016 Г.
Марченко В.Ю., Суслопаров И.М., Гончарова Н.И., Святченко С.В., Колосова Н.П., Евсеенко В.А., Гудымо А.С., Михеев В.Н., Максютов Р.А., Рыжиков А.Б. 221

МЕТОДЫ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИИ ВИРУСА ГЕРПЕСА ЧЕЛОВЕКА 6 ТИПА У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМИ РЕСПИРАТОРНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ
Мелёхина Е.В., Музыка А.Д., Петухова Е.В., Лысенкова М.Ю., Сильвейстрова О.Ю., Ракчеева О.В., Домонова Э.А., Шипулина О.Ю., Чугунова О.Л., Горелов А.В., Барыкин В.И. 222

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ *NEISSERIA MENINGITIDIS,* ВЫЗВАВШИХ ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫЕ ФОРМЫ МЕНИНГОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ НА ТЕРРИТОРИИ МОСКВЫ В 2016 ГОДУ
Миронов К.О., Животова В.А., Матосова С.В., Шипулина О.Ю., Маркелов М.Л., Гоптарь И.А., Валдохина А.В., Пимкина Е.В., Королева М.А., Королева И.С., Нагибина М.В., Венгеров Ю.Я., Кулешов К.В., Платонов А.Е., Шипулин Г.А. 223

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТА *NEISSERIA MENINGITIDIS,* ВЫЗВАВШЕГО ЛЕТАЛЬНУЮ МЕНИНГОКОККОВУЮ ИНФЕКЦИЮ У ПАЦИЕНТА С АТИПИЧНЫМ ГЕМОЛИТИКО-УРЕМИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ, НАХОДИВШЕГОСЯ НА ТЕРАПИИ ПРЕПАРАТОМ «ЭКУЛИЗУМАБ»
Платонов А.Е., Миронов К.О., Матосова С.В., Дадалова О.Б., Зенин И.В., Грибовская Н.В., Симакова А.И., Королева М.А., Королева И.С., Шипулин Г.А. 225

АНАЛИЗ ОСОБЕННОСТЕЙ ЭКСПРЕССИИ ЦИТОКИНОВ У ПАЦИЕНТОВ С ОРЗ
Клотченко С.А., Плотникова М.А., Барановская И.Л., Егорова М.А., Дроздова Ю.В., Васин А.В. 227

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГРИППА В Г. УФЕ В 2015 - 2016 ГОДАХ
Мурзабаева Р.Т., Валишин Д.А., Мамон А.П., Назырова Е.А., Арсланова Л.В., Асадуллина О.А., Мурзабулатова И.Х. 229

ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ *ВИРУСА ГРИППА A(H1N1pdm09),* ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ФАТАЛЬНЫХ СЛУЧАЕВ ЗАБОЛЕВАНИЯ ГРИППОМ ЛЮДЕЙ НА ТЕРРИТОРИИ РФ В ЭПИДЕМИЧЕСКОМ СЕЗОНЕ 2015-2016
Святченко С.В., Дурыманов А.Г., Суслопаров И.М., Колосова Н.П., Гончарова Н.И., Марченко В.Ю., Шиповалов А.В., Епанчинцева А.В., Ильичева Т.Н., Михеев В.Н., Рыжиков А.Б. 230

ОПТИМИЗАЦИЯ АЛГОРИТМА ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ОРВИ/ГРИППА С ПРИМЕНЕНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДА
Вершинина М.Г., Калугина Е.Ю., Кухтина Н.Б., Пак И.В. 231

ЦИТОКИНЫ ПРИ ГРИППЕ
Оспельникова Т.П., Морозова О.В., Андреева С.А., Исаева Е.И., Колодяжная Л.В., Ершов Ф.И. 232

РОЛЬ ПЦР-ДИАГНОСТИКИ ГРИППОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ В СЕЗОНЕ 2015-2016 ГГ.
Моисеева Т.И., Трушакова С.В., Мукашева Е.А., Краснослободцев К.Г., Гарина Е.О., Кружкова И.С., Вартанян Р.В., Бурцева Е.И. 233

ПЦР-ДИАГНОСТИКА ВИРУСОВ ГРИППА И ОРВИ
Мусаева Т.Д., Резниченко Н.А., Писарева М.М., Бузицкая Ж.В., Комиссаров А.Б. 234

ПРИМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКОГО И ИММУНОХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО МЕТОДОВ В ДИАГНОСТИКЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ВИРУСОМ ЭПШТЕЙНА – БАРР
Мысливцева Г.А., Рудая Я.А., Бондарева В.П., Петровская И.В., Гордиенко И.В. 235

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ВИРУСОВ ГРИППА *A(H3N2),* ОБНАРУЖЕННЫХ В ПЕРИОД С 2013 ПО 2017 ГОД, В РОССИИ
Рентеева А.Н., Яцышина С.Б., Валдохина А.В., Елькина М.А., Томская Ю.О., Агеева М.Р., Буланенко В.П., Шипулин Г.А., авторы ЦГиЭ Роспотребнадзора 237

РОЛЬ БОКАВИРУСА В ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ У ДЕТЕЙ
Сивец Н.В., Шмелева Н.П., Лапо Т.П., Грибкова Н.В., Чекан В.Л., Стринкевич Э.А. 239

ХАРАКТЕРИСТИКА СЕРОГРУППОВОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ *NEISSERIA MENINGITIDIS,* ВЫЗВАВШИХ ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫЕ ФОРМЫ МЕНИНГОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ НА ТЕРРИТОРИИ МОСКВЫ В 2016 ГОДУ
Матосова С.В., Миронов К.О., Смирнова В.С., Шипулина О.Ю., Нагибина М.В., Чернышов Д.В., Ченцов В.Б., Смирнова Т.Ю., Солдатова И.А., Венгеров Ю.Я., Платонов А.Е., Шипулин Г.А. 240

СПЕКТР ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСТРЫХ СРЕДНИХ ОТИТОВ И ПЕРСПЕКТИВЫ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ
Маянский Н.А., Яцышина С.Б., Катосова Л.К., Алябьева Н.М., Куличенко Т.В. 241

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ДИАГНОСТИКИ ГРИППА И ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ В РЕСПУБЛИКЕ ДАГЕСТАН (ПО МАТЕРИАЛАМ ЭПИДЕМИИ 2015-2016 ГОДОВ)
Омариева Э.Я., Милихина А.В. 241

КЛОНАЛЬНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ ПНЕВМОКОККОВ СЕРОТИПА 19А В РОССИИ (2002-2013 ГГ.)
Маянский Н.А., Лазарева А.В., Алябьева Н.М., Савинова Т.А., Козлов Р.С. 243

АНТИГЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АДЕНОВИРУСОВ, ВЫЗВАВШИХ ЗАБОЛЕВАНИЯ СРЕДИ ВОЕННОСЛУЖАЩИХ
Тимошичева Т.А., Амосова И.В., Егорова А.А., Бузицкая Ж.В., Львов Н.И. 244

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА *NEISSERIA MENINGITIDIS И STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE,* СОДЕРЖАЩИХСЯ В СПИННОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ БОЛЬНЫХ МЕНИНГИТОМ
Чагарян А.Н., Иванчик Н.В. 245

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ *LEGIONELLA PNEUMOPHILA,* ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ КРЫМ
Портенко С.А., Осина Н.А., Краснов Я.М., Гусева Н.П., Шарапова Н.А. 246

ТИП ИММУННОГО ОТВЕТА КАК ФАКТОР ТЯЖЕЛОГО И ОСЛОЖНЕННОГО ТЕЧЕНИЯ ГРИППА
Головачёва Е.Г., Афанасьева В.С., Афанасьева О.И., Осидак Л.В., Образцова Е.В., Королева Е.Г. 247

ВЫЯВЛЕНИЕ СЛУЧАЕВ ИНФИЦИРОВАНИЯ ЛЮДЕЙ РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНЫМ ВИРУСОМ ЧЕЛОВЕКА В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ В 2013-2016 ГОДАХ
Синцова К.С., Мусаева Т.Д., Писарева М.М. 248

СЕРОТИПОВОЙ СОСТАВ И ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ НАЗОФАРИНГЕАЛЬНЫХ ИЗОЛЯТОВ *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE,* ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ДЕТЕЙ ДОШКОЛЬНОГО ВОЗРАСТА Г. КАЗАНИ
Баязитова Л.Т., Тюпкина О.Ф., Тюрин Ю.А., Чазова Т.А., Зарипова А.З., Исаева Г.Ш. 249

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ БАКТЕРИЙ *P. AERUGINOSA,* ВЫЗЫВАЮЩИХ ХРОНИЧЕСКУЮ ИНФЕКЦИЮ ЛЕГКИХ У БОЛЬНЫХ МУКОВИСЦИДОЗОМ
Шагинян И.А., Аветисян Л.Р., Чернуха М.Ю., Сиянова Е.А., Припутневич Т.В., Трофимов Д.Ю., Гордеев А.В., Кондратьева Е.И., Красовский С.А., Гинцбург А.Л. 250

КОМПЛЕКСНАЯ ДИАГНОСТИКА ВНЕБОЛЬНИЧНЫХ ПНЕВМОНИЙ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ В ХАБАРОВСКОМ КРАЕ В 2016 Г.
Савосина Л.В., Резник В.И., Лебедева Л.А., Жалейко З.П. 251

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНОМА ХОЛОДОАДАПТИРОВАННОГО ШТАММА В/ЛЕНИНГРАД/14/17/55 – РЕЗЕРВНОГО ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ
Крутикова Е.В., Федорова Е.А., Дубровина И.А., Большунова Е.А., Киреева Е.В., Киселева И.В., Руденко Л.Г. 253

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОТОКОЛА ПИРОСЕКВЕНИРОВАНИЯ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОИСХОЖДЕНИЯ ГЕНОВ РЕАССОРТАНТОВ НА ОСНОВЕ РЕЗЕРВНОГО ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ В/ЛЕНИНГРАД/14/17/55
Федорова Е.А., Крутикова Е.В., Киселева И.В., Руденко Л.Г. 254

ЭТИОЛОГИЯ ТЯЖЕЛОЙ ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИИ У ВЗРОСЛЫХ В РФ: ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ МНОГОЦЕНТРОВОГО ИССЛЕДОВАНИЯ SEPIA
Рачина С.А., Захаренков И.А., Дехнич Н.Н., Бобылев А.А., Иванчик Н.В., Козлов Р.С., Яцышина С.Б., Елькина М.А., Лебедева М.С., Портнягина У.С., Гордеева С.А., Якунина М.А. 256

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ «ФЛУ-ГЕН» И «ОРВИ-ГЕН» ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ГРИППА И ОРВИ У ДЕТЕЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ
Шмелёва Н.П., Сивец Н.В., Грибкова Н.В., Лапо Т.П. 257

ПЦР В АЛГОРИТМЕ ДИАГНОСТИКИ КОКЛЮШНОЙ И ПАРАКОКЛЮШНОЙ ИНФЕКЦИИ
Яцышина С.Б., Прадед М.Н., Малинина С.В. 258

НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ В ОПРЕДЕЛЕНИИ ЭТИОЛОГИИ ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИИ У ДЕТЕЙ
Яцышина С.Б., Спичак Т.В., Ким С.С., Воробьева Д.А., Елькина М.А., Горелов А.В. 259

РАЗДЕЛ 5. МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ИЗУЧЕНИИ ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГРУПП-СПЕЦИФИЧНЫХ ПРАЙМЕРОВ НА ГЕН 16S рДНК ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ МАРКЕРНЫХ ФИЛОТИПОВ В КИШЕЧНОМ МИКРОБИОМЕ ПОДРОСТКОВ С ОЖИРЕНИЕМ
Белькова Н.Л., Немченко У.М., Кравцова О.В., Мандзяк Т.В., Погодина А.В., Рычкова Л.В. 261

ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ ЭНТЕРОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В РЕСПУБЛИКЕ БАШКОРТОСТАН
Галиева А.Т., Хунафина Д.Х., Валишин Д.А., Шайхуллина Л.Р., Бурганова А.Н., Асадуллина О.А., Мурзабулатова И.Х. 262

ОТКРЫТАЯ БАЗА ДАННЫХ СУБВИДОВОГО ТИПИРОВАНИЯ САЛЬМОНЕЛЛ НА ТЕРРИТОРИИ РФ
Гусева А.Н., Рожнова С.Ш., Христюхина О.А., Кулешов К.В., Шипулин Г.А. 263

ОСОБЕННОСТИ ЦИРКУЛЯЦИИ НОРОВИРУСА ГЕНОТИПА GII.P17_GII.7 В НИЖЕГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ В 2016 ГОДУ
Епифанова Н.В., Калашникова Н.А., Зверев В.В., Сашина Т.А., Кашников А.Ю., Хохлова Н.М., Новикова Н.А. 264

ИЗМЕНЕНИЕ СОСТАВА МИКРОФЛОРЫ ПРИ РАКЕ ЖЕЛУДКА
Кит О.И., Зыкова Т.А., Геворкян Ю.А., Легостаев В.М., Богомолова О.А. 265

ПРЕВАЛИРУЮЩИЕ КЛОНЫ ШТАММОВ *S. TYPHI* НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ
Кафтырева Л.А., Егорова С.А., Макарова М.А. 266

ПРАКТИЧЕСКАЯ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ REAL-TIME ДЕТЕКЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ВИРУСНЫХ ДИАРЕЙ
Гусева А.Н., Веселова О.А., Курочкина Д.Е., Шипулин Г.А. 267

РЕЗУЛЬТАТЫ МОНИТОРИНГА АНТИГЕННЫХ ТИПОВ РОТАВИРУСОВ ГРУППЫ А НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В ПЕРИОД 2011-2015 ГГ.
Зайцева Е.В., Ольнева Т.А., Кулешов К.В., Шипулин Г.А. 268

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНОВ ИНГИБИТОРОВ ЛИЗОЦИМА КАК МАРКЕРОВ ПЕРСИСТЕНТНОГО ПОТЕНЦИАЛА ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ
Андрющенко С.В. 269

СЕЗОННЫЕ И ТЕРРИТОРИАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ РОТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ В РФ В 2012-2015 ГГ.
Ольнева Т.А., Кулешов К.В., Подколзин А.Т., Шипулин Г.А. 270

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ОСНОВНЫХ СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ *HELICOBACTER PYLORI*
Казакова Л.А., Короткова А.Ф., Валиулин И.Р., Елекова Е.Ю., Болтунова О.В., Винчковская Е.Е. 270

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИГЕНОВ НОРОВИРУСОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РФ
Сакалкина Е.В., Паркина Н.В., Ольнева Т.А., Тагирова З.Г., Шипулин Г.А. 271

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИГЕНОВ РОТАВИРУСОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РФ
Гусева А.Н., Веселова О.А., Курочкина Д.Е., Шипулин Г.А. 273

ВЫЯВЛЕНИЕ ДНК ВИРУСОВ СЕМЕЙСТВА *HERPESVIRIDAE* У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ГАСТРИТОМ И КИШЕЧНОЙ МЕТАПЛАЗИЕЙ
Филиппова Ю.Н., Андреев А.А., Самусенко И.А., Михайлова И.А. 274

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ЭПИДЕМИОЛОГИИ ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ НА ОСНОВЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКОГО ИЗУЧЕНИЯ
Жалейко З.П., Резник В.И., Присяжнюк Е.Н., Лебедева Л.А., Савосина Л.В., Исаева Н.В., Харин В.Е. 275

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА СМЕШАННЫХ И СОЧЕТАННЫХ ФОРМ РЕСПИРАТОРНЫХ И КИШЕЧНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ У ДЕТЕЙ
Петруша О.А., Мескина Е.Р., Ушакова А., Целипанова Е., Медведева Е., Ергучева И.Д., Файзулоев Е.Б., Зверев В.В., Никонова А.А. 276

КОНСТЕЛЛЯЦИИ ГЕНОВ VP7, VP4, VP6 И NSP4 В НИЖЕГОРОДСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ РОТАВИРУСОВ ГРУППЫ А
Сашина Т.А., Морозова О.В., Епифанова Н.В., Зверев В.В., Новикова Н.А. 278

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ШТАММОВ ДИАРЕЕГЕННЫХ *E.COLI*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ ЛЕЧЕБНЫХ УЧРЕЖДЕНИЙ И ДЕКРЕТИРОВАННОГО КОНТИНГЕНТА НА ТЕРРИТОРИИ СВЕРДЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ
Есаулкова А.Ю., Дурасова А.Л., Егорова Е.А. 279

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В ЭПИДНАДЗОРЕ ЗА ЭНТЕРОВИРУСНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ В ХАБАРОВСКОМ КРАЕ
Резник В.И., Савосина Л.В., Лебедева Л.А., Жалейко З.П. 280

ДИАГНОСТИКА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОКИ МЕТОДОМ ПЦР У ПАЦИЕНТОВ ИНФЕКЦИОННЫХ ОТДЕЛЕНИЙ МАУ «ГКБ № 40» Г. ЕКАТЕРИНБУРГА В 2016 Г.
Цыганко Е.В., Трусова И.В. 281

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТИПИРОВАНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ В СТАВРОПОЛЬСКОМ КРАЕ В 2016 Г.
Чекрыгина Е.В., Волынкина А.С., Котенев Е.С., Васильева О.В., Лисицкая Я.В., Савельев В.Н. 283

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ В СТРУКТУРЕ ОПЕРАТИВНОГО ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ НАСЕЛЕНИЯ САЛЬМОНЕЛЛЕЗОМ
Шубин Ф.Н., Раков А.В., Кузнецова Н.А. 284

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ (ПЦР) ПРИ РАСШИФРОВКЕ ГРУППОВЫХ ВСПЫШЕК КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ В САО ГОРОДА МОСКВЫ
Бурханов Р.А., Черкасова Л.В., Пчелкина Е.В., Темирлиева Р.О., Блинникова А.Ю., Пасашкова Ю.А., Островская Н.А. 285

РАЗДЕЛ 6. СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ И ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР ЗА ОСОБО ОПАСНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ

СОЗДАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА *ESCHERICHIA COLI* – ПРОДУЦЕНТА ХОЛЕРНОГО ИММУНОГЕННОГО БЕЛКА TCPA
Клавдиенко Е.В., Тучков И.В., Полунина Т.А., Гусева Н.П. 287

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ И ПАРАМЕТРОВ СВЯЗЫВАНИЯ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ДНК-АПТАМЕРОВ С HC50 ТЯЖЕЛОЙ ЦЕПЬЮ НЕЙРОТОКСИНА БОТУЛИЗМА ТИПА А *CLOSTRIDIUM BOTULINUM* И IV ДОМЕНОМ ПРОТЕКТИВНОГО АНТИГЕНА *BACILLUS ANTHRACIS* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ СЕКВЕНИРОВАНИЯ, ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСА И МИКРОКАЛОРИМЕТРИИ
Зенинская Н.А., Колесников А.В., Козырь А.В., Рябко А.К., Марьин М.А., Шемякин И.Г., Дятлов И.А. 288

МЕТОД АНАЛИЗА ЕДИНИЧНЫХ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ *BACILLUS ANTHRACIS* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИНИСЕКВЕНИРОВАНИЯ И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ
Еременко Е.И., Воропаев В.В., Котенева Е.А., Рязанова А.Г., Аксенова Л.Ю., Цыганкова О.И., Куличенко А.Н. 289

SENSITIVE MULTIPLEX REAL-TIME RT-PCR ASSAY FOR THE DETECTION OF FILOVIRUSES
Dedkov V.G., Safonova M.V., Bodnev S.A., Pyankov O.V., Agafonov A.P., Maleev V.V., Shipulin G.A. 290

АНАЛИЗ СТАБИЛЬНОСТИ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ВЫСОКОВИРУЛЕНТНЫМИ ИЗОЛЯТАМИ *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI*
Леденева М.Л., Савченко С.С., Ткаченко Г.А., Шпак И.М., Устинов Д.В., Плеханова Н.Г. 292

ВЕРОЯТНОСТЬ МУТАЦИЙ В САЙТАХ ГЕМАГГЛЮТИНИНА ГРИППА ПТИЦ H5N1, ВЛИЯЮЩИХ НА ПАТОГЕННОСТЬ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ, ЗАВИСИТ ОТ КОНТЕКСТА В ДРУГИХ САЙТАХ
Сафина К.Р., Базыкин Г.А., Неверов А.Д. 293

SEQANALYZER – ПРОГРАММА ДЛЯ АНАЛИЗА ДАННЫХ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ШТАММОВ *Vibrio cholerae*
Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Писанов Р.В., Олейников И.П. 294

АНАЛИЗ ГИПЕРВАРИАБЕЛЬНЫХ УЧАСТКОВ ГЕНОМОВ СУБПОПУЛЯЦИЙ *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI 110,* ВЫЯВЛЕННЫХ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ *IN VIVO* И *IN VITRO*
Устинов Д.В., Антонов А.С., Савченко С.С., Шпак И.М. 295

ПОЛНОГЕНОМНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ ШТАММОВ *V. CHOLERAE* О1 ЭЛЬ-ТОР ОГАВА, ВЫДЕЛЕННЫХ ВО ВРЕМЯ ВСПЫШКИ ХОЛЕРЫ В Г. МАРИУПОЛЬ В 2011 ГОДУ
Кулешов К.В., Писаренко С.В., Ковалев Д.А., Тихонов С.Н., Савельева И.В., Савельев В.Н., Василиева О.В., Зинич Л.С., Пидченко Н.Н., Куличенко А.Н., Шипулин Г.А. 296

РАЗРАБОТКА СПОСОБА ВЫЯВЛЕНИЯ В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ РНК ВИРУСА БЕШЕНСТВА МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ
Александрова Н.М., Самерханов И.И. 298

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА В ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОМ НАДЗОРЕ ЗА ЧУМОЙ В ГОРНО-АЛТАЙСКОМ ВЫСОКОГОРНОМ ПРИРОДНОМ ОЧАГЕ
Балахонов С.В., Кутырев В.В., Михайлов Е.П., Ярыгина М.Б., Рождественский Е.Н., Базарова Г.Х., Корзун В.М., Остяк А.С., Витязева С.А. 299

АНАЛИЗ ВНУТРИВИДОВОЙ КОНКУРЕНЦИИ В БИОПЛЕНКЕ *Vibrio cholerae* КЛАССИЧЕСКОГО И ЭЛЬТОР БИОВАРОВ С ПОМОЩЬЮ INDEL-МАРКЕРОВ
Водопьянов С.О., Веркина Л.М., Водопьянов А.С., Олейников И.П., Егиазарян Л.А., Титова С.В. 300

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ЭВОЛЮЦИЯ ВИРУСА КРЫМСКОЙ-КОНГО ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ НА ЮГЕ РОССИИ
Волынкина А.С., Лисицкая Я.В., Котенев Е.С., Писаренко С.В., Куличенко А.Н. 301

ВЫЯВЛЕНИЕ SNP-МАРКЕРОВ И КОНСТРУИРОВАНИЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВНУТРИВИДОВОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* В ПЦР С ПОМОЩЬЮ АЛЛЕЛЬ-СПЕЦИФИЧЕСКИХ ЗОНДОВ
Трухачев А.Л., Коновалова Н.В., Васильева Е.А., Кузнецова Д.А., Благодатских К.А., Сочивко Д.Г. 302

ГЛОБАЛЬНАЯ ФИЛОГЕОГРАФИЯ *BRUCELLA MELITENSIS*
Писаренко С.В., Ковалев Д.А., Волынкина А.С., Куличенко А.Н. 303

БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ INDEL-ЛОКУСОВ *Vibrio cholerae*
Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Олейников И.П. 304

РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ ДОТ-ИММУНОАНАЛИЗА ДЛЯ ПАРАЛЛЕЛЬНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ РАЗЛИЧНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ В ФОРМАТЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО МИКРОЧИПА
Киреев М.Н., Уткин Д.В., Шарапова Н.А., Волох О.А. 306

ПОЛНОГЕНОМНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ И КЛАССИФИКАЦИЯ ШТАММОВ *Yersinia pestis* ИЗ ОЧАГОВ СТРАН СНГ И БЛИЖНЕГО ЗАРУБЕЖЬЯ
Ерошенко Г.А., Краснов Я.М., Носов Н.Ю., Кутырев В.В. 306

ИЗУЧЕНИЕ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИХ СВЯЗЕЙ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS*
Трухачев А.Л., Водопьянов А.С., Васильева Е.А., Лебедева С.А., Ракин А.В. 308

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ИЗОФОРМ CAF1 *YERSINIA PESTIS*
Кадникова Л.А., Копылов П.Х., Комбарова Т.И., Соломенцев В.И., Мухина Т.Н., Благодатских С.А., Майская Н.В., Богун А.Г. 309

РЕЗУЛЬТАТЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ РЯДА ПРИРОДНЫХ ШТАММОВ БРУЦЕЛЛ ИЗ ФОНДА ГОСУДАРСТВЕННОЙ КОЛЛЕКЦИИ ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ ФКУЗ РОСНИПЧИ «МИКРОБ»
Касьян Ж.А., Осина Н.А., Альхова Ж.В., Краснов Я.М., Ляшова О.Ю., Осин А.В. 310

ПРИМЕНЕНИЕ ПОСТГЕНОМНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В ИЗУЧЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ НА ПРИМЕРЕ *YERSINIA PESTIS*
Котенева Е.А., Котенев Е.С., Царева Н.С., Калинин А.В., Зайцев А.А., Кот Л.А., Печковский Г.А., Абрамович А.В.....311

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА ПЦР НА БАЗЕ ФКУЗ «КАБАРДИНО-БАЛКАРСКАЯ ПРОТИВОЧУМНАЯ СТАНЦИЯ»
Аванесова Р.С., Белогрудов В.А., Белогрудова Е.И., Власов А.В. 313

АНАЛИЗ ВЗАИМОСВЯЗИ КАНОНИЧЕСКИХ SNP ШТАММОВ *BACILLUS ANTHRACIS* С ИХ ФЕНОТИПИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ И MLVA-ГЕНОТИПАМИ
Цыганкова О.И., Котенева Е.А. 314

МОЛЕКУЛЯРНОЕ ТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ ОСНОВНОГО ПОДВИДА ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ ИЗ ГОРНО-АЛТАЙСКОГО ПРИРОДНОГО ОЧАГА
Краснов Я.М., Ерошенко Г.А., Альхова Ж.В., Яшечкин Ю.И., Гусева Н.П., Шарапова Н.А., Буданова А.А., Балахонов С.В., Кутырев В.В.....315

ПОИСК ФАКТОРОВ, ОТВЕЧАЮЩИХ ЗА ИЗБИРАТЕЛЬНУЮ ВИРУЛЕНТНОСТЬ *YERSINIA PESTIS*
Красильникова Е.А., Копылов П.Х., Шайхутдинова Р.З., Иванов С.А., Дентовская С.В., Анисимов А.П. 316

АНАЛИЗ ICE-ЭЛЕМЕНТА У ТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ УКРАИНЫ В 1994-2010 ГОДАХ
Водопьянов С.О., Пидченко Н.Н., Водопьянов А.С., Олейников И.П., Зинич Л.С., Титова С.В., Тихонов С.Н.....318

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПЦР С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАБОРА РЕАГЕНТОВ «АМПЛИГЕН*BURK-MALLEI/PSEUDOMALLEI*-РВ» ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САПЕ И МЕЛИОИДОЗЕ
Лемасова Л.В., Ткаченко Г.А., Леденева М.Л., Савченко С.С., Плеханова Н.Г. 319

СОЗДАНИЕ МУЛЬТИКАНАЛЬНОЙ ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМЫ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОВ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ В ГЕНОМЕ ШТАММОВ *Vibrio cholerae*
Крицкий А.А., Челдышова Н.Б., Заднова С.П., Смирнова Н.И. 320

ПОИСК И ДОКАЗАТЕЛЬСТВО АТТЕНУИРУЮЩИХ МУТАЦИЙ В ГЕМАГГЛЮТИНИНЕ ВИРУСА ГРИППА H5N1
Ломакина Н.Ф., Садыкова Г.К., Тимофеева Т.А., Боравлёва Е.Ю., Прилипов А.Г., Гамбарян А.С. 322

МОЛЕКУЛЯРНОЕ ТИПИРОВАНИЕ *Vibrio cholerae* В СИСТЕМЕ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА ХОЛЕРОЙ И ИЗУЧЕНИИ ФИЛОГЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ: РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ, ПРОБЛЕМЫ, НАПРАВЛЕНИЯ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ
Миронова Л.В., Пономарева А.С., Хунхеева Ж.Ю., Басов Е.А., Гладких А.С., Феранчук С.И., Бочалгин Н.О., Балахонов С.В. 323

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ ГЕНОМОВ ЭПИДЕМИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ШТАММОВ *Vibrio cholerae* EL TOR, ВЫДЕЛЕННЫХ В СИБИРИ И НА ДАЛЬНЕМ ВОСТОКЕ РФ
Миронова Л.В., Гладких А.С., Пономарева А.С., Феранчук С.И., Басов Е.А., Хунхеева Ж.Ю., Балахонов С.В. 324

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ ГЕНОМА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ХОЛЕРЫ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИЯХ РОССИИ И СОПРЕДЕЛЬНЫХ СТРАН
Монахова Е.В., Писанов Р.В., Титова С.В. 325

СТАНДАРТИЗАЦИЯ И ПОВЫШЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ГЕННОЙ ДИАГНОСТИКИ ХОЛЕРЫ
Найденова Е.В., Осина Н.А., Яшечкин Ю.И., Шарова И.Н. 327

РАЗРАБОТКА СПОСОБОВ ПЦР- И SNP-ТИПИРОВАНИЯ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* СРЕДНЕВЕКОВОГО БИОВАРА ИЗ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ И ЗАРУБЕЖНЫХ СТРАН
Носов Н.Ю., Ерошенко Г.А., Гусева Н.П., Малахаева А.Н., Кутырев В.В. 328

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СПОСОБОВ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ БРУЦЕЛЛЕЗА МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ (ПЦР) С ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ УЧЕТОМ РЕЗУЛЬТАТОВ
Осина Н.А., Касьян Ж.А., Касьян И.А., Казакова Е.С., Степанов А.В. 329

ПРОТЕОМНОЕ КАРТИРОВАНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ
Печковский Г.А., Калинин А.В., Котенева Е.А., Цыганкова О.И., Царева Н.С., Гнусарева О.А. 330

МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ (ПЦР-ДИАГНОСТИКА) ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ ТУЛЯРЕМИИ НА ТЕРРИТОРИИ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ
Романова Л.В., Пичурина Н.Л., Савченко А.П., Бородина Т.Н., Водопьянов С.О., Москвитина Э.А. 331

МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ РЕКИ АНГАРА В ЧЕРТЕ ГОРОДА ИРКУТСКА, АССОЦИИРОВАННЫХ С *Vibrio cholerae*
Пономарева А.С., Гладких А.С., Миронова Л.В., Феранчук С.И., Белькова Н.Л., Балахонов С.В. 332

РАЗРАБОТКА МУЛЬТИЛОКУСНОЙ ПЦР С УЧЕТОМ РЕЗУЛЬТАТОВ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ШТАММОВ ТУЛЯРЕМИЙНОГО МИКРОБА
Сеничкина А.М., Осина Н.А. 334

АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЯ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ *YERSINIA PESTIS* ПРИ ПРОВЕДЕНИИ АНИМАЛИЗАЦИИ НА МОРСКИХ СВИНКАХ
Соломенцев В.И., Кисличкина А.А., Кадникова Л.А., Комбарова Т.И., Платонов М.Е., Благодатских С.А., Майская Н.В., Богун А.Г., Анисимов А.П. 335

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ДИАГНОСТИКИ БРУЦЕЛЛЕЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ
Торопчин М.И., Саяпина Л.В., Малахаева А.Н., Никитюк Н.Ф., Поступайло В.Б. 336

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ ГЕНОМА И ПРОИСХОЖДЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ НЕТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ *Vibrio cholerae* БИОВАРА ЭЛЬ ТОР *ctxA-tcpA+* МЕТОДОМ SNP-ТИПИРОВАНИЯ И ОЦЕНКА ИХ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ С ПОМОЩЬЮ СКОНСТРУИРОВАННОЙ ПЦР-ТЕСТ-СИСТЕМЫ
Агафонова Е.Ю., Краснов Я.М., Щелканова Е.Ю., Смирнова Н.И. 337

ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНОМА ВИРУСА ЗАИР В ПЕРИОД ЭПИДЕМИИ, ВЫЗВАННОЙ ЛИХОРАДКОЙ ЭБОЛА В ЗАПАДНОАФРИКАНСКОМ РЕГИОНЕ С 2014 ПО 2015 ГОД
Краснов Я.М., Сафронов В.А., Кутырев В.В., Попова А.Ю. 339

ПУТИ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ И ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ШТАММОВ *BACILLUS ANTHRACIS*
Куличенко А.Н., Рязанова А.Г. 340

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРИКЛАДНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПЦР И VNTR - ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ШТАММОВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ О1 *ctxA-tcpA+*
Кругликов В.Д., Левченко Д.А., Водопьянов А.С., Архангельская И.В., Ежова М.И. 341

ТРАНСАЛЬДОЛАЗА - ОДИН ИЗ НАИБОЛЕЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ КОМПОНЕНТОВ ПРЕПАРАТА «ФРАКЦИЯ V» *Yersinia pestis*
Трухачев А.Л., Копылов П.Х., Арсеньева Т.Е., Лебедева С.А., Анисимов А.П. 342

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ V.CHOLERAE O1/NONO1, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ЛЮДЕЙ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ЭПИДЕМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ
Хайтович А.Б., Петренко Е.В., Алексеенко В.В. 343

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МАСС-СПЕКТРОВ ПЛАНКТОННЫХ И БИОПЛЕНОЧНЫХ ФОРМ *V. CHOLERAE*
Чемисова О.С., Титова С.В., Сагакянц М.М., Рыковская О.А. 345

РАЗРАБОТКА ДИАГНОСТИЧЕСКОГО НАБОРА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ТЯЖЕЛЫХ ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ (ТОРИ) МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ
Шмелёва Н.П., Сивец Н.В., Лапо Т.П., Грибкова Н.В. 346

РАЗДЕЛ 7. СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИЙ ОРГАНОВ РЕПРОДУКЦИИ

THE ROLE OF POLYMICROBIAL COMMUNITIES IN URO-GENITAL INFECTIONS
Alexander Swidsinski 348

СВЯЗЬ ГЕНОТИПОВ *GARDNERELLA VAGINALIS* С БАКТЕРИАЛЬНЫМ ВАГИНОЗОМ
Крысанова А.А., Шалепо К.В., Хайруллина Г.А., Шипицына Е.В., Гущин А.Е., Савичева А.М. 348

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОФЛОРЫ ЭНДОМЕТРИЯ ПРИ ЛЕЙОМИОМАХ
Орадова А.Ш., Сапаргалиева А.Д., Шумкова Э.Н., Джардемалиева Н.Ж. 349

АНАЛИЗ ИНФОРМАТИВНОСТИ ПОЛУЧАЕМОГО У МУЖЧИН БИОМАТЕРИАЛА ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ НА УРОГЕНИТАЛЬНЫЕ ИНФЕКЦИИ МЕТОДОМ ПЦР
Воронова Е.А., Судоплатова Е.В., Никонорова И.В. 350

ВЫЯВЛЯЕМОСТЬ *NEISSERIA GONORRHOEAE* И ДРУГИХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ УРОГЕНИТАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ У ПАЦИЕНТОВ С СИФИЛИСОМ
Герасимова Н.А., Евстигнеева Н.П., Сурганова В.И. 351

АНАЛИЗ ФАКТОРОВ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ РАЗЛИЧИЯ В ПОКАЗАТЕЛЯХ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ И ТЕНДЕНЦИЯХ ЭПИДЕМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ИНФЕКЦИЙ, ПЕРЕДАВАЕМЫХ ПОЛОВЫМ ПУТЕМ В РФ И ЗА РУБЕЖОМ
Гущин А.Е. 352

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВЫЯВЛЕНИЯ ГОНОКОККОВОЙ И ТРИХОМОНАДНОЙ ИНФЕКЦИЙ У БЕРЕМЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ МИКРОСКОПИИ И ПЦР С УЧЕТОМ КЛИНИЧЕСКОГО СТАТУСА ПАЦИЕНТОК И КО-ИНФЕКЦИИ С ДРУГИМИ ИППП
Гущин А.Е., Руднева Н.С. 353

ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ И ДОМИНИРОВАНИЯ ОТДЕЛЬНЫХ ВИДОВ ЛАКТОБАЦИЛЛ У ЖЕНЩИН РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА С УМЕРЕННЫМ ДИСБИОЗОМ ВЛАГАЛИЩА
Зорников Д.Л., Ворошилина Е.С., Плотко Е.Э. 355

СРАВНЕНИЕ ЧАСТОТЫ ОБНАРУЖЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИППП НА ФОНЕ ДИСБИОТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ У ЖЕНЩИН С ОПУХОЛЕВЫМИ И ИНФЕКЦИОННО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ
Зыкова Т.А., Неродо Г.А., Франциянц Е.М., Гуськова Н.К. 356

ИЗУЧЕНИЕ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ШТАММОВ *MYCOPLASMA GENITALIUM,* УСТОЙЧИВЫХ К МАКРОЛИДАМ, В МОСКВЕ
Хайруллина Г.А., Махова Т.И., Гущин А.Е. 357

ИЗУЧЕНИЕ ЭТИОЛОГИИ УРЕТРИТА И БАЛАНОПОСТИТА У МУЖЧИН
Хайруллина Г.А., Ким Д.Г., Головешкина Е.Н., Гомберг М.А., Гущин А.Е. 358

ЛАКТОБАЦИЛЛЫ ВЛАГАЛИЩА В НОРМЕ И ПРИ ДИСБИОТИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ
Будиловская О.В., Шипицына Е.В., Савичева А.М. 360

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИЙ, ПРИВОДЯЩИХ К НАРУШЕНИЮ РЕПРОДУКТИВНЫХ ФУНКЦИЙ ЧЕЛОВЕКА, С ОДНОВРЕМЕННЫМ АНАЛИЗОМ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ
Лейнсоо А.Т., Шаскольский Б.Л., Дементьева Е.А., Петрова Н.П., Честков А.В., Образцова О.А., Шпилевая М.В., Дерябин Д.Г., Грядунов Д.А. 361

РЕЗУЛЬТАТЫ СКРИНИНГА ЖЕНЩИН, ПОДЛЕЖАЩИХ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОМУ МЕДИЦИНСКОМУ ОБСЛЕДОВАНИЮ НА ИППП И СОПУТСТВУЮЩИЕ УРОГЕНИТАЛЬНЫЕ ИНФЕКЦИИ
Махова Т.И., Анисимова Н.С., Головешкина Е.Н., Кисина В.И., Гущин А.Е. 362

ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИППП У ЖЕНЩИН ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СОСТОЯНИЯХ ВАГИНАЛЬНОЙ МИКРОБИОТЫ
Махова Т.И., Гущин А.Е. 364

ПУЛИРОВАНИЕ ОБРАЗЦОВ И ПРИМЕНЕНИЕ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР КАК ЭФФЕКТИВНЫЙ МЕТОД СКРИНИНГА ИНФЕКЦИЙ, ПЕРЕДАВАЕМЫХ ПОЛОВЫМ ПУТЕМ
Махова Т.И., Румянцева Т.А., Головешкина Е.Н., Руднева Н.С., Суханова Л.Н., Гущин А.Е. 365

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ВЫЯВЛЕНИЯ РНК *T.PALLIDUM* НА ОСНОВЕ РЕАКЦИИ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АМПЛИФИКАЦИИ (НАСБА) В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ
Головешкина Е.Н., Гущин А.Е. 366

ВЫЯВЛЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИЙ, ПЕРЕДАВАЕМЫХ ПОЛОВЫМ ПУТЕМ, У НОВОРОЖДЕННЫХ
Руднева Н.С. 367

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ЗНАЧИМОЙ БАКТЕРИУРИИ У БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН
Хуснутдинова Т.А., Савочкина Ю.А., Шипицына Е.В., Тимошина О.Ю., Гущин А.Е., Савичева А.М. 368

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МАКРОЛИД-РЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ *MYCOPLASMA GENITALIUM* НА ОСНОВЕ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ
Хайруллина Г.А., Гущин А.Е. 369

ДИАГНОСТИКА ДИСБИОЗОВ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА У ЖЕНЩИН В ПОСТМЕНОПАУЗЕ
Тимощук Г.И., Казакова Л.А., Заднепровская Н.В., Денисова Е.В., Болтунова О.С., Устюжанина А.В., Винчковская Е.Е. 371

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА АЭРОБНОГО ВАГИНИТА – НОВАЯ РЕАЛЬНОСТЬ
Румянцева Т.А., Гущин А.Е. 372

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ УПГМ СРЕДИ ПАЦИЕНТОК С РАЗЛИЧНЫМИ СОСТОЯНИЯМИ МИКРОФЛОРЫ ВЛАГАЛИЩА
Румянцева Т.А., Хайруллина Г.А., Гущин А.Е. 373

УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫЕ МИКОПЛАЗМЫ И БАКТЕРИАЛЬНЫЙ ВАГИНОЗ: ВЗАИМОСВЯЗЬ, ТРЕБУЮЩАЯ ИЗМЕНЕНИЙ В ПОДХОДАХ К ЛЕЧЕНИЮ ПАЦИЕНТОК
Румянцева Т.А., Гущин А.Е. 374

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПОЛНОГЕНОМНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ШТАММОВ *MYCOPLASMA HOMINIS,* ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОК С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ОРГАНОВ МАЛОГО ТАЗА
Хайруллина Г.А., Румянцева Т.А., Раковская И.В., Кулешов К.В., Гущин А.Е. 375

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ГОНОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ МЕТОДАМИ СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ И ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ
Болотина Е.С., Фомина О.В., Антипин Д.А. 377

ХАРАКТЕРИСТИКА *M.GENITALIUM* – ИНФЕКЦИИ, ОБУСЛОВЛЕННОЙ МУТАНТНЫМИ ШТАММАМИ ВОЗБУДИТЕЛЯ
Кисина В.И., Жукова О.В., Романова И.В., Хайруллина Г.А., Гущин А.Е. 378

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ «ФЕМОФЛОР-СКРИН» ДЛЯ ОЦЕНКИ ВАГИНАЛЬНОЙ МИКРОБИОТЫ
Фомина О.В., Болотина Е.С. 379

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ (ПЦР) ДЛЯ УТОЧНЕНИЯ ЭТИОЛОГИИ ЭРОЗИВНО-ЯЗВЕННЫХ ВЫСЫПАНИЙ В ОБЛАСТИ ГЕНИТАЛИЙ
Фомина О.В., Болотина Е.С., Дюкина Т.В. 381

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ И ПЦР-РВ «АМПЛИПРАЙМ ФЛОРОЦЕНОЗ-БАКТЕРИАЛЬНЫЙ ВАГИНОЗ-FL» ТЕСТА В ДИАГНОСТИКЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ВАГИНОЗА У ЖЕНЩИН РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА
Филиппова Ю.Н., Есютина Е.И., Амзаева Е.Ю., Новикова Е.Н., Саблина В.Н., Копейкина Н.И., Краснова И.А., Куралех Н.С. 381

РОЛЬ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ ОСТРЫХ ИНФЕКЦИОННО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ НИЖНИХ ОТДЕЛОВ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА У МУЖЧИН
Липова Е.В., Чекмарев А.С., Глазко И.И. 382

ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ МИКОПЛАЗМ В УРОГЕНИТАЛЬНОМ ТРАКТЕ У БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ (ПЦР-РВ)
Пандырева О.Н. 384

ПРОГРАММА RU-GASP (RUSSIAN GONOCOCCAL ANTIMICROBIAL SURVEILLANCE PROGRAMME): МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ. ИТОГИ 2005-2016 ГГ.
Кубанова А.А., Соломка В.С., Дерябин Д.Г. 385

АМБУЛАТОРНЫЙ СКРИНИНГ БЕРЕМЕННЫХ НА ИНФЕКЦИИ В Г. МОСКВЕ
Науменко Н.С., Белова А.В., Асцатурова О.Р., Никонов А.П. 386

ГЕНОДИАГНОСТИКА ГЕРПЕТИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ У ЖЕНЩИН ПРИ НАРУШЕНИИ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ
Орлова К.А., Бруснигина Н.Ф., Махова М.А., Черневская О.М., Барышева Н.Н., Скобло Л.Е. 388

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА В СКРИНИНГЕ БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН НА ИНФЕКЦИИ, ПЕРЕДАЮЩИЕСЯ ПОЛОВЫМ ПУТЕМ
Руднева Н.С. 389

ВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ЛАКТОБАКТЕРИЙ В ВАГИНАЛЬНЫХ МАЗКАХ БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН Г. МОСКВЫ
Кошечкин С.И., Иванова Н.В., Духанина Н.С., Заруцкая Г.Н., Багдалова Ф.А., Медетханова Ф.Г., Навбатникова Е.В., Демкин В.В. 390

ИППП У ПАЦИЕНТОК С ДИСТРОФИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ВУЛЬВЫ
Халидова Х.Р., Порсохонова Д.Ф., Ибрагимова Г.Р. 392

МИКРОБИОЦЕНОЗ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА У ПАЦИЕНТОВ С ДИСТРОФИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ВУЛЬВЫ
Халидова Х.Р., Ибрагимова Г.Р., Порсохонова Д.Ф. 393

AEROBIC VAGINITIS: NO LONGER A STRANGER
Gilbert GG Donders, Gert Bellen, Svitrigaile Grinceviciene, Kateryna Ruban, Pedro Vieira-Baptista 394

ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ПРОСТАТИТОМ
Казакова Л.А., Короткова А.Ф., Туркина И.А., Жук А.А., Денисова Е.В., Устюжанина А.В. 394

РАЗДЕЛ 8. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ В ДИАГНОСТИКЕ ВНУТРИУТРОБНЫХ ИНФЕКЦИЙ

ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ У ДЕТЕЙ Г. АЛМАТЫ
Орадова А.Ш., Махамедов Б., студент 5-го курса факультета общей медицины 396

СЛУЧАЙ ЛИХОРАДКИ ЗИКА У БЕРЕМЕННОЙ ЖЕНЩИНЫ, МОСКВА, 2016
Карань Л.С., Григорьева Я.Е., Сайфуллин М.А., Федорова М.В., Журенкова О.Б., Маленов М.Т., Стуколова О.А., Базарова М.В., Девяткин А.В., Шипулин Г.А., Малеев В.В. 396

КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА СЛУЧАЕВ, ПОДОЗРИТЕЛЬНЫХ НА КРАСНУХУ, У БЕРЕМЕННЫХ
Григорьева Т.Д., Белопольская М.А., Вашукова С.С., Андреева Н.В., Макарова Н.Г., Никонова А.Н. 398

ОСОБЕННОСТИ МИКРОФЛОРЫ ОСНОВНЫХ БИОТОПОВ У НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ С ОЧЕНЬ НИЗКОЙ И ЭКСТРЕМАЛЬНО НИЗКОЙ МАССОЙ ТЕЛА ПРИ РОЖДЕНИИ НА ФОНЕ ВНУТРИУТРОБНОГО ИНФИЦИРОВАНИЯ
Малыгина О.Г., Бажукова Т.А. 399

ДИАГНОСТИКА ЛЕТАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ У МАЛОВЕСНЫХ ДЕТЕЙ
Островская О.В., Ивахнишина Н.М., Кожарская О.В., Наговицына Е.Б., Власова М.А., Бачалдин С.Л., Обухова В.Г., Мусатов Д.В. 400

ПЕРИНАТАЛЬНЫЕ ИНФЕКЦИИ – ПРОБЛЕМЫ СКРИНИНГА И ПРОФИЛАКТИКИ
Савичева А.М. 401

***STREPTOCOCCUS AGALACTIAE:* ЧАСТОТА ИНФИЦИРОВАНИЯ НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ, РОЖДЕННЫХ ОТ *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*-ПОЗИТИВНЫХ ЖЕНЩИН**
Садова Н.В., Скачкова Т.С., Смирнова В.С., Домонова Э.А., Шипулина О.Ю., Подзолкова Н.М., Назарова С.В., Насекина Е.А., Паносян С.Р., Волкодав А.А., Черемухина Е.П., Заплатников А.Л. 403

ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* У ЖЕНЩИН РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА ГОРОДА МОСКВЫ
Смирнова В.С., Домонова Э.А., Скачкова Т.С., Шипулина О.Ю. 404

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ГРУДНОГО МОЛОКА НА ГЕРПЕСВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ ПЦР-МЕТОДОМ
Черемных Н.В. 405

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ СРЕДИ БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН В Г. МОСКВЕ
Науменко Н.С., Белова А.В., Асцатурова О.Р., Никонов А.П. 406

ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ МАНИФЕСТНЫХ ФОРМ ВРОЖДЕННОЙ ЭНТЕРОВИРУСНОЙ И ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ
Юрлова О.В., Быков Ю.Н., Берденникова В.В., Новожилов В.А., Акулич И.С. 408

РАЗДЕЛ 9. ТЕХНОЛОГИИ МОЛЕКУЛЯРНОГО АНАЛИЗА В КРИМИНАЛИСТИКЕ И СУДЕБНОЙ МЕДИЦИНЕ

EXTRACTION OF HIGH QUALITY DNA FROM CONTEMPORARY AND ANCIENT HUMAN SKELETONS
Zupanič Pajnič I. 410

X-SNPID: ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ДНК-ИДЕНТИФИКАЦИИ, ОСНОВАННАЯ НА МАРКЕРАХ Х-ХРОМОСОМЫ
Вагайцева К.В., Харьков В.Н., Степанов В.А. 411

ОСОБЕННОСТИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ЭКСПЕРТНОГО СОПРОВОЖДЕНИЯ РАССЛЕДОВАНИЯ АВИАКАТАСТРОФ (ПО СОБЫТИЯМ 2015–2016 ГГ.)
Иванов П.Л., д.б.н., проф., Земскова Е.Ю., к.м.н., Тимошенко Т.В. 412

ДЕГРАДАЦИЯ ДНК В СМЫВАХ С ТЕЧЕНИЕМ ВРЕМЕНИ
Фалеева Т.Г., Иванов И.Н., Мишин Е.С., Корниенко И.В. 413

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СВЯЗЬ «МАТЬ – РЕБЕНОК» КАК ВАЖНЕЙШИЙ АСПЕКТ КРИМИНАЛИСТИЧЕСКОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ ДЕТОУБИЙСТВ
Перепечина И.О. 415

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ В ПРАКТИКЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ
Пехов В.М., Игнашкин М.А., Кол Н.В., Павлов А.Е., Пильщикова Н.С. 416

ПРИМЕНЕНИЕ КОМПЛЕКСА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ПРИ РЕШЕНИИ ЗАДАЧИ ИДЕНТИФИКАЦИИ ЛИЧНОСТИ В НЕТРИВИАЛЬНОЙ СИТУАЦИИ
Смоляницкий А.Г., Смоляницкая А.И. 417

ОБ ЭКСПЕРТНОЙ ОЦЕНКЕ ОБЪЕКТОВ, СОДЕРЖАЩИХ ДНК ДВУХ ИЛИ БОЛЕЕ ЛИЦ
Культин А.Ю. 418

ОПРЕДЕЛЕНИЕ «НОВЫХ» SNP, ОБЛАДАЮЩИХ ДИФФЕРЕНЦИРУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТЬЮ ДЛЯ РАЗЛИЧЕНИЯ ОСОБЕЙ *SUS SCROFA DOMESTICUS* И *SUS SCROFA SCROFA*
Кипень В.Н., Снытков Е.В. 420

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ДНК В ПОТОЖИРОВОМ ВЕЩЕСТВЕ НА КОЖЕ РУК ЧЕЛОВЕКА (ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)
Фалеева Т.Г., Иванов И.Н., Мишин Е.С., Корниенко И.В. 421

ТЕХНОЛОГИЯ СОЗДАНИЯ СУДЕБНОЙ РЕФЕРЕНТНОЙ БАЗЫ ДАННЫХ ПО 18 STR ДЛЯ ДНК-ИДЕНТИФИКАЦИИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ
Удина И.Г., Веремейчик В.М., Котова С.А., Цыбовский И.С. 422

МАРКЕРЫ Y-ХРОМОСОМЫ В ДНК-ИДЕНТИФИКАЦИИ: ДОСТИЖЕНИЯ, ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ
Харьков В.Н., Степанов В.А. 423

РАЗДЕЛ 10. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА В ГЕНЕТИКЕ МОНОГЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

ОПЫТ МЕДИКО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОНСУЛЬТИРОВАНИЯ И ДНК-ДИАГНОСТИКИ У ДЕТЕЙ С ПОКАЗАНИЯМИ К ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПЕЧЕНИ
Поляк М.Е., Филин А.В., Ховалыг А.Б., Метелин А.В., Букаева А.А., Семенков А.В., Заклязьминская Е.В. 425

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТКА ГЕРМИНАЛЬНЫХ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ APC
Ефимова И.Ю., Тимошкина Н.Н., Солдаткина Н.В., Геворкян Ю.А., Водолажский Д.И. 425

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПАТОГЕННОСТИ ЗАМЕНЫ c.956G>A (rs112287730) ГЕНА *FBN1* ПРИ СИНДРОМЕ МАРФАНА
Адян Т.А., Миронович О.Л., Семячкина А.Н., Румянцева В.А., Рогожина Ю.А., Поляков А.В. 426

ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПРИРОДЫ ФЕНИЛКЕТОНУРИИ В РЕСПУБЛИКАХ БАШКОРТОСТАН, СЕВЕРНОГО КАВКАЗА И КАЗАХСТАН
Ахметова В.Л., Хусаинова Р.И., Бермишева М.А., Валиев Р.Р., Кузнецов Д.Ю., Хуснутдинова Э.К. 427

АНАЛИЗ ЧИСЛА КОПИЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДНК В ЛОКУСЕ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ТУГОУХОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТИПА DFNB1
Близнец Е.А., Канивец И.В., Поляков А.В. 428

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ В ГЕНЕ *CYP17A1,* АССОЦИИРОВАННЫЙ С ОЧАГОВОЙ АЛОПЕЦИЕЙ (ALOPECIA AREATA)
Ундрицов В.М., Ундрицов И.М., Орлов Е.Н. 429

ДИАГНОСТИКА ХОРЕИ ГЕНТИНГТОНА МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА
Кривенцова Н.В., Шокарев Р.А., Фомина-Чертоусова Н.А., Кривенцова А.А. 429

РАЗРАБОТКА И ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ПАНЕЛИ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПРЕКОНЦЕПЦИОННОГО ГЕНЕТИЧЕСКОГО СКРИНИНГА
Широкова Н.А., Жикривецкая С.О., Биканов Р.А., Ветрова Н.В., Померанцева Е.А. 430

РЕЗУЛЬТАТЫ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ ДЮШЕННА/БЕККЕРА В УЗБЕКИСТАНЕ
Омонова У.Т., Каримов Х.Я., Маджидова Е.Н., Бобоев К.Т., Шамсиддинова М.А. 431

РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ СКРИНИНГА ГАЛАКТОЗЕМИИ У НОВОРОЖДЕННЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ МЕТОДОМ В СУХИХ ПЯТНАХ КРОВИ «ГАЛАКТОЗА-НЕОСКРИН»
Помелова В.Г., Быченкова Т.А., Осин Н.С. 432

АНАЛИЗ ЧАСТОТЫ И СПЕКТРА МУТАЦИЙ ГЕНА *GJB2* У БОЛЬНЫХ НАСЛЕДСТВЕННОЙ НЕСИНДРОМАЛЬНОЙ НЕЙРОСЕНСОРНОЙ ТУГОУХОСТЬЮ В КАРАЧАЕВО-ЧЕРКЕССКОЙ РЕСПУБЛИКЕ
Петрина Н.Е., Макаов А.Х.-М., Зинченко Р.А., Близнец Е.А., Поляков А.В., Петрова Н.В., Васильева Т.А., Чудакова Л.В., Петрин А.Н., Гинтер Е.К. 434

АНАЛИЗ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ *SOD1* У ПАЦИЕНТОВ С КЕРАТОКОНУСОМ
Титоян К.Х., Хасанова Р.Р., Лобов С.Л., Джемилева Л.У., Усубов Э.Л., Бикбов М.М., Хуснутдинова Э.К. 435

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕНОВ *CYP1B1* И *PITX2* У ПАЦИЕНТОВ С ПЕРВИЧНОЙ ВРОЖДЕННОЙ И ПЕРВИЧНОЙ ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМОЙ
Хасанова Р.Р., Джемилева Л.У., Лобов С.Л., Загидуллина А.Ш., Зайдуллин И.С., Гарипова Э.З., Савельева О.Н., Хуснутдинова Э.К. 436

СОЗДАНИЕ ЭФФЕКТИВНЫХ СИСТЕМ ДЕТЕКЦИИ ЧАСТЫХ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ *ATP7B* ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ БОЛЕЗНИ ВИЛЬСОНА-КОНОВАЛОВА
Баязутдинова Г.М., Щагина О.А., Поляков А.В., Федотов В.П., Проскокова Т.Н., Федорова Т.Ф. 437

СЕМЕЙНЫЙ СЛУЧАЙ ДВУХ БРАТЬЕВ С ЛЕГКОЙ ФОРМОЙ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ РАЗЛИЧНОЙ ЭТИОЛОГИИ И МАТЕРИ С МОЗАИЧНОЙ ФОРМОЙ АНЕУПЛОИДИИ ПО Х-ХРОМОСОМЕ
Екатерина Галанина, Андрей Тулупов, Наталья Лемская, Юлия Максимова, Асия Шорина, Ирина Сергеева, Дмитрий Юдкин 438

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ВРОЖДЕННЫХ ФОРМ АНИРИДИИ
Васильева Т.А., Хлебникова О.В., Марахонов А.В., Петрова Н.В., Воскресенская А.А., Поздеева Н.А., Крынская И.А., Козлова Ю.О., Ряднинская Н.В., Чухрова А.Л., Шилова Н.В., Кадышев В.В., Зинченко Р.А. 439

ДНК-ДИАГНОСТИКА ИНВЕРСИЙ ИНТРОНОВ 1 И 22 ГЕНА *F8* У БОЛЬНЫХ С ГЕМОФИЛИЕЙ А ИЗ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Бескоровайная Т.С., Миловидова Т.Б., Щагина О.А., Поляков А.В. 440

СПЕКТР МУТАЦИЙ В ГЕНАХ КРИСТАЛЛИНОВ *CRYAA, CRYAB* И *CRYGD* У БОЛЬНЫХ С ВРОЖДЕННОЙ ИЗОЛИРОВАННОЙ КАТАРАКТОЙ ИЗ РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН
Хидиятова И.И., Хидиятова И.М., Азнабаев М.Т., Хуснутдинова Э.К. 441

АНАЛИЗ ЭКЗОМОВ У ДЕТЕЙ С MODY ДИАБЕТОМ
Глотов О.С., Глотов А.С., Серебрякова Е.А., Башнина Е.Б., Берсенева О.С., Туркунова М.Е., Полякова И.В., Иващенко Т.Э., Полев Д.Е., Апалько С.В., Федяков М.А., Швед Н.Ю., Шабанова Е.С., Романова О.В., Дубинина Т.А., Тыртова Л.В., Полянская М.А., Лобанова Н.Н., Оленев А.С., Платонов В.В., Корытко Т.Е., Карпушкина А.В., Предеус А.В., Барбитов Ю.А., Дитковская Л.В., Желенина Л.А., Баранов В.С. 442

РАЗДЕЛ 11. НОВЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ВИЧ И ВИЧ-АССОЦИИРОВАННЫХ ИНФЕКЦИЙ

ВИРУСНАЯ НАГРУЗКА У ПАЦИЕНТОВ С ВПЕРВЫЕ ДИАГНОСТИРОВАННОЙ В 2016 ГОДУ ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ
Вехова Е.В. 444

(ФИЛО)ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВИЧ-1 В РЕШЕНИИ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ ЗАДАЧ
Лукашов В.В. 445

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ ИММУНОГЛОБУЛИНЫ – НОВЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ
Одинцова Е.С., Баранова С.В., Зубкова А.Д., Седых С.Е., Долгушин С.А., Бунева В.Н., Невинский Г.А. 446

КЛИНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЗНАЧИМОСТИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ТОКСОПЛАЗМОЗА
Бездверная Н.А., Лексикова Т.В. 446

ОДНОВРЕМЕННОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ РНК И ДНК ВИЧ-1 – КЛЕТОЧНО-АССОЦИИРОВАННАЯ РНК ВИЧ-1 КАК ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ МАРКЕР ВИЧ-ИНФЕКЦИИ
Беликова А.В., Петров В.В., Киреев Д.Е. 447

АНАЛИЗ ГЕНОМА ВАРИАНТА A_{FSU} ВИЧ-1, ДОМИНИРУЮЩЕГО НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ И СТРАН СНГ, НА ОСНОВАНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ
Громов К.Б., Казеннова Е.В., Киреев Д.Е., Лаповок И.А., Лопатухин А.Э., Мурзакова А.В., Бобкова М.Р. 448

СЛУЧАЙ СОЧЕТАНИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ НЕЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ С ПАРВОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ
Белых С.И., Плотникова О.И., Торовкова Т.В., Галич Е.А. 449

АНАЛИЗ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ВИЧ-1 В РЕГИОНАХ ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ФЕДЕРАЛЬНОГО ОКРУГА
Котова В.О., Балахонцева Л.А., Троценко О.Е. 450

ПРИКЛАДНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ВИЧ-1, ПОЛУЧЕННЫХ НА ТЕСТ-СИСТЕМАХ «VIROSEQ HIV-1» И «АМПЛИСЕНС HIV-RESIST-SEQ», В КЛИНИКЕ И ЭПИДЕМИОЛОГИИ
Волова Л.Ю., Грезина Л.А., Горохов В.В. 451

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ПЕРВИЧНОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ВИЧ-1 В ХАБАРОВСКОМ КРАЕ
Воронцова Г.А., Кузнецова А.В., Сысолетина И.П., Григорьева Л.Н., Бутакова А.Е., Лойфман Е.А. 452

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ ВИЧ-1, ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ В РЕСПУБЛИКЕ ТАДЖИКИСТАН
Каримов С.С., Астахова Е.М., Ивлев В.В., Сайбурхонов Д.С., Гашникова М.П., Исматова Л., Нурляминова З., Тотменин А.В., Гашникова Н.М. 454

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА НЕСТРУКТУРНЫХ ГЕНОВ ВИЧ-1 *VIF* И *REV*
Громов К.Б., Лага В.Ю., Мурзакова А.В., Киреев Д.Е. 455

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ R5 (NSI/M)- И X4 (SI/T)-ТРОПНЫХ ВИРУСОВ В ПОПУЛЯЦИИ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ
Еремин В.Ф., Гасич Е.Л., Сосинович С.В., Дрозд А.М. 456

МУТАЦИИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ, ВЫЯВЛЕННЫЕ У ПАЦИЕНТОВ, НАХОДЯЩИХСЯ НА ВААРТ
Еремин В.Ф., Гасич Е.Л., Сосинович С.В., Дрозд А.М. 457

ДИНАМИКА РЕЗУЛЬТАТОВ ЛАБОРАТОРНОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ ЛИЦ, УПОТРЕБЛЯЮЩИХ ИНЪЕКЦИОННЫЕ НАРКОТИКИ, НА ВИЧ КАК ОТРАЖЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ В ТАДЖИКИСТАНЕ
Каримов С.С., Абдухамедов Н.А., Сайбурхонов С.С. 458

ПЕРВЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТЕСТА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ РНК/ДНК ВИЧ-1 В ОЧИЩЕННЫХ СПЕРМАТОЗОИДАХ В РАМКАХ ПРИМЕНЕНИЯ ВРТ У СЕРОДИСКОРДАНТНЫХ ПАР
Киреев Д.Е., Мурзакова А.В. 459

СРАВНЕНИЕ ДВУХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ ВИРУСНОЙ НАГРУЗКИ ВИЧ-1 НА ОСНОВЕ ОТ-ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ПРИ АНАЛИЗЕ РАЗЛИЧНЫХ СУБТИПОВ ВИЧ-1
Лаповок И.А., Киреев Д.Е., Шипулин Г.А. 460

СТРУКТУРА И УРОВЕНЬ МУТАЦИЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ВИЧ-1 У ПАЦИЕНТОВ С ВИРУСОЛОГИЧЕСКОЙ НЕУДАЧЕЙ ЛЕЧЕНИЯ
Кириченко А.А., Мурзакова А.В., Киреев Д.Е. 462

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ ВИРУСНОЙ НАГРУЗКИ ВИЧ-1, ПРИМЕНЯЕМЫХ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Лаповок И.А., Петров В.В., Киреев Д.Е., Сандырева Т.П., Шипулин Г.А. 463

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОРОГА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИСТАНЦИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ СВЯЗАННОСТИ ОБРАЗЦОВ ПРИ РАССЛЕДОВАНИИ СЛУЧАЕВ ПЕРЕДАЧИ ВИЧ
Лопатухин А.Э., Мурзакова А.В., Киреев Д.Е. 464

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИЧ-1 СУБТИПА G, ВЫЗВАВШЕГО ВНУТРИБОЛЬНИЧНУЮ ВСПЫШКУ НА ЮГЕ РОССИИ В 1988-1990 ГГ.
Мурзакова А.В., Киреев Д.Е., Лопатухин А.Э., Шемшура А.Б., Носик М.Н., Шипулин Г.А. 465

ЭФФЕКТИВНОСТЬ НОКАУТА ГЕНА РЕЦЕПТОРА CCR5 С ПОМОЩЬЮ CRISPR/CAS9 СИСТЕМЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА В МОДЕЛЬНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ HT1080 CCR5-EGFP
Омельченко Д.О., Урусов Ф.А., Глазкова Д.В., Богословская Е.В. 466

СУБТИПЫ ВИЧ-1 И МУТАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ К ПРЕПАРАТАМ АРВТ В ПРИВОЛЖСКОМ ФЕДЕРАЛЬНОМ ОКРУГЕ
Парфенова О.В., Пекшева О.Ю., Зайцева Н.Н 467

ЛАБОРАТОРНЫЕ ПОДХОДЫ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНОЙ НАГРУЗКИ ВИЧ
Перелыгина И.В., Мясищева Е.А. 468

МОДЕЛЬНАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВСТАВКИ ЭКСПРЕССИОННОЙ КАССЕТЫ В ГЕН *CCR5* НА ОСНОВЕ КЛЕТОК ЛИНИИ HT1080
Поздышев Д.В., Урусов Ф.А., Омельченко Д.О., Сизова Т.В., Гоптарь И.А., Глазкова Д.В., Богословская Е.В., Маркелов М.Л., Шипулин Г.А. 469

РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ВИЧ К ПРЕПАРАТАМ В СХЕМАХ АРВТ ПЕРВОЙ ЛИНИИ: ОТ ТЕОРИИ К КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ
Кравченко А.В., Куимова У.А., Носик М.Н., Харбутли М.А. 470

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ В ОБЛАСТИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЭПИДЕМИОЛОГИИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ
Свиридова А.А. 471

ПРОИСХОЖДЕНИЕ И РАСПРОСТРАНЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ФОРМ ВИЧ-1, ВЫЯВЛЕННЫХ В БЕЛАРУСИ
Сосинович С.В., Еремин В.Ф., Гасич Е.Л. 472

УГРОЗА ИНФЕКЦИИ ВИЧ ЧЕЛОВЕЧЕСТВУ
Абдулхакимов А.Р. 474

ПОКАЗАТЕЛИ РАСПРОСТРАНЁННОСТИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ СРЕДИ ТРУДОВЫХ МИГРАНТОВ ФЕРГАНСКОЙ ОБЛАСТИ
Кодиров Б.А., Расулов У.М., Уралова Н.О., Расулов Ф.Х. 474

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ В ДИАГНОСТИКЕ ВТОРИЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У БОЛЬНЫХ С ИММУНОСУПРЕССИЕЙ
Шахгильдян В.И., Ядрихинская М.С., Шипулина О.Ю., Сафонова А.П., Альварес-Фигероа М.В., Долгова Е.А., Домонова Э.А. 475

ДАННЫЕ ТЕКУЩЕГО МОНИТОРИНГА ЭПИДЕМИИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ В НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ
Муранкина В.Р., Власов Е.В., Ивлев В.В., Тотменин А.В., Гашникова М.П., Мирджамалова Ф.О., Соколов Ю.В., Казаева Е.В., Гашникова Н.М. 476

ОСОБЕННОСТИ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ВИЧ-1 С УЧЕТОМ РАЗВИТИЯ СОВРЕМЕННЫХ ТЕРРИТОРИАЛЬНЫХ ЭПИДЕМИЙ
Тотменин А.В., Астахова Е.М., Ивлев В.В., Зырянова Д.П., Гашникова М.П., Власов Е.В., Муранкина В.Р., Гашникова Н.М. 477

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ВЫЯВЛЕНИЮ ВИРУСОВ ГЕПАТИТА С, ГЕПАТИТА В И ВИЧ В ЭЯКУЛЯТЕ
Горская О.А. 478

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВИЧ-1 НА ТЕРРИТОРИИ ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ
Плотникова Ю.К., Ревизор А.О., Пономарева О.А., Круглова Е.А. 479

ДВУХЛОКУСНЫЙ ТЕСТ КАК СПОСОБ РЕШЕНИЯ ПРОБЛЕМЫ ВЫСОКОЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ВИЧ В NAT-ТЕСТИРОВАНИИ
Прасолова М.А., Иванов М.К. 480

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ АЛЛЕЛИ HLA-B*5701 СРЕДИ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ В ПРИВОЛЖСКОМ ФЕДЕРАЛЬНОМ ОКРУГЕ
Зайцева Н.Н., Бутина Т.Ю., Кузнецова И.В. 482

УРОВЕНЬ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ МУТАЦИЙ, ВЕДУЩИХ К УСТОЙЧИВОСТИ ВИЧ-1 К АНТИРЕТРОВИРУСНЫМ ПРЕПАРАТАМ
Рыжов К.А., Носик М.Н., Рыманова И.В., Яровая Ж.Ю., Кравченко А.В., Куимова У.А. 483

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ НОКАУТА ГЕНА *CCR5* С ПОМОЩЬЮ TALE-НУКЛЕАЗЫ
Урусов Ф.А., Глазкова Д.В., Омельченко Д.О., Поздышев Д.В., Богословская Е.В. 484

АНАЛИЗ СПЕКТРА МУТАЦИЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ВИЧ-1 К АНТИРЕТРОВИРУСНЫМ ПРЕПАРАТАМ СРЕДИ ОСУЖДЕННЫХ, ОТБЫВАЮЩИХ НАКАЗАНИЕ В ПЕНИТЕНЦИАРНЫХ УЧРЕЖДЕНИЯХ СВЕРДЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ
Устюжанин А.В., Демчук Н.С., Санникова Л.Б., Новоселов А.В., Алимов А.В., Кадырова О.Ю., Паньков А.П. 485

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СУБТИПОВОЙ СТРУКТУРЫ ГЕНОВАРИАНТОВ ВИЧ-1, ВЫЯВЛЕННЫХ У ОСУЖДЕННЫХ, ОТБЫВАЮЩИХ НАКАЗАНИЕ В ИСПРАВИТЕЛЬНЫХ КОЛОНИЯХ В СВЕРДЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ
Устюжанин А.В., Демчук Н.С., Санникова Л.Б., Новоселов А.В., Алимов А.В., Кадырова О.Ю., Паньков А.П. 486

ПРИМЕНЕНИЕ КОМПЛЕКСА МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДАВНОСТИ ЗАРАЖЕНИЯ ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ
Шемшура А.Б., Бендус И.В., Милованова И.И., Лебедев П.В., Кулагин В.В., Мурзакова А.В., Киреев Д.Е. 488

РАЗДЕЛ 12. МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНОГО АНАЛИЗА В ДИАГНОСТИКЕ И ЭПИДЕМИОЛОГИИ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

ПРИМЕНЕНИЕ КВАНТИФЕРОНОВОГО ТЕСТА У БОЛЬНЫХ НА ПОЗДНИХ СТАДИЯХ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЁЗА
Прокопенко А.В., Альварес Фигероа М.В., Парфёнова О.В., Зимина В.Н., Максимов С.Л. 490

ЭМЕРДЖЕНТНЫЕ КЛОНЫ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* В РОССИИ И СТРАНАХ БЫВШЕГО СССР
Мокроусов И.В. 491

ГЕНОТИПЫ ШТАММОВ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* В КАЛИНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ
Вязовая А.А., Соловьева Н.С., Ахмедова Г.М., Туркин Е.Н., Герасимова А.А., Мокроусов И.В., Журавлев В.Ю., Нарвская О.В. 492

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА ТУБЕРКУЛЕЗА У ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ С ПРИМЕНЕНИЕМ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ
Александрова Н.М., Хаммадов Н.И., Шуралев Э.А., Елизарова И.А. 493

ВЫЯВЛЕНИЕ НАИБОЛЕЕ РАСПРОСТРАНЕННЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ СПОНДИЛИТА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ
Бердюгина О.В., Голубева Л.А. 494

ОЦЕНКА ОПЕРАЦИОННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX* ИЗ ОБРАЗЦОВ НАТИВНЫХ ЖИДКОСТЕЙ И ТКАНЕЙ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ТУБЕРКУЛЕЗА И ПОСТВАКЦИНАЛЬНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ У ДЕТЕЙ
Альварес Фигероа М.В., Прокопенко А.В., Долгова Е.А., Леви Д.Т., Позднякова А.С., Вязовая А.А., Журавлев В.Ю. 495

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* К БЕДАКВИЛИНУ И ЛИНЕЗОЛИДУ
Зименков Д.В., Носова Е.Ю., Кулагина Е.В., Антонова О.В., Арсланбаева Л.Р., Исакова А.И., Крылова Л.Ю., Перетокина И.В., Макарова М.В., Сафонова С.Г., Борисов С.Е., Грядунов Д.А. 496

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* COMPLEX ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ИЗОНИАЗИДУ И РИФАМПИЦИНУ
Луданный Р.И., Альварес Фигероа М.В., Попов С.А., Лобашова Г.П., Кравцова Т.А., Валдохина А.В., Шипулин Г.А. 498

ГЕНОМИКА РОССИЙСКОГО ВАКЦИННОГО СУБШТАММА *M. BOVIS* BCG-1
Луданный Р.И., Альварес Фигероа М.В., Леви Д.Т., Маркелов М.Л., Дедков В.Г., Александрова Н.А., Шипулин Г.А. 499

ВАЛИДАЦИЯ АВТОМАТИЗИРОВАННЫХ МЕТОДИК ЭКСТРАКЦИИ ДНК *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* COMPLEX
Прокопенко А.В., Альварес Фигероа М.В. 500

ИЗУЧЕНИЕ ПОПУЛЯЦИИ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX,* ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ НА ТЕРРИТОРИИ МОСКОВСКОГО МЕГАПОЛИСА
Альварес Фигероа М.В., Луданный Р.И., Вязовая А.А., Мокроусов И.В., Лобашова Г.П. 501

РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАЦИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА
Микулович Ю.Л., Савочкина Ю.А., Альварес Фигероа М.В., Луданный Р.И., Тимошина О.Ю., Кравцова Т.А., Попов С.А., Лобашова Г.П., Шипулин Г.А. 502

ОЦЕНКА ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАЦИЙ, СВЯЗАННЫХ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА К РИФАМПИЦИНУ И ИЗОНИАЗИДУ
Микулович Ю.Л., Савочкина Ю.А., Альварес Фигероа М.В., Луданный Р.И., Кравцова Т.А., Тимошина О.Ю., Лобашова Г.П., Барило В.Н., Попов С.А., Шипулин Г.А. 504

ПРОДУКЦИЯ БИОФИЛЬМОВ ВОЗБУДИТЕЛЕМ ТУБЕРКУЛЕЗА В МОНО- И МИКСТ-КУЛЬТУРАХ
Огарков О.Б., Бадлеева М.В., Белькова Н.Л., Адельшин Р.В., Цыренова Т.А., Синьков В.В., Хромова П.А., Костюнин К.Ю., Кощеев М.Е., Жданова С.Н. 505

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ МИКОБАКТЕРИЙ И БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ: ОТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЭПИДЕМИОЛОГИИ К ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЕ
Огарков О.Б., Жданова С.Н., Синьков В.В., Хромова П.А., Кощеев М.Е., Зоркальцева Е.Ю. 507

ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ТУБЕРКУЛЕЗНОГО ПЛЕВРИТА С ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ
Салимова Н.А. 508

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ *M.TUBERCULOSIS*, КОДИРУЮЩИХ ЛЕКАРСТВЕННУЮ УСТОЙЧИВОСТЬ К ИЗОНИАЗИДУ И РИФАМПИЦИНУ У БОЛЬНЫХ С ДЕСТРУКТИВНЫМИ ФОРМАМИ ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ
Салина Т.Ю., Морозова Т.И. 509

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS,* ИСПОЛЬЗУЯ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЙ МЕТОД TB-SPRINT
Жолдыбаева Е.В., Тарлыков П.В., Аленова А.Х., Сола К. 509

СЕКВЕНИРОВАНИЕ ГЕНА *PNCA* – НАДЕЖНЫЙ СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ *M.TUBERCULOSIS* К ПИРАЗИНАМИДУ
Андреевская С.Н., Смирнова Т.Г., Андриевская И.Ю., Устинова В.В., Альварес Фигероа М.В., Маслов Д.А., Черноусова Л.Н. 510

ГЕНОМНАЯ И ПРОТЕОМНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* КЛАСТЕРА BEIJING B0/W148
Шитиков Е.А., Беспятых Ю.А., Алтухов И.А., Бутенко И.О., Мельникова Н., Журавлев В.Ю., Ильина Е.Н., Говорун В.М. 511

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТИПИРОВАНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУБЕРКУЛЕЗА У ПАЦИЕНТОВ С ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ
Умпелева Т.В., Еремеева Н.И., Вахрушева Д.В., Белоусова К.В., Красноборова С.Ю. 512

ДЕТЕКЦИЯ *MYCOBACTERIUM LEPRAE* В СОСКОБАХ СО СЛИЗИСТОЙ ПОВЕРХНОСТИ НОСА У БОЛЬНЫХ ЛЕПРОЙ И КОНТАКТНЫХ ЛИЦ
Арнаудова К.Ш., Сароянц Л.В. 513

ЧАСТОТА РАСПРОСТРАНЕНИЯ B0/W148 ШТАММОВ В ПОПУЛЯЦИИ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* ИЗ ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ
Жданова С.Н., Огарков О.Б., Хромова П.А., Зоркальцева Е.Ю., Савилов Е.Д., Бадлеева М.В., Кощеев М.Е. 514

ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОТИПОВ МУЛЬТИРЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS,* ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В ОМСКОЙ ОБЛАСТИ
Пасечник О.А., Вязовая А.А., Ляпина Е.С., Витрив С.В., Мокроусов И.В. 515

ПРИМЕНЕНИЕ СИСТЕМЫ МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА ДЛЯ КОНТРОЛЯ НАД НОЗОКОМИАЛЬНЫМ РАСПРОСТРАНЕНИЕМ ЛЕКАРСТВЕННО-УСТОЙЧИВЫХ ШТАММОВ *M. TUBERCULOSIS*
Скиба Ю.А., Набирова Д.А., Мокроусов И.В., Исмагулова Г.А., Мальцева Э.Р., Жидкеева Р.Е., Найзабаева Д.А., Бисенбай А.О., Юркевич Н.А., Аубакирова М.Б., Сапиева Ж.А., Шмид Д., Айтхожина Н.А. 516

РАЗДЕЛ 13. ФАРМАКОГЕНЕТИКА И ФАРМАКОГЕНОМИКА

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ CYP2C9*2 И CYP2C9*3 ГЕНА ЦИТОХРОМА CYP2C9 В НЕКОТОРЫХ ЭТНИЧЕСКИХ ГРУППАХ ЖИТЕЛЕЙ СТАВРОПОЛЬСКОГО КРАЯ
Царукян А.А., Батурин В.А., Бобрышев Д.В. 518

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ БИОТРАНСФОРМАЦИИ ОПИОИДНЫХ АНАЛЬГЕТИКОВ И ЕЕ РОЛЬ В ИЗУЧЕНИИ МОДИФИКАЦИОННОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ОБЕЗБОЛИВАНИЯ В КЛИНИЧЕСКОЙ ОНКОЛОГИИ
Боброва О.П., Шнайдер Н.А., Зырянов С.К. 519

ВЛИЯНИЕ ГЕНОТИПА ПО ПОЛИМОРФНОМУ МАРКЕРУ A6986G ГЕНА CYP3A5 НА ФАРМАКОКИНЕТИКУ АПИКСАБАНА У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ КАРДИОЭМБОЛИЧЕСКИМ ИНСУЛЬТОМ
Крюков А.В., Сычев Д.А., Андреев Д.А., Рябова А.В., Рыжикова К.А., Лоскутников М.А. 520

РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ В ИССЛЕДОВАНИИ ВКЛАДА ГЕНОВ БИОТРАНСФОРМАЦИИ ПРОТИВОЭПИЛЕПТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ В ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ТЕРАТОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА
Дмитренко Д.В., Шнайдер Н.А., Бочанова Е.Н. 521

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ГЕНЕТИЧЕСКИМИ ПОЛИМОРФИЗМАМИ ПО CYP2C19 И МЕТАБОЛИЧЕСКИМ ОТНОШЕНИЕМ 5-ГИДРОКСИОМЕПРАЗОЛ/ОМЕПРАЗОЛ В МОЧЕ У ПАЦИЕНТОВ С ЯЗВЕННОЙ БОЛЕЗНЬЮ
Денисенко Н.П., Сычев Д.А., Сизова Ж.М., Смирнов В.В., Гришина Е.А., Рыжикова К.А. 522

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНОГО ВАРИАНТА ГЕНА СЕРОТОНИНОВОГО РЕЦЕПТОРА HTR2A (rs6313) С РИСКОМ РАЗВИТИЯ АНТИПСИХОТИК-ИНДУЦИРОВАННЫХ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ: ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОСПЕКТИВНОГО ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ
Насырова Р.Ф., Сосин Д.Н., Тепляшина В.В., Ершов Е.Е., Иващенко Д.В., Незнанов Н.Г. 523

ИЗУЧЕНИЕ АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНА CYP2C9 С ПАРАМЕТРАМИ БЕЗОПАСНОСТИ ФЕНАЗЕПАМА У ПАЦИЕНТОВ С НЕОСЛОЖНЕННЫМ СИНДРОМОМ ОТМЕНЫ АЛКОГОЛЯ
Иващенко Д.В., Рыжикова К.А., Созаева Ж.А., Агузаров А.Д., Матис О.А., Галактионова Т.Е., Денисов Ю.В., Петросян Ю.Е., Гришина Е.А., Савченко Л.М., Брюн Е.А., Сычев Д.А. 525

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНДИВИДУАЛЬНОГО ТИПА БИОТРАНСФОРМАЦИИ ИЗОНИАЗИДА У БОЛЬНЫХ С ВПЕРВЫЕ ВЫЯВЛЕННЫМ ТУБЕРКУЛЁЗОМ ЛЁГКИХ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ
Галкина К.Ю., Иванова Д.А., Иванушкина Т.Н., Носова Е.Ю., Краснова М.А., Хахалина А.А., Исакова А.И., Сафонова С.Г. 525

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА CTLA-4 (+49A>G) – ПРЕДИКТОР РАННЕГО НАЗНАЧЕНИЯ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ У БОЛЬНЫХ РАННИМ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ, НЕ ОТВЕЧАЮЩИХ НА ТЕРАПИЮ МЕТОТРЕКСАТОМ
Гусева И.А., Лучихина Е.Л., Абрамов Д.Д., Сорока Н.Е., Демидова Н.В., Александрова Е.Н., Новиков А.А., Самаркина Е.Ю., Трофимов Д.Ю., Каратеев Д.Е., Насонов Е.Л. 526

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ В ПРАКТИКЕ ЭПИЛЕПТОЛОГА
Якунина А.В., Повереннова И.Е., Вельдяксова Е.Д. 527

ЧАСТОТА НОСИТЕЛЬСТВА CYP2C9*2 И CYP2C9*3 СРЕДИ БОЛЬНЫХ ЭПИЛЕПСИЕЙ В ВОСТОЧНОЙ И СЕВЕРО-ВОСТОЧНОЙ СИБИРИ
Шнайдер Н.А., Дмитренко Д.В., Бочанова Е.Н., Николаева Т.Я. 529

ИМЕННОЙ УКАЗАТЕЛЬ 531

Раздел 1. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТОВ

HUMAN PEGIVIRUS У РЕЦИПИЕНТОВ АЛЛОГЕННОГО КОСТНОГО МОЗГА

Королева О.М., Паровичникова Е.Н., Кузьмина Л.А., Дроков М.Ю., Васильева В.А., Михальцова Е.Д., Дубняк Д.С., Попова Н.Н., Конова З.В., Романова Т.Ю., Тихомиров Д.С., Туполева Т.А., Гапонова Т.В., Савченко В.Г.

ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, Москва, Россия

Введение. Вирус гепатита G (*HGV; GB virus C*) был идентифицирован в 1995 году. По данным различных авторов в мире инфицировано около 750 млн человек. Первоначально считалось, что вирус является гепатотропным, так как его обнаружили у пациента с клиническими проявлениями гепатита, при отсутствии маркеров других вирусных гепатитов A, B и C. Однако, дальнейшие исследования не подтвердили его этиологическую роль в развитии гепатита. Также, была доказана его лимфотропность. Вирус может быть обнаружен в различных органах и тканях, включая печень, спинно-мозговую жидкость, Т- и В-лимфоциты, NK-клетки и моноциты. Но наибольшая концентрация вирусных частиц наблюдается в селезенке и костном мозге, где, согласно животным моделям, вирус предположительно размножается. По строению вирионов и путям передачи этот вирус схож с вирусом гепатита С и в 2013 году на заседании Международного комитета по таксономии вирусов, он был отнесен к семейству *Flaviviridae*, и получил название *Human Pegivirus* (*HPgV*). Клиническая значимость *HPgV* до сих пор не определена. Однако согласно современным данным, наличие репликации *HPgV* у ВИЧ-инфицированных пациентов ассоциируется с более благоприятным течением заболевания. Больные гемобластозами находятся в иммунодефиците, как в связи с основным заболеванием, так и после проведения специфической химиотерапии. Также эти пациенты относятся к группе высокого риска инфицирования парентеральными вирусными инфекциями в связи с многочисленными трансфузиями компонентов донорской крови на различных этапах лечения. В настоящее время нет данных о частоте встречаемости *HPgV* у больных гемобластозами, в частности у реципиентов аллогенного костного мозга и его влиянии на течение посттрансплантационного периода.

Цель: оценить частоту выявления маркеров *HPgV* у реципиентов аллогенного костного мозга.

Материалы и методы. Образцы плазмы крови от 101 пациента с гемобластозами (острые лейкозы (n=74), миелодиспластический синдром (n=8), апластическая анемия (n=6), миелопролиферативные заболевания (n=7), лимфопролиферативные заболевания (n=4), хронический лимфолейкоз (n=1), множественная миелома (n=1)) были исследованы на наличие РНК *HPgV* и антитела класса IgG *HPgV*. Исследование проводили до трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК). Медиана возраста составила 33 года (19-64). Мужчин было 45, женщин 56. У 75 пациентов применялся режим кондиционирования пониженной интенсивности, у 26 пациентов – миелоаблативный. Источником трансплантата у 68 пациентов был костный мозг, у 33 периферические стволовые клетки крови. У всех пациентов в анамнезе на предыдущих этапах лечения были многочисленные трансфузии компонентов крови. РНК вируса определяли методом полимеразной цепной реакции с помощью наборов реагентов «АмплиСенс HGV-FL» ФБУН ЦНИИЭ. В сыворотке крови больных методом непрямого твердотельного иммуноферментного анализа определяли антитела класса IgG к поверхностному белку E2 вируса HPgV с помощью наборов реагентов АО «Вектор-Бест».

Результаты. РНК *HPgV* была выявлена у 54 пациентов, что составило 53,5%. IgG *HPgV* были выявлены лишь у 5 пациентов (4,9%). Одновременно оба маркера были обнаружены у 3. Частота выявления маркеров *HPgV* не зависела от основного диагноза (p=0,6). Также она не зависела от таких факторов риска, как наличие татуировок и пирсинга (p=0,5). РНК *HPgV* выявлена у 9 из 14 пациентов с тату или пирсингом. У пациентов инфицированных *HPgV* не было выявлено лабораторных признаков поражения печени. Увеличение АСТ, АЛТ, щелочной фосфатазы, общего билирубина, увеличение размеров печени по данным УЗИ являлось статистически незначимым. Мы также проанализировали коинфицирование больных после алло-ТГСК *HPgV* и вирусами гепатитов В и С, результаты представлены в Таблице. Коинфицирование носило случайный характер.

Таблица. Маркеры коинфицированности вирусами гепатитов В и С

Маркеры гепатитов В и С	РНК HPgV, «-»	РНК HPgV, «+»	Р-значение
HBsAg	2	0	0,2
anti-HBc	12	8	0,2
anti-HBe	3	2	0,65
ДНК HBV	3	0	0,1
anti-HCV	1	1	1
РНК HCV	0	1	1

Мы оценили влияние *HPgV* на время приживления трансплантата. В группе пациентов с РНК *HPgV* медиана восстановления лейкоцитов составила 21 день (14-37), тромбоцитов – 21 (11-77). В группе без РНК *HPgV* медиана восстановления лейкоцитов составила 24 день (15-51), тромбоцитов – 23 (17-48). Различия в группах являлись статистически не достоверными.

Заключение. Выявлена высокая частота встречаемости маркеров *HPgV* у реципиентов аллогенного костного мозга – 53,5%, что не зависело от инфицированности вирусами гепатитов В и С. Антитела к *HPgV* были выявлены у 5 из 101 пациента, что вероятно связано с тем, что после каждого курса химиотерапии происходит реконституция иммунной системы. По мнению разных авторов, наличие IgG *HPgV* свидетельствует об элиминации вируса *HPgV*. Не было выявлено связи между наличием маркеров *HPgV* и признаками повреждения печени. Инфицирование *HPgV* не влияло на восстановление показателей периферической крови после алло-ТГСК.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВИРУСА ГЕПАТИТА В И ОЦЕНКА ВРЕМЕНИ ЕГО ЭВОЛЮЦИИ В СИБИРИ

Мануйлов В.А.[1], Карандашова И.В.[2], Карлсен А.А.[3], Нетесов С.В.[4,5], Останкова Ю.В.[6], Семенов А.В.[6], Tallo T.[7], Чуланов В.П.[2]

[1]Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия
[2]Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия
[3]Российская медицинская академия последипломного образования МЗ РФ, Москва, Россия
[4]Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия
[5]ФБУН «ГНЦ ВБ "Вектор"», Новосибирская область, р.п. Кольцово, Россия
[6]НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Л. Пастера, Санкт-Петербург, Россия
[7]Public Health Agency of Sweden, Stockholm, Sweden

Введение. Вирус гепатита В (ВГВ) человека является ДНК-содержащим вирусом с размером генома около 3200 п.н. Генетическая гетерогенность ВГВ позволяет классифицировать его изоляты как минимум на 10 генотипов, обозначаемых A-J, и не менее чем на 34 субгенотипа. Серологическая классификация ВГВ, основанная на различиях в антигенных свойствах поверхностного белка вируса – HBsAg, дает возможность идентифицировать 9 его субтипов. Изучение различий в географической встречаемости генетических вариантов ВГВ позволяет выдвигать и оценивать гипотезы об истории эволюции этого вируса и его распространении.

В настоящей работе исследовано разнообразие генотипов и субгенотипов ВГВ в 11 локальных группах коренного населения Сибири (Таблица), и проведен метаанализ геномных последовательностей ВГВ, полученных в наших предшествующих работах [1-4].

Цель и задачи: уточнение исторической эволюционной картины ВГВ в Сибири, подразумевающее: а) определение степени генетической разобщенности популяций ВГВ в различных группах коренного населения; б) определение времени дивергенции схожих вариантов ВГВ, циркулирующих в различных локальных группах.

Основные результаты. Всего исследовали 340 последовательностей ВГВ размером 800-1600 нуклеотидов, включающих области Pre-S/S генома ВГВ. Большая часть изолятов (82%) принадлежала к генотипу D, также были обнаружены изоляты генотипов A (5%) и C (13%). Встречаемость отдельных субгенотипов ВГВ значительно отличалась в различных исследуемых группах: субгенотип D1 (основной субтип HBsAg – ayw2) превалировал в группах казахов, русских, телеутов, тувинцев и объединенной группе Таймыра; D2 (ayw3) – среди якутов, кетов и в группе Ямало-Ненецкого АО; D3 (ayw2) – в группах алтайцев, бурят и чукчей. Субгенотип A2 (adw2) наиболее часто встречался среди якутов, а C1 (adrq+) – среди чукчей и на Таймыре (Таблица). По встречаемости HBsAg, субгенотипов ВГВ и субтипов HBsAg группы отличались статистически достоверно, что говорит об их эпидемиологической изолированности друг от друга.

Для оценки времени возникновения того или иного субгенотипа ВГВ в Сибири использовали модель молекулярных часов с максимальной скоростью накопления мутаций в геноме ВГВ $7{,}9 \times 10^{-5}$ замен на сайт в год [5]. Вероятных общих предков субгенотипов внутри одной этнической группы реконструировали как консенсусы последовательностей, входящих в соответствующие клады.

Заключение. Анализ среднего времени эволюции от предков субгенотипов в группах до современных изолятов показал, что субгенотипы D2 и A2 вернее всего были интродуцированы в коренное население Сибири не позднее 160 лет назад, D1 и D3 – 180 лет, C1 – 200 лет. Таким образом, можно предположить, что впервые ВГВ в Сибири появился не позднее начала 19 века.

Ссылки на литературные источники:

1. Мануйлов В.А., Осипова Л.П., Нетесова И.Г. и др. // Мол. генет. микробиол. вирусол. – 2015. – № 1. – С. 28-35.

2. Семенов А.В., Останкова Ю.В., Герасимова В.В. и др. // Журн. инфектол. – 2016. – № 1. – Т. 8. – С. 57-65.

3. Чуланов В.П. Эпидемиологическое и клиническое значение генетической гетерогенности вирусов гепатита А и В. Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук. – Москва. – 2013. – 380 с.

4. Tallo T., Tefanova V., Priimagi L. et al. // J. Gen. Virol. – 2008. – V. 89. – P. 1829-39.

5. Osiowy C., Giles E., Tanaka Y. et al. // J. Virol. – 2006. – V. 80. – N. 21. – P. 10307-14.

Таблица

Встречаемость генетических вариантов ВГВ и время циркуляции основных субгенотипов в исследованных группах

Группа, кол-во изолятов ВГВ	Дата сбора образцов, встречаемость HBsAg в группе	Результаты встречаемости субгенотипов ВГВ и субтипов HBsAg
Респ. Алтай: алтайцы (21)	1993-1997; HBsAg(+): 13%	D1: 19%, D2: 5%, **D3: 76%;** ayw2: 95%, ayw3: 5%
Респ. Алтай: казахи (9)	1999-2000; HBsAg(+): 5%	**D1: 89%,** D2: 11%; ayw2: 89%, ayw3: 11%
Респ. Тыва: тувинцы (18)	2004-2008; HBsAg(+): 11%	**D1: 100%;** ayw2: 100%
Кемеровская обл.: телеуты (5)	2003; HBsAg(+): 10%	**D1: 100%;** ayw2: 80%, ayw4: 20%
ЯНАО: ханты, коми, ненцы, селькупы (33)	1992-2006; HBsAg(+): 2%	A2: 6%, C1: 3%, D1: 9%, **D2: 49%,** D3: 12%, D (др.): 21%; adw2: 9%, adrq+: 3%, ayw2: 30%, ayw3: 55%, ayw4: 3%
Красноярский край: кеты (2)	2000; HBsAg(+): 6%	**D2: 100%;** ayw3: 100%
Таймыр: долганы, нганасаны (32)	2000; HBsAg(+): 13%	**C1: 19%, D1: 72%,** D3: 9%; adrq+: 19%, ayw2: 78%, ayw4: 3%
Иркутская обл.: буряты (35)	2005-2006; HBsAg(+): 7%	A2: 3%, C1: 9%, D1: 17%, D2: 28%, **D3: 40%;** adw2: 6%, adrq+: 6%, ayw2: 48%, ayw3: 37%, ayw4: 3%
Иркутская обл.: русские (8)	2003-2005; HBsAg(+): 4%	**D1: 88%,** D2: 12%; ayw2: 100%
Чукотка: чукчи (123)	1999-2012; HBsAg(+): 10%	A2: 2%, **C1: 27%,** D1: 6%, D2: 13%, **D3: 51%;** adw2: 2%, adrq+: 27%, ayw2: 58%, ayw3: 13%
Якутия: якуты (54)	2004-2014; HBsAg(+): 10-24%	**A2: 22%,** C1: 2%, D1: 2**%, D2: 50%,** D3: 24%; adw2: 22%, adrq+: 2%, ayw2: 17%, ayw3: 57%, ayw4: 2%

СТРУКТУРА ГЕНОТИПОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА С У ПАЦИЕНТОВ ГЕПАТОЛОГИЧЕСКОГО ЦЕНТРА Г. АЛМАТЫ

Орадова А.Ш., Шопаева Г.А.

Казахский национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова, Алматы, Республика Казахстан

Введение: Гепатит С (ГС) является одной из серьезных проблем здравоохранения Республики Казахстан и характеризуется широкой распространенностью, отсутствием вакцинопрофилактики и развитием хронических заболеваний печени, таких как цирроз (у 20% перенесших ГС) и гепатоцеллюлярная карцинома (у каждого пятого). Появилась необходимость в количественных методах определения вирусов для мониторинга противовирусной терапии. По данным ВОЗ, ежегодно в мире инфицируются вирусом гепатита С (ВГС) 3–4 млн. человек. Установлено, что генотип ВГС определяет характер течения и эффективность противовирусного лечения хронического ГС (ХГС).

Цель работы: изучить распределение генотипов HCV среди пациентов Гепатологического центра (ГЦ) г. Алматы, Республика Казахстан.

Материалы и методы исследования. В исследование были включены 50 образцов плазмы крови, полученных от пациентов с ХГС. Средний возраст обследованных лиц составил 46,5 лет (64% – женщины, 36% – мужчины). Молекулярно-биологические исследования выполнены методом ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием тест-системы «Амплисенс®HCV –1/2/3-FL» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (Россия).

Результаты исследования. Распределение генотипов ВГС оказалось следующим: генотип 1 выявлен в 58% (29/50), генотип 2 выявлен в 14% (7/50), а генотип 3 – в 28% (14/50) пациентов. В структуре генотипов ВГС у больных среди мужчин превалировал генотип 3 ВГС (64,3%), а среди женщин - генотип 1 (76 %). Зарегистрирована неравномерность распределения генотипов ВГС: генотип 1 выявлен у 29 (58%), при

этом на долю женщин приходится 76%, а на долю мужчин – 24% случаев, генотип 2 выявлен у 7 (14%), при этом на долю женщин приходится 71,4%, а на долю мужчин – 28,6% случаев, тогда как при генотипе 3 – у 14 обследованных лиц (28%), при этом на долю мужчин – 64,3% случаев, а на долю женщин приходится 35,7%.

Выводы. Таким образом, отмечена неравномерность распределения генотипов ВГС между полами, с преобладанием женщин, инфицированных 1 и 2 генотипами ВГС, в сравнении с генотипом 3, которым чаще были инфицированы мужчины

Количество методов, используемых для диагностики вирусных гепатитов, непрерывно растет. Несомненно, что технический прогресс в определении антител, белкового анализа и генодиагностики наряду с расширением наших знаний вирусов и патогенеза вирусных инфекций приведут к появлению новых высокоспецифичных и высокочувствительных методов, удобных для клинического применения.

КОМПЛЕКСНОЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕПАТИТА С У БОЛЬНЫХ ГЕПАТОЛОГИЧЕСКОГО ЦЕНТРА Г. АЛМАТЫ

Орадова А.Ш., Шопаева Г.А.

Казахский национальный медицинский университет имени С.Д. Асфендиярова, Алматы, Республика Казахстан

Введение. Расширение возможностей в лечении и профилактике вирусных болезней с использованием противовирусных препаратов, иммуномодуляторов и вакцин с различным механизмом действия нуждается в быстрой и точной лабораторной диагностике. Узкая специфичность некоторых противовирусных препаратов также требует быстрой и высокоспецифичной диагностики инфицирующего агента. Появилась необходимость в количественных методах определения вирусов для мониторинга противовирусной терапии.

Существенную роль играет лабораторная диагностика пациентов, инфицированных вирусом гепатита С (HCV).

Цель работы. Нами была поставлена цель - провести комплексное ПЦР-исследование больных гепатитом С (ГС) и выявить частоту встречаемости различных генотипов HCV у больных Гепатологического центра г. Алматы.

Материалы и методы. В скрининге участвовали 32 больных Гепатологического центра г. Алматы в рамках научного проекта Министерства образования и науки Республики Казахстан на 2015–2017 гг. Было исследовано 32 образца плазмы крови больных ГС. Из исследованных образцов была выделена РНК HCV, определена вирусная нагрузка и генотип HCV, с помощью ПЦР в режиме реального времени. Детекцию РНК HCV, определение вирусной нагрузки и генотипа вируса проводили с использованием наборов реагентов «АмплиСенс *HCV*-FL», «АмплиСенс *HCV*–Monitor-FL», «АмплиСенс *HCV*-1/2/3-FL» (ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора), соответственно. Был проведен опрос и анкетирование всех больных, включенных в исследование.

Результаты исследований. Во всех исследованных образцах была выявлена РНК HCV. В исследуемой группе пациентов с ГС наблюдалось преобладание 1-го генотипа HCV, 50% (16/32) случаев, в сравнении с генотипами 2 и 3 - по 25% (8/32) случаев каждый. У всех обследованных пациентов выявлена высокая вирусная нагрузка (>10^6 МЕ/мл).

Заключение. Хронический гепатит С (ХГС) является распространенной инфекцией как на территории Казахстана, так и в г. Алматы. Доминирующим генотипом HCV является 1-й генотип. При наблюдении за больными ГС существенную роль играют количественная оценка содержания вируса в плазме крови больного и определение генотипа возбудителя. Ведущим путем передачи при ХГС на территории г. Алматы, по данным опроса и анкетирования, является парентеральный путь – 60% случаев, половой путь был установлен для 40 % случаев.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА А, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ НА ТЕРРИТОРИИ СИБИРИ В 2011-2015 ГГ.

Пименов Н.Н., Карандашова И.В., Комарова С.В., Неверов А.Д., Чуланов В.П.

ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение. Актуальность проблемы гепатита А (ГА) в России определяется практически повсеместной циркуляцией возбудителя инфекции, ежегодной регистрацией вспышек заболевания как среди населения так и в организованных коллективах, а также ростом заболеваемости среди взрослого населения, тяжесть течения инфекции у которых значительно выше, чем у детей.

Анализ мирового и российского опыта применения молекулярно-генетических методов в изучении биологического фактора эпидемического процесса ГА показал их высокую значимость для системы эпидемиологического надзора за данной инфекцией. Молекулярно-генетические методы успешно применяются как для характеристики циркулирующих генотипов и штаммов, так и для расследования вспышек заболевания. Однако в литературе имеется незначительное число публикаций, посвященных характеристике генотипов и штаммов вируса гепатита А (HAV) в азиатской части России.

Целью исследования стало определение генетического разнообразия HAV на территории Сибири

Материалы и методы. Исследовано 980 образцов сыворотки крови, полученных от больных ГА и контактных с ними лиц, проживающих в 152 населенных пунктах одиннадцати субъектов РФ, входящих в состав Сибирского федерального округа (Иркутская, Новосибирская, Кемеровская, Омская и Томская области, Алтайский, Забайкальский и Красноярский края, Республики Алтай, Бурятия, Хакасия). Сбор образцов проводился в период с 2011 по 2015 гг. в рамках планового мониторинга за циркуляцией HAV (спорадические случаи заболевания), а также при расследовании эпидемических вспышек ГА.

Для выделения РНК HAV из образцов сыворотки крови использовали набор реагентов «АмплиСенс HAV-FL» производства ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора. Генотипирование полученных изолятов HAV осуществляли методом ПЦР с субтипспецифическими праймерами к генотипам IA, IB, IIIA, IIIB. С целью определения принадлежности изолятов HAV к различным штаммам проводилось секвенирование двух вариабельных областей генома: VP1/2B (410 п.н.) и 2C (648 п.н.). Филогенетический анализ штаммов проводили методом Neighbor-Joining с помощью программы Geneious 6.0. Статистическая значимость филогении оценивалась методом bootstrap (1000 повторов). Достоверными считались различия между ветвями при бутстреп-значении 70% и более. Идентичные по двум областям генома изоляты относили к одному штамму вируса. Штаммы, отличающиеся друг от друга не более чем на две нуклеотидные замены в пределах двух секвенированных областей, относили к генетически близкородственным.

Результаты. В результате проведенного исследования было выделено 787 изолятов HAV. Генотипическая принадлежность была определена для 595 изолятов (в остальных случаях генотип не определен из-за низкой вирусной нагрузки). Во всех регионах установлена циркуляция двух субтипов HAV: IA и IIIA. Субтип IB был выявлен у 7 заболевших, посещавших страны Средиземноморского региона.

В целом на территории Сибири за изучаемый период частота выявления изолятов HAV субтипа IA (80,9%) в 4,5 раза превышала частоту выявления изолятов субтипа IIIA (18,2%). При анализе структуры выявленных субтипов по отдельным территориям обнаружены значительные отличия даже в соседних регионах. Так в Алтайском крае и Новосибирской области распространенность субтипа IIIA за весь исследуемый период составила 57% и 38%, соответственно, тогда как в Республике Алтай, Забайкальском крае, Омской и Томской областях вирус субтипа IIIA не выявлялся.

Штаммы HAV, выделенные при расследовании вспышек ГА в 3 регионах Сибири, принадлежали субтипу IA (Республика Бурятия 2011 г., Красноярский край 2012 г. и 2014 г.) и субтипу IIIA (Новосибирская область 2011 г., Республика Бурятия 2013 г., Красноярский край 2014 г.).

Филогенетический анализ показал, что большинство обнаруженных на территории Сибирского федерального округа штаммов HAV субтипов IA и IIIA кластеризовались со штаммами, выявленными нами на территории России в предыдущие годы. Штаммы HAV субтипов IA и IIIA, эндемичные для стран Средней Азии (Таджикистан, Кыргызстан), встречались значительно реже.

Штаммы HAV субтипа IA, вызвавшие вспышки ГА в Республике Бурятия в 2011 г., значимо отличались от изолятов, выявленных ранее на территории РФ. Наиболее филогенетически близкими к ним являются штаммы IA субтипа HAV, циркулирующие на территории Монголии, Китая и Японии.

Штаммы HAV субтипа IA и IIIA, выявленные во время вспышек ГА в Красноярском края в 2012 и 2014 гг и Новосибирской области относились к кластерам штаммов, типичных для среднеазиатского региона.

Вспышки ГА, произошедшие в Республике Бурятия в 2013 г. и в Красноярском крае в 2014 г. были вызваны штаммами субтипа IIIA, характерными для территории азиатской части России.

Заключение. В 2011-2015 гг. на территории Сибири циркулировали штаммы HAV субтипов IA и IIIA с выраженным доминированием субтипа IA, что согласуется с опубликованными ранее данными по частоте встречаемости субтипов HAV в России в целом. Значительные отличия по степени генетического разнообразия HAV между соседними регионами доказывают необходимость ведения молекулярно-генетического мониторинга за циркулирующими штаммами HAV на территории каждого отдельного субъекта РФ.

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО АНАЛОГА КАПСИДНОГО БЕЛКА ВИРУСА ГЕПАТИТА Е И ИССЛЕДОВАНИЕ ЕГО АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ

Алаторцева Г.И.[1], Нестеренко Л.Н.[1], Лухверчик Л.Н.[1], Сидоров А.В.[1], Доценко В.В.[1], Нурматов А.З.[3], Нурматов З.Ш.[3], Касымов О.Т.[3], Кюрегян К.К.[1,2], Михайлов М.И.[1,2], Зверев В.В.[1]

[1]ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», г. Москва, Россия
[2]ФГБОУДПО «РМАПО» МЗ РФ, г. Москва, Россия
[3]НПО «Профилактическая медицина» МЗ КР, г. Бишкек, Кыргызская Республика

Введение. Осуществление эпидемиологического надзора за гепатитом Е (ГЕ) невозможно без разработки диагностических тестов для определения специфических серологических маркеров. Сложность антигенного состава, генетическая неоднородность и различия в эпидемиологии ГЕ в различных географических регионах мира требуют совершенствования методов серодиагностики. Разработка рекомбинантных аналогов антигенов штаммов вируса гепатита Е (ВГЕ), циркулирующих на территории СНГ, значительно облегчит задачу создания и со-

вершенствования тест-систем для серодиагностики ГЕ и проведения эпидемиологических исследований на постсоветском пространстве. Наибольшую диагностическую ценность имеет капсидный белок ВГЕ – ORF2.

Цель. Разработка рекомбинантного аналога белка ORF2 ВГЕ 1-го генотипа и исследование его антигенных свойств.

Методы. В работе были использованы молекулярно-биологические методы (синтез олигонуклеотидов, ПЦР в режимах реального времени и обратной транскрипции, секвенирование ДНК, клонирование в экспрессирующей системе *E.coli*), биотехнологические и биохимические (получение биомасс в биореакторое, электрофорез, хроматографическая очистки белков), серологические (Вестерн-блоттинг и иммуноферментный анализ - ИФА) и биоинформационные методы (пакет программ анализа нуклеотидных и полипептидных последовательностей «Vector NTI», база данных NCBI).

Результаты. На основе биоинформационного анализа рассчитаны специфические праймеры для клонирования фрагментов бицистронной субгеномной РНК ВГЕ 1-го генотипа. На матрице РНК ВГЕ, выделенной от больного из Киргизии, с использованием олиго-dT-праймеров получена ДНК-копия. С помощью синтезированных праймеров проведена ПЦР-амплификация с последующим А/Т клонированием. В итоге были получены клоны *E.coli* CCOO1 (XL-Blue), содержащие в составе рекомбинантной плазмиды фрагменты ДНК размером 2,3 т.п.н., соответствующие субгеномной РНК вируса, что подтверждено секвенированием. Эти фрагменты ДНК использованы для получения рекомбинантного штамма E.coli, синтезирующего антиген ORF2 1-го генотипа в виде слитного с β-галактозидазой полипептида, содержащего С-концевой фрагмент белка ORF2 По результатам анализа белкового состава лизатов рекомбинантных клонов E.coli методами электрофореза и Вестерн-блоттинга выбраны штаммы-продуценты с максимальным синтезом целевого продукта. Отработаны условия культивирования рекомбинантных штаммов для получения биомасс и методика очистки рекомбинантных антигенов. Для оценки основных характеристик (специфичность, чувствительность, кросс-реактивность) полученного рекомбинантного белка ORF2 ВГЕ 1-го генотипа было сформировано несколько контрольных панелей образцов сывороток крови: от больных ГЕ и реконвалесцентов, здоровых доноров, больных гепатитами А, В, С, ВИЧ-инфицированных, больных инфекционным мононуклеозом (ЭБ) и цитомегаловирусной инфекцией (ЦМВИ). Все отобранные образцы были предварительно протестированы на содержание IgG-антител к ВГЕ с помощью наборов реактивов «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» и «Вектоген Е – IgG». Все образцы от больных ГЕ и реконвалесцентов при взаимодействии с белком ORF2 были положительными. Исследования образцов от здоровых доноров не выявило ложноположительных результатов. Исследования образцов из групп сравнения (пациенты с вирусными гепатитами А, В и С, ВИЧ- инфицированные лица, больные ЭБ и ЦМВИ) не выявили ложноположительных результатов, что свидетельствует о антигенной специфичности полученного рекомбинантного антигена и отсутствии перекрестной реактивности с маркерами инфицирования возбудителями других вирусных гепатитов и возбудителей инфекционной патологии печени другой этиологии.

Выводы. Экспериментально подтверждена возможность применения полученного рекомбинантного антигена ORF2 ВГЕ в диагностических тестах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (Соглашение № 14.613.21.0057 от 28.07.2016, уникальный идентификатор проекта RFMEFI61316X0057).

АПРОБАЦИЯ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАЦИЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ВИРУСА ГЕПАТИТА С «АМПЛИСЕНС® HCV-RESIST-SEQ» НА ПАНЕЛИ QCMD-2015

Булатова К.В., Карандашова И.В., Чуланов В.П., Шипулин Г.А.

ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение. Для лечения хронического гепатита С (ХГС) с 2011 г. используются препараты прямого противовирусного действия (ППВД), мишенями которых являются неструктурные белки вируса гепатита С (HCV). В настоящее время в мире одобрены к применению ППВД 4 классов - ингибиторы NS3/4A–протеазы, нуклеозидные и ненуклеозидные ингибиторы NS5B-полимеразы и ингибиторы NS5A-белка. В большинстве случаев применение ППВД при лечении ХГС приводит к формированию у пациента устойчивого вирусологического ответа (УВО). Одной из причин неэффективности терапии являются мутации лекарственной устойчивости HCV. В связи с высокой генетической вариабельностью возбудителя эти мутации могут быть сформированы как во время проведения противовирусной терапии (ПВТ), так и до приема лекарственных препаратов. Информация о наличии данных мутаций в геноме HCV необходима для выбора оптимальной тактики лечения ХГС. В клинической лабораторной диагностике для определения причин лекарственной устойчивости HCV используют молекулярно-биологические методы – амплификацию NS3-, NS5A- и NS5B-регионов генома вируса с последующим анализом полученных ПЦР-фрагментов с помощью прямого секвенирования. Поскольку у больных ХГС популяция вируса может содержать мутантные и дикие варианты вируса в различных соотношениях, то при выявлении мутаций лекарственной устойчивости HCV одной из характеристик используемого метода является его чувствительность к минорному варианту.

В ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора разработан набор реагентов «АмплиСенс® HCV-Resist-Seq», предназначенный для выявления мутаций устойчивости HCV к

ППИД методом ПЦР с последующим секвенированием продуктов амплификации. Результатом исследования, проведенного с помощью разработанного набора, является информация по каждой аминокислотной позиции, ассоциированной с мутацией лекарственной устойчивости к соответствующему препарату в зависимости от субтипа вируса.

В 2015 году международной организацией QCMD (Quality Control for Molecular Diagnostics) для внешней оценки качества лабораторных исследований, проводимых с использованием молекулярно-биологических методов, была разработана панель контрольных образцов QCMD-2015 HCV DR и проведено пилотное тестирование – «HCV Drug Resistance Typing EQA Pilot Study», которое включало анализ 11 позиций в NS3-регионе генома HCV, ассоциированных с формированием устойчивости к ингибиторам NS3/4A–протеазы, - 54, 55, 80, 122, 132, 155, 156, 158, 168, 170 и 175.

Целью работы была апробация набора реагентов «АмплиСенс® HCV-Resist-Seq» на панели контрольных образцов QCMD-2015 HCV DR в рамках пилотного исследования «QCMD-2015 HCV Drug Resistance Typing EQA Pilot Study».

Материалы и методы. Панель QCMD HCV DR15 состояла из 5 замороженных образцов плазмы крови человека (№№ 1-5), содержащих HCV 1a субтипа в концентрации $4x10^3$ МЕ/мл. Исследование и обработка полученных результатов были проведены с использованием формы комплектации 1 разработанного набора реагентов «АмплиСенс® HCV-Resist-Seq», предназначенной для анализа NS3-региона генома HCV, в соответствии с инструкцией. Прямое секвенирование проводили на автоматическом секвенаторе 3500xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

Результаты. Фрагмент NS3-региона генома HCV был амплифицирован для каждого образца панели. Во всех образцах по ряду анализируемых позиций были выявлены мутантные и/или отличные от дикого типа (WT) варианты, результаты исследования по которым приведены в Таблице. Во всех остальных сайтах были выявлены кодоны WT, которые полностью соответствовали приведенным в отчете QCMD.

Таблица. Результаты тестирования образцов панели QCMD-2015 HCV DR

№ образца панели	№ кодона в NS3-регионе HCV	Кодон WT	Результаты (кодон)		Выявленная мутация	Баллы[1]
			Отчет QCMD-2015	АмплиСенс®		
1	PR-54	ACT	WST[2] (ACT, TCT, AGT, TGT)	ACT, TCT	T54S	0
	PR-80	CAA	AAA	AAA	Q80K	1
	PR-132	ATC	ATT	ATT	-	1
	PR-155	AGG	AAG	AAG	R155K	1
2	PR-54	ACT	ACY (ACC, ACT)	ACT	-	0
	PR-80	CAA	AAA	AAA	Q80K	1
	PR-132	ATC	ATT	ATT	-	1
	PR-155	AGG	AAG	AAG	R155K	1
	PR-158	GTG	GTA	GTA	-	1
3	PR-80	CAA	AAA	AAA	Q80K	1
	PR-132	ATC	ATT	ATT	-	1
	PR-155	AGG	ARG (AAG, AGG)	AAG	R155K	1
	PR-158	GTG	GTA	GTA	-	1
4	PR-155	AGG	AAG	AAG	R155K	1
	PR-175	CTA	CTG	CTG	-	1
5	PR-132	ATC	ATT	ATT	-	1
	PR-155	AGG	AGR (AGA, AGG)	AGA, ACG	R155K	1
	PR-170	ATC	GTC	GTC	-	1

[1] Согласно правилам отчета «Hepatitis C Virus Drug Resistance Typing 2015 EQA Pilot Study Report», за полное соответствие выявленной последовательности нуклеотидов корректному кодону начисляется 1 балл.

[2] Используется обозначение полиморфных позиций в соответствии с кодом IUPAC

Заключение. Результаты, полученные при тестировании набора реагентов «АмплиСенс® HCV-Resist-Seq», практически полностью совпали с заявленными характеристиками образцов исследуемой панели - было набрано 53 балла из 55 возможных. Аналогичные результаты показали 4 участника проводимого исследования. Таким образом, указанную сумму получили 19,2% (5/26) участвующих в пилотном тестировании организаций. Две лаборатории (7,7%) набрали по 55 и 54 балла, соответственно, остальные 17 участников (65,4%) – 52 балла и менее. Не выявление в 54 кодоне образцов №№ 1 и 2 всех заявленных позиций, возможно связано с низким содержанием минорных вариантов, концентрация которых ниже заявленной аналитической чувствительности тестируемого набора. В указанных пробах именно 54 позиция оказалась наиболее проблемной для большинства участников исследования - в образце № 1 корректно провели определение 6 из 26 участников (23%), в образце № 2 – 14 (53,8%). Таким образом, набор реагентов «АмплиСенс® HCV-Resist-Seq» был успешно апробирован на панели образцов QCMD-2015 HCV DR и продемонстрировал высокие диагностические характеристики.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ ГЕПАТИТА С НА ТЕРРИТОРИИ ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ

Афанасьев М.В., Синьков В.В., Соловьев С.Ю.

ОГАУЗ «Иркутский областной клинический консультативно-диагностический центр», Иркутск, Россия

Введение. Гепатит С (ГС) является одной из актуальнейших проблем мирового и отечественного здравоохранения. Известно, что эффективность стандартной противовирусной терапии ГС во многом определяется генотипом вируса гепатита С (HCV), что делает необходимым проведение исследований по идентификации генетических вариантов вируса, преобладающих на той или иной территории и/или в определенной социальной, возрастной или клинической группе.

Цель исследования. Оценка генетического разнообразия HCV, циркулирующего в различных возрастных группах на территории Иркутской области.

Материалы и методы. Исследованы собранные с марта по декабрь 2016 г. сыворотки крови 1202 пациентов, зарегистрированных на территории Иркутской области и имеющих подтвержденный серологическими и/или молекулярно-биологическими методами диагноз ГС (острая или хроническая форма).

Выделение РНК осуществлялось комплектом реагентов «МагноСорб» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) на роботизированной станции пробоподготовки Neon 100 (Xiril, Швейцария).

Определение генотипа вируса выполнялось с использованием набора реагентов «АмплиСенс® HCV-генотип-FL», позволяющего дифференцировать 1a, 1b, 2, 3a, 4, 5a и 6 генотипы HCV (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия).

Для анализа результатов исследования, формирования промежуточных таблиц, осуществления расчётов использовали программные ресурсы пакета Microsoft Office Excel 2003.

Основные результаты. Среди обследованных пациентов преобладали женщины (51,5 %; 619/1202). Средний возраст обследованных составил 43,5 (±13,6) года, минимальный – 9 мес., максимальный – 82 года. В выборке преобладали пациенты следующих возрастных групп: от 31 до 40 лет (37,9 %; 456/1202), от 41 до 50 (18,9 %; 227/1202), от 51 до 60 (16,2 %; 195/1202), от 61 до 70 (10,8 %; 130/1202) и от 21 до 30 (10,2 %; 123/1202).

Всего обнаружено четыре варианта генотипов вируса с преобладанием в общей выборке генотипов 1b (47,6 %; 573/1202) и 3a (42,5 %; 511/1202). Генотип 2 выявлен в 7,1 % (86/1202) случаев, 1a – в 2,2 % (27/1202) и в 0,4 % - обнаружены смешанные генотипы HCV - 1a и 1b , 1b и 3a, 2 и 3a.

Удельный вес инфицированных вирусом генотипа 1b среди мужчин составил 41,8 %, среди женщин – 48,4 %. Генотип 3a выявлялся среди мужчин и женщин в 47,5 % и 37,8 % случаев, соответственно. Несмотря на некоторую разницу, достоверных различий в частоте встречаемости определенных генотипов среди мужчин и женщин не обнаружено.

Среди пациентов в возрасте 21-30, 31-40 и 41-50 преобладал 3a генотип: он обнаруживался у 53,7 % обследованных (433/806) и в целом достоверно чаще, чем в иных возрастных группах ($\chi^2 = 93,65$; $p < 0,001$). Генотип 1b преобладал в группе до 20 лет и группе старше 51 года.

Исследуемая выборка состояла из клинических образцов, собранных в 32 районах Иркутской области, в том числе из всех крупных населенных пунктов тестируемого региона.

Выявлена повышенная частота встречаемости вируса 1b генотипа в южных районах области, по сравнению с рядом северных районов - 464/931 и 111/271, соответственно ($\chi^2 = 7,36$; $p=0,0067$). Распределение частот встречаемости основных генотипов HCV в наиболее крупных городах Иркутской области представлено в Таблице.

Заключение. Обнаружен ряд особенностей распределения частот встречаемости 1b и 3 генотипов HCV в определенных возрастных группах, а также на различных территориях Иркутской области.

Таблица

Распространенность генотипов HCV в крупных городах Иркутской области

Город	Генотип HCV			
	1a	1b	2	3
Иркутск	3,4 % (20/591)	50,9 % (301/591)	7,1 % (42/591)	38,2 % (226/591)
Ангарск	2,5 % (1/40)	52,5 (21/40)	7,5 % (3/40)	37,5 % (15/40)
Усолье-Сибирское	2,8 % (1/35)	34,2 % (12/35)	8,5 % (3/35)	54,2 % (19/35)
Черемхово	0	48,5 % (16/33)	6,0 % (2/33)	45,5 % (15/33)
Братск	1,2 % (1/81)	37,0 % (30/81)	6,2 % (5/81)	54,3 % (44/81)
Тулун	2,7 % (1/37)	35,1 % (13/37)	8,1 % (3/37)	54,1 % (20/3)
Усть-Илимск	0	42,2 % (30/71)	4,2 % (3/71)	53,5 % (38/71)
Усть-Кут	0	40,7 % (11/27)	18,5 % (5/27)	40,7 % (11/27)

ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОТИПИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ВИРУСА ГЕПАТИТА С (ВГС), ЦИРКУЛИРУЮЩЕГО У НАСЕЛЕНИЯ НИЖЕГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ В 2007-2015 ГГ.

Быстрова Т.Н., Михайлова Ю.В., Полянина А.В., Антипова О.В.

ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, Н. Новгород, Россия

Введение. Актуальность проблемы гепатита С (ГС) обусловлена повсеместным распространением, значительным социально-экономическим ущербом, высокой частотой хронизации, активным вовлечением в эпидемический процесс лиц репродуктивного и трудоспособного возраста. В связи высокой генетической гетерогенностью вируса гепатита С (ВГС) качественное и количественное определение РНК и его генотипа имеет не только безусловное клиническое значение для подбора схемы и контроля лечения, но и является перспективным для решения эпидемиологических задач на региональном уровне.

Цель. Определить и охарактеризовать структуру генотипов ВГС в Нижегородском регионе для совершенствования эпидемиологического надзора за инфекцией.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужили образцы сывороток крови (n=4634), полученные от взрослых лиц за период 2006-2015 гг., включая больных ГС (n=637); лиц из группы повышенного риска инфицирования: медицинских работников, пациентов отделений гематологии и гемодиализа и наркологических стационаров (n=3997). Контрольную группу («условно-здоровое» население) составили лица, проходившие догоспитальное обследование в поликлиниках города и доноры (n=16375). Для характеристики структуры генотипов/субтипов ВГС, циркулирующего среди населения Нижегородской области исследовано 458 РНК-позитивных образцов сыворотки крови. Для выявления территориальных особенностей распределения субтипов ВГС проанализировано 149 РНК-позитивных образцов от больных ГС, госпитализированных в инфекционные стационары Н.Новгорода, Дзержинска, Балахны. У 187 больных ХГС установлено возможное время инфицирования в интервале от 1 до 20 лет, на основании которого выявлены изменения доли отдельных субтипов в структуре генотипов ВГС с 1995 по 2015 гг. Лабораторное исследование включало определение анти-ВГС иммуноглобулинов классов М и G (core, NS3, NS4, NS5) с использованием соответствующих ИФА тест-систем (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск), Качественное выявление и генотипирование РНК ВГС проводили методом ПЦР в режиме «Real-time» с помощью диагностикумов фирмы ООО «ИнтерЛабСервис», г. Москва («АмплиСенс HCV- FL», «АмплиСенс HCV-генотип-FL»).

Результаты. В Нижегородской области установлена циркуляция ВГС четырех субтипов: 1a - 2,8±0,8%; 1b - 42,9±2,7%; 2 - 5,3±1,2%; 3a - 40,1±2,7%. В целом, структура генотипов ВГС с одинаковым превалированием в общей популяции населения 1b и 3a отражает общую картину генотипического разнообразия вируса, характерную для Центрального, Приволжского и Южного федеральных округов России. В 8,0±2,2% установлены ассоциации двух субтипов вируса: 1b+3a, 1a+1b. Доля нетипированных образцов составила 4,7±1,2 %.

Выраженная неравномерность эпидемического процесса, характерная для гепатит С-инфекции, проявилась в неоднородности генотипического разнообразия ВГС на территории исследуемого региона. Так, в отличие от Н. Новгорода и Балахны, где не выявлено различий в частоте обнаружения доминирующих субтипов Ib и 3a, в Дзержинске Ib достоверно преобладал над 3a (47,1±12,1% и 23,5±10,2% соответственно) (p<0,05). Остальные субтипы вируса выявлялись значительно реже и также неравномерно на исследуемой территории.

Структура и соотношение генотипов вируса отличались у различных контингентов населения. Так, у медицинских работников и пациентов отделений гематологии установлено наличие только двух субтипов вируса, где 1b (81,0±8,5%) достоверно преобладал над 3a (19,0±8,5%) (p<0.01). Среди пациентов гемодиализа, которые были обследованы в динамике, на протяжении двух лет (2012-2013 гг.) был выявлен только 1b субтип ВГС, что может свидетельствовать о возможном внутрибольничном инфицировании этих лиц и, как следствие, о формировании внутрибольничного генетического варианта вируса. В 2014 г. в этой группе начинает циркулировать ВГС субтипа 3a, о чем свидетельствуют единичные находки данного субтипа в образцах от лиц, впервые получающих сеанс гемодиализа. Среди группы лиц «условно здорового» населения кроме субтипов 1b и 3a, превалирующих в равной доле (43,8±12,4% и 50,0±12,5% соответственно), в единичных случаях обнаружен 2 генотип ВГС. Наибольшее разнообразие выявленных субтипов установлено среди лиц с наркотической зависимостью и пациентов инфекционных стационаров. При этом в первой группе показано доминирование 3a (52,2±6,0%), в то время как у пациентов инфекционных стационаров субтипы 1b, 3a обнаружены с одинаковой частотой. Встречаемость субтипа 1a была одинаковой в обеих группах, а 2 генотип ВГС почти в 2 раза чаще встречался среди пациентов наркологических стационаров (4,7±1,7% и 7,7±3,0% соответственно). Только среди последних двух контингентов населения выявлены ассоциации субтипов ВГС: 1b+3a, 1a+1b. Полученные результаты по неоднородности генотипической структуры вируса среди различных контингентов населения подтверждают предположение о связи отдельных субтипов вируса с определенными путями его передачи.

Аналогично данным литературы, с увеличением возраста инфицированных лиц установлена тенденция к равномерному увеличению удельного веса субтипа 1b (с 25,0±4,2% до 65,2±5,7% (p<0,01)) и снижению доли субтипа 3a (с 54,8±4,8% до 14,5±4,2% (p<0,01)). Только в возрастной группе старше 50 лет субтип 1b достоверно преобладал над субтипом 3a (p<0,05), а у лиц в возрасте 20-29 лет в 2 раза чаще встречался субтип 1a, чем у лиц старше 30 лет.

В результате проведенного динамического иссле-

дования установлены изменения в общей структуре генотипов ВГС в 2007- 2015 гг. по сравнению с периодом 1995-2000 гг., проявившиеся в снижении удельного веса субтипа 1b и росте доли субтипа 3a, появлении с 2006 г. циркуляции субтипа 1a.

Смена доминирующего генотипа и факт появления ранее не циркулирующего субтипа вируса свидетельствуют о необходимости динамического мониторинга генотипической структуры ВГС в интересах эпидемиологического надзора за ГС.

Заключение. Для изучения эволюционных проявлений эпидемического процесса ГС в современных условиях показана необходимость исследования региональных особенностей генотипической структуры ВГС, особенно превалирующих генотипов. Мониторинг структуры генотипов ВГС должен явиться необходимой составляющей эпидемиологического надзора и контроля на конкретной территории для планирования региональной стратегии предотвращения дальнейшего распространения ГС-инфекции.

ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗА 3A ПОДАВЛЯЕТ ТРАНСКРИПЦИЮ И РЕПЛИКАЦИЮ ВИРУСА ГЕПАТИТА В, НО УВЕЛИЧИВАЕТ УРОВНИ ккзДНК НА МОДЕЛИ КЛЕТОК HEPG2-1.1MERHBV *IN VITRO*

Брезгин С.А.[1,2], Костюшев Д.С.[2], Зуева А.П.[2,3], Липатников А.Д.[2,4], Чуланов В.П.[2]

[1]Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия
[2]ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия
[3]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
[4]Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

Введение. Установлено, что при хроническом гепатите В (ХГВ) белок вируса гепатита В (HBV) HBx усиливает экспрессию ДНК-метилтрансфераз DNMT1 и DNMT3A [1], тем самым увеличивая степень метилирования как геномной ДНК человека, так и вирусной кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК (ккзДНК). При этом транскрипция ккзДНК, число копий ДНК HBV и относительные уровни РНК вируса снижаются [2,3]. Вместе с этим происходит достоверное снижение HBeAg и HBsAg HBV [3,4]. Действие ДНК-метилтрансфераз на поддержание пула ккзДНК ранее изучено не было.

Цель. Изучение влияния гиперэкспрессии DNMT3A на изменение пула ккзДНК на клеточной линии гепатоцеллюлярной карциномы HepG2, содержащий трансген генома вируса гепатита В HBV1.1-Mer.

Материалы и методы. В качестве модели использовалась клеточная линия HepG2, содержащая трансген HBV под индуцибельным Tet-on промотором. Клетки высевались на 6-луночные планшеты, при достижении ~50-процентной конфлуентности монослоя клетки подвергались трансфекции плазмидой, кодирующей DNMT3A, с использованием Lipofectamine 2000 согласно инструкции производителя. Одновременно с трансфекцией осуществлялась индукция вирусного цикла путём введения в среду доксициклина. Через 24 часа клетки отмывались с помощью PBS и культивирование продолжалось в течение следующих 24 и 48 часов. Выделение нуклеиновых кислот (НК) осуществлялось с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп» согласно протоколу производителя. Часть выделенных НК обрабатывались ДНК-азой I типа, через 30 минут суммарная РНК выделялась при помощи «РИБО-преп», после чего ставилась реакция обратной транскрипции с помощью комплекта реагентов «РЕВЕРТА-L». Экспрессия вирусных sРНК и прегеномной РНК (pgРНК), а также DNMT3A анализировалась методом ПЦР в реальном времени со специфическими праймерами и зондами TaqMan, в качестве референсного гена использовался *GAPDH*. Для определения концентрации ДНК HBV использовали набор реагентов «АмплиСенс® HBV-монитор FL». Часть суммарных НК обрабатывалась ферментом Plasmid Safe ATP-dependent DNAse согласно протоколу производителя, и после инактивации фермента анализировалась методом ПЦР в реальном времени со специфическими праймерами и зондами TaqMan к ккзДНК HBV. В качестве референсного гена использовался бета-глобин. Анализ экспрессии sРНК, pgРНК, DNMT3A и ккзДНК HBV проводился по методу ddCt, количественный расчет общей ДНК вируса осуществлялся согласно инструкции «АмплиСенс® HBV-монитор FL». Статистическая обработка результатов осуществлялась методом One-way ANOVA ($p<0,05$) с использованием программы IBM SPSS Statistics 21.0.0.0.

Основные результаты. При гиперэкспрессии DNMT3A отмечено достоверное снижение уровней суммарной ДНК, прегеномной и sРНК HBV, однако по сравнению с контрольным значением наблюдалось статистически значимое увеличение уровня ккзДНК HBV примерно в 2.5 раза ($p<0,05$) к 48 часам после активации вирусного цикла, которое сохранялось и к 72 часам.

Заключение. Гиперэкспрессия DNMT3A коррелирует со снижением репликации HBV, однако гиперметилирование вирусной ккзДНК приводит к увеличению ее пула, что может являться одним из механизмов поддержания персистентности возбудителя.

Список используемой литературы

1. Zhu YZ, Zhu R, Shi LG et al. Hepatitis B virus X protein promotes hypermethylation of p16 (INK4A) promoter through upregulation of DNA methyltransferases in hepatocarcinogenesis // Exp Mol Pathol. 2010 Dec;89(3):268-75.(570).

2. Vivekanandan P, Daniel HD, Kannangai R, Martinez-Murillo F, Torbenson M. Hepatitis B virus replication induces methylation of both host and viral DNA // J Virol. 2010 May; 84(9):4321-9. (111).

3. Vivekanandan P, Thomas D, Torbenson M. Methylation regulates hepatitis B viral protein expression // J Infect Dis.

2009 May 1;199(9):1286-91.(113).

4. Guo Y, Li Y, Mu S, Zhang J, Yan Z. Evidence that methylation of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in liver tissues of patients with chronic hepatitis B modulates HBV replication. J Med Virol. 2009 Jul;81(7):1177-83.(104).

ВЫЯВЛЕНИЕ МУТАЦИЙ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ УСТОЙЧИВОСТЬ ВИРУСА ГЕПАТИТА В (HBV) К ПРОТИВОВИРУСНЫМ ПРЕПАРАТАМ

Галиуллин Н.И., Нагимова Ф.И., Шошокин В.А., Герасимов В.В., Уразов Н.Г.

ГАУЗ «Республиканский центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями Министерства здравоохранения Республики Татарстан», Казань, Россия

Целью исследования было выявление пациентов - носителей резистентных штаммов вируса гепатита В (ВГВ).

Материалы и методы. В общей сложности было проведено генотипирование 65 образцов вируса ВГВ. Генотипирование вируса проводили с использованием набора «TRUGENE HBV Genotyping Kit» и системой секвенирования «ДНК OpenGene» (Siemens, Германия). Интерпретация результатов проведена с использованием ресурса Geno2pheno.

Результаты. По результатам интерпретации полученных последовательностей базой данных Geno2pheno 34 (52,3%) пациента являются носителями ВГВ генотипа А, 31(48,4%) – генотипа Д, и только 2 (0,3%.) - генотипа С.

Из 65 пациентов инфицированных ВГВ, 12 (18,5%) являются носителями резистентных штаммов вируса. Трое из них были инфицированы ВИЧ и принимали антиретровирусные препараты (но не ламивудин) и только один пациент (№ 8) с моноинфекцией ВГВ прошел курс лечения энтекавиром. Остальные пациенты никаких специфических антивирусных препаратов не принимали. На этом основании мы полагаем, что, по меньшей мере, 8 пациентов были инфицированы первично резистентными штаммами ВГВ. В пользу этого предположения свидетельствует и тот факт, что в регионе проживания обследованных пациентов ни адефовир, ни тенофовир в терапии ВГВ-инфекции не применялись.

Результаты интерпретации полученных последовательностей приведены в Таблице, из которой видно, что почти все пациенты являются носителями штаммов ВГВ, резистентных к двум или трем лекарственным препаратам, а с учетом «неизвестных» мутаций в значимых для развития резистентности положениях, даже к 5 антивирусным препаратам. Исключение представляет только пациент № 12, у которого выявлены две «неизвестные» мутации: I169K и S202R к энтекавиру

В случаях резистентности к ламивудину наблюдаются следующие аминокислотные замены: V173G, A181V, L180M, M204I и M204V. При этом 4 пациента (№1, № 4, 7 и №9) являются носителями штаммов вируса, имеющих по паре мутаций: V173G + A181V; L180M + M204I и L180M + M204V.

Резистентность к адефовиру у пациентов № 1 и 2 определяется мутацией A181V, а у пациентов № 5, 8 и 10 - мутацией N236T.

Таблица. Аминокислотные замены у резистентных штаммов вируса гепатита В

№	Генотип/ субтип ВГВ		Аналоги нуклеоз(т)идов				
			Ламивудин	Адефовир	Энтекавир	Тенофовир	Телбивудин
1	A	A2	**Резистент.**	**Резистент.**	**Неизв. мут.**		**Резистент.**
			V173G,A181V	A181V	I169K, T184Y		A181V
2	D	D1	**Резистент.**	**Резистент.**			**Резистент**
			A181V	A181V			A181V
3	D	D1	**Неизв. мут.**		**Неизв. мут.**		
			L180R		L180R		
4*	D	D2	**Резистент.**		**Част резист.**		**Резистент.**
			L180M, M204I		L180M, M204I		M204I
5	A	A2		**Резистент**.		**Лим. чувст.**	
				N236T		N236T	
6*	D	D1	**Неизв. мут.**		**Неизв. мут.**		**Неизв. мут.**
			M204T		M204T		M204T
7*	D	D1	**Резистент.**		**Част. рез**		**Резистент.**
			L180M, M204I		L180M, M204I		M204I

№	Генотип/ субтип ВГВ		Аналоги нуклеоз(т)идов				
			Ламивудин	Адефовир	Энтекавир	Тенофовир	Телбивудин
8**	C	A2		**Резистент.**		**Лим. чувст.**	
				N236T		N236T	
9	D	D1	**Резистент.**		**Резистент.**		**Резистент.**
			L180M, M204V		L180M, M204V, S202G		M204V
10	D	D2		**Резистент.**		**Лим. чувст.**	
				N236T		N236T	
11	D	D1	**Резистент.**	**Неизв. мут.**	**Резистент.**	**Неизв. мут.**	**Резистент.**
			M204I	N236Y	T184I, M204I	N236Y	M204I
12	A	A2			**Неизв. мут.**		
					I169K,S202R		

* пациенты № 4, 6 и 7 являются носителями ВГВ/ВИЧ-инфекции, принимавшими антиретровирусные препараты
** пациент, принимавший энтекавир

В одном случае резистентность к энтекавиру определяется парой мутаций T184I, M204I (пациент № 11), в другом случае (пациент № 9) - тремя мутациями: L180M, S202G, M204V. Примечательно, что у пациентов № 4 и 7 мутации, имеющиеся у пациента № 9: L180M и M204V вызывают только частичную резистентность. Вероятно, в развитии резистентности у последнего пациента решающую роль играет мутация S202G.

У пациентов № 5, 8 и 10 лимитированная чувствительность к тенофовиру связана с мутацией N236T. В тоже время с этой мутацией связана выраженная резистентность к адефовиру.

Как уже отмечалось выше, в регионе проживания обследованных пациентов ни адефовир, ни тенофовир в терапии ВГВ-инфекции не применялись. Тем не менее, 5 пациентов являются носителями резистентных штаммов ВГВ к адефовиру, а 3 - имеют лимитированную чувствительность к тенофовиру. Следует отметить, что у одного пациента (№ 11) в значимом для развития резистентности положении 236 наблюдается замена аспарагина на тироксин. Сведений о влиянии на развитие резистентности указанной замены в доступной литературе найти не удалось.

Резистентность к телбивудину вызвана одиночными мутациями в двух положениях: A181V (пациенты № 1 и 2) и M204I (пациенты № 4, 7 и 11).

Заключение. Полученные в ходе проведенных исследований данные свидетельствуют, что:

1) почти каждый пятый (18,5%) пациент с ВГВ является носителем резистентного штамма вируса, причем большая часть из них инфицирована первично-резистентными штаммами вируса;

2) У резистентных штаммов ВГВ наблюдаются следующие замены аминокислот: L180M, A181V, T184I, S202G, M204L/I/V, N236T;

3) в значимых для развития резистентности положениях обнаружены замены аминокислот: I169K, V173G, L180R, T184Y**,** S202R, M204T, M236I, эффект которых на развитие резистентности пока неизвестен;

4) у пациентов, носителей резистентных штаммов ВГВ, устойчивость наблюдается одновременно к 2, 3, а с учетом потенциально значимых мутаций к 4 и даже к 5 используемым в настоящее время лекарственным препаратам, что указывает на необходимость расширения спектра противовирусных препаратов.

БИОИНФОРМАЦИОННАЯ ДИАГНОСТИКА САЙТОВ РЕКОМБИНАЦИИ В ГЕНОМНЫХ СТРУКТУРАХ ШТАММОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА С

Гаращенко Н.Е.[1,2], Джиоев Ю.П.[1,3], Злобин В.И.[1], Парамонов А.И.[1,3], Степаненко Л.А.[1], Малов С.И.[1], Колбасеева О.В.[1], Ботвинкин А.Д.[1], Малов И.В.[1]

[1]ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет», Иркутск, Россия
[2]Иркутский национальный исследовательский технический университет, Иркутск, Россия
[3]ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», Иркутск, Россия

Введение. Методы биоинформатики стали важнейшим инструментом в диагностике и типировании новых генетических свойств в структурах генов и геномов всех живых систем [1, 2, 3]. Также все возрастающую роль они стали играть в диагностике вирусных инфекций. Посредством этих методов можно проводить более глубокий анализ причинно-следственных связей при трансформации генетической информации в фенотипическую [4]. Реальным становится проведение прогностических исследований, позволяющих предвидеть формирование

и развитие патогенетических особенностей конкретного вируса. В данной работе акцент сделан на биоинформационную диагностику в геномных структурах вируса гепатита С (ВГС) сайтов рекомбинации [5, 6]. ВГС является глобально и динамично эволюционирующим патогеном для человека среди флавивирусов [7]. В мире около 3% населения инфицировано ВГС и почти 350 тысяч умирает ежегодно. На течение инфекционного процесса гепатита С (ГС) большое влияние оказывает высокая генетическая гетерогенность вируса, связанная с большой мутационной активностью [5].

Целью исследования являлось выявление в геномах штаммов 2 и 6 генотипов ВГС сайтов рекомбинации посредством методов биоинформатики и сравнительная оценка разнообразия их профилей.

Материалы и методы. В анализ были включены 26 геномов 2 генотипа ВГС и 46 геномов 6 генотипа из GenBank. Определение локусов и профилей сайтов рекомбинации производили с помощью 7 программных методов, реализованных в пакете программ RDP v 4.61. Статанализ проводили методами из программной системы Splits Tree 4 и Phi –тестирования.

Результаты. Среди штаммов 2 генотипа ВГС, включенных в исследование, были обнаружены 2 рекомбинантные последовательности. Эти рекомбинанты были определены практически всеми использованными программами с высокой степенью достоверности. У рекомбинанта AF169003-2a был выявлен один сайт рекомбинации, у AB690460-2a - три. Указанные изоляты ВГС были выделены в Японии, причем AF169003-2a - от больного хроническим ГС, а AB690460-2a от больного с фульминантным течением ГС. Их родительские штаммы соответствовали им как по месту выделения (Япония), так и по их клиническим свойствам. Сайт рекомбинации штамма AB690460-2a был расположен в гене NS5b, а 3 сайта AB690460-2a занимали последовательные позиции в разных генах его генома - C-E1-E2-p7-NS2, NS2-NS3 и NS3-NS4a-NS4b-NS5a-NS5b. Все выявленные рекомбинанты и их родительские штаммы относились к субтипу 2a ВГС, что говорит о гомологичной рекомбинации (см. Таблицу). Среди 46 штаммов 6 генотипа ВГС было также обнаружено два рекомбинанта - DQ480515-6a с одним сайтом рекомбинации и DQ480518-6a с 2 сайтами. Родительские штаммы соответствовали выявленным рекомбинантам как по месту выделения (Гонконг), так и по клиническим свойствам (больные хроническим ГС после лечения интерфероном). У этих рекомбинантов сайты рекомбинации расположены на стыке нескольких генов - NS3-NS4a-NS4b у DQ480515 и E2-p7-NS2 и NS4b-NS5a у DQ480518 (см. Таблицу). Все рекомбинанты и их родительские штаммы относятся к субтипу 6a, что также свидетельствует о гомологичной рекомбинации.

Таблица. Рекомбинантные штаммы 2 и 6 генотипов ВГС

Позиции сайтов	Штамм-рекомбинант	RDP	Geneconv	Maxchi	Chimaera	SiSscan	3Seq
8482-9264	AF169003-2a	$1{,}14x10^{-03}$	$6{,}13x10^{-10}$	$5{,}51x10^{-03}$	$1{,}89x10^{-02}$	$3{,}33x10^{-10}$	NS*
1-2630	AB690460-2a	$2{,}04x10^{-112}$	$3{,}66x10^{-123}$	$1{,}44x10^{-43}$	$1{,}33x10^{-43}$	$5{,}09x10^{-51}$	$2{,}20x10^{-158}$
2631-3224		$8{,}12x10^{-62}$	$7{,}41x10^{-70}$	$1{,}65x10^{-20}$	$3{,}89x10^{-14}$	$6{,}91x10^{-21}$	$1{,}40x10^{-18}$
4347-9251		$3{,}73x10^{-87}$	$3{,}06x10^{-93}$	$2{,}68x10^{-48}$	$4{,}43x10^{-36}$	$2{,}14x10^{-64}$	$1{,}99x10^{-151}$
1844-2916	DQ480518-6a	$3{,}72x10^{-12}$	$1{,}28x10^{-16}$	$1{,}76x10^{-08}$	$1{,}83x10^{-06}$	$1{,}62x10^{-12}$	$6{,}92x10^{-05}$
5474-6389		$6{,}14x10^{-12}$	$4{,}73x10^{-14}$	$3{,}02x10^{-08}$	$1{,}23x10^{-05}$	$1{,}18x10^{-11}$	NS
4638-5505	DQ480515-6a	$1{,}20x10^{-06}$	$2{,}08x10^{-10}$	$2{,}31x10^{-05}$	$7{,}52x10^{-03}$	NS	NS

* нет сайтов рекомбинации

Обсуждение. Как видим, сайты рекомбинации у рекомбинантов 2 и 6 генотипов ВГС занимают позиции, как в структурной, так и в неструктурной областях генома вируса и проходят по типу гомологичной рекомбинации. Рекомбинант 2 генотипа - AF169003-2a - отличается от остальных тем, что единственный сайт зафиксирован в гене NS5b. У трех остальных выявленных рекомбинантов в сайты рекомбинации включены несколько протяженных регионов генома вируса. Наши результаты подтверждают, что наравне с мутационной изменчивостью рекомбинационная трансформация также вносит большой вклад в способность ВГС «уходить» от иммунной системы человека. Считаем, что при разработке лекарственных средств против ВГС необходимо учитывать не только мутационную, но и рекомбинационную изменчивость патогена.

Список литературы

1. Гаращенко Н.Е., Джиоев Ю.П., Парамонов А.И., и др. Реконструкция сайтов рекомбинации в геномных структурах штаммов генотипа 6 вируса гепатита С // Бюллетень ВСНЦ.-2016.-№5.-С.100-104.

2. Джиоев Ю.П., Зелинская Н.Е., Парамонов А.И., и др. Биоинформационная детекция сайтов рекомбинации в геномных структурах штаммов генотипа 2 вируса гепатита С // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). 2015.-№2.-С. 98-102.

3. Зелинская Н.Е., Джиоев Ю.П., Парамонов А.И., и др. Профили сайтов рекомбинации в геномных структурах штаммов генотипа 2 вируса гепатита С, выявленных методами биоинформатики // «Журнал Инфектологии». 2015. Т.7. №3.С.37.

4. Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, et al. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic

RNAi, and hypothetical mechanisms of action // Biology Direct. 2006. № 1. P.7.

5. Калинина О.В. Вирус гепатита С: механизмы изменчивости, классификация, эволюция // Вопросы вирусологии. 2015. №5. С.5-10.

6. Bertrand Y, Topel M, Elvang A, Melik W, Johansson M. First dating of a recombination event in mammalian tick-borne flaviviruses // PLoS One. 2012. V. 7(2), e31981.

7. Smith DB, Bukh J, Kuiken C, et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource // Hepatology. 2014. V. 59(1). P. 318-327.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА В НА ТЕРРИТОРИИ ХАБАРОВСКОГО КРАЯ

Котова В.О., Балахонцева Л.А., Троценко О.Е.

ФБУН «Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора, Хабаровск, Россия

Введение. Проблема вирусного гепатита В остаётся одной из приоритетных в здравоохранении в связи с высокой частотой развития хронических форм болезни. Несмотря на успехи, достигнутые в области специфической профилактики и лечения, вирусный гепатит В продолжает оставаться самой распространенной хронической вирусной инфекцией. Заболеваемость населения Хабаровского края хроническим гепатитом В в период 2010-2014 г.г. в 10 и более раз превышала аналогичный показатель для острой формы гепатита В – от 9,4 случая на 100 тыс. населения в 2014 г. до 21,5 случаев в 2011 г.

Популяция ВГВ гетерогенна, включает 10 генотипов и большое число субгенотипов ВГВ, для которых свойственно относительно устойчивое географическое распределение. Генотип D по-прежнему доминирует в большинстве субъектов Российской Федерации.

Территории, входящие в состав Дальневосточного Федерального округа (ДФО), в силу удаленности от центра России и особого географического положения, имеет развитые экономические и социальные связи со странами Дальнего зарубежья, среди которых основными партнерами ДФО являются страны Юго-Восточной Азии, гиперэндемичные по заболеваемости вирусным гепатитом В. Кроме того, в последние годы отмечается интенсификация миграционных процессов, в том числе высокий рост трудовой миграции из стран Ближнего и Дальнего зарубежья, способствующий завозу возбудителей в РФ. Проведение регулярного мониторинга циркуляции генотипов вируса гепатита В на территории ДФО России позволит выявить завозные случаи заболевания.

Цель исследования. Изучить генетическое разнообразие вируса гепатита В (ВГВ), циркулирующего на территории Хабаровского края среди коренного населения и трудовых мигрантов, прибывающих из стран Ближнего и Дальнего зарубежья.

Материал и методы. Было исследовано 66 образцов плазмы крови от пациентов, проживающих на территории г.Хабаровска (37 проб) и в п.Троицком Хабаровского края (29 проб) с диагнозом хронический вирусный гепатит В и 37 образцов сыворотки/плазмы крови от пациентов, первично положительных на HBsAg, из следующих стран: Турция (18,9%), Узбекистан (18,9%), Кыргызстан (5,4 %), Таджикистан (10,8 %), Вьетнам (16,2 %), Китай (21,6 %), Молдавия (2,7 %), Северная Корея (5,4 %). Средний возраст обследованных составил 46,0±1,4 лет. Выявление ДНК HBV с целью последующего генотипирования проводили методом двухступенчатой ПЦР с вложенными праймерами к участкам S и P генома ВГВ. Для определения нуклеотидной последовательности анализируемых фрагментов вирусных геномов проводили прямое секвенирование ампликонов на ДНК-анализаторе модели 3500 (AppliedBiosystems/LifeTechnologies, США). Филогенетический анализ полученных нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы MEGA 5.0

Результаты исследования. Проведенный филогенетический анализ участка S региона генома ВГВ штаммов вируса гепатита В, циркулирующих среди больных ХГВ, проживающих в Хабаровском крае, показал генетическое их разнообразие по генотипам и субгенотипам. Показано, что как среди пациентов, проживающих в городе Хабаровске, так и жителей п.Троицкого, доминирует D генотип, на который в настоящем исследовании приходило 87,9±4,0% (58 проб). Генотип А был выявлен в 4 пробах (6,1±2,9%), генотип С – также в 4 (6,1±2,9%) образцах.

На филограмме полученные в Хабаровском крае штаммы ВГВ генотипа D и штаммы, размещенные в GenBank, сгруппировались в несколько кластеров и разделились на три отдельные монофилетические группы, отличающиеся между собой по субгенотипам: D1 -14 (24,1±5,6%), D2 – 23 (39,7±6,4%) и D3 – 21 (36,2±6,3%). Субгенотип Д1 был представлен, в основном, штаммами из Хабаровска, которые имели сходство с вирусами, выделенными в Кемеровской области в 2003 г., Китае - в 2009 и 2013 г.г., Судане - в 2011 г.

Внутри группы субгенотипа D2 штаммы образовали несколько подгрупп. В одну из подгрупп, кроме выделенных в Хабаровском крае штаммов, вошли вирусы, изолированные в разные периоды от больных гепатитом В из Сербии, Бельгии, Белоруссии, Республики Саха (Якутия) и Красноярского края. Другая подгруппа представлена штаммами, выделенными от больных ВГВ Хабаровского края, и штаммами от больных из Новой Каледонии, Ямало-Ненецкого автономного округа России.

Штаммы, которые были отнесены к субгенотипу Д3, имели сходство с таковыми, выделенными в Красноярском крае в 2000 г., в Белоруссии в 2005 г.

К генотипу С ВГВ отнесены 4 из типированных в Хабаровском крае вирусов. На филогенетическом дереве они составили единую группу совместно со штаммами, выделенными в разные годы в Китае и Вьетнаме.

4 варианта ВГВ субтипа А образовали единый кластер со штаммами из Японии, Бельгии, Голландии.

Таким образом, продемонстрированное в Хабаровском крае генетическое разнообразие штаммов ВГВ свидетельствует как о российском их происхождении, так и о возможности завоза возбудителей из других стран.

Филогенетический анализ части S региона генома ВГВ у трудовых мигрантов показал, что все изученные штаммы принадлежат к генотипам D, A, B и C. В этой группе также преобладал генотип D. Он был выявлен в 15 (4,05±8,1 %) образцах. В 12 (32,4±7,7%) случаях был определен генотип C. К генотипу A были отнесены 2 пробы (5,4±3,7%), и в 8 случаях был обнаружен генотип B (21,6±6,8%).

Выводы

1. Проведенный анализ генотипического разнообразия вируса гепатита В среди населения Хабаровского края показал что, как среди городского населения, так и коренного сельского, преобладает генотип D ВГВ, который был представлен тремя субгенотипами D1, D2, D3. Удельный вес генотипа D ВГВ среди обследованных лиц из г. Хабаровска и пос. Троицкого Нанайского района Хабаровского края в целом составил 87,9±4,0 %. На долю генотипов A и C пришлось по 6,1±2,9%.

2. Использование молекулярно-генетических методов исследования в системе эпидемиологического надзора за гепатитом В позволит повысить качество эпидемиологической диагностики при обследовании эпидемических очагов за счет более точного установления связи случаев заболевания, идентификации источника возбудителя инфекции, определения путей и факторов передачи, а также выявить завозные случаи заболевания.

ОСОБЕННОСТИ МЕЖГЕННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ С

Гончарова И.А.[1], Бабушкина Н.П.[1], Белобородова Е.В.[2], Тарасенко Н.В.[1,2], Марков А.В.[1], Пузырев В.П.[1,2]

[1]НИИ медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, г. Томск, Россия

[2]ФГБОУ ВО «СибГМУ» Минздрава России, г. Томск, Россия

Введение. Хронический гепатит С (ХГС) является сложным патологическим состоянием, развитие которого обусловлено взаимодействием генома вируса и генами организма «хозяина», белковые продукты которых относятся к различным биохимическим путям. Анализ генотипических комбинаций по полиморфным вариантам генов различных функциональных классов, локализованных в разных группах сцепления, может оказаться полезным в поиске биохимических путей, определяющих то или иное состояние организма.

Таким образом, **целью** настоящего исследования была оценка межгенных взаимодействий через выявление комбинаций генотипов, отличающихся от случайного распределения (находящихся в гаметическом неравновесии), при ХГС.

Материалы и методы. В исследование включены больные ХГС (n=184) в возрасте от 16 до 73 лет (средний возраст обследованных составил 40,2±13,9 лет; мужчин – 71%, женщин – 29%). Контрольная группа представляла собой популяционную выборку, состоящую из жителей г. Томска (n=285) и включала 54% мужчин и 46% женщин (средний возраст 56,7±8,4 лет). По этнической принадлежности все индивиды являются русскими. Генотипирование 58 однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), которые входили в состав панели разработанной в НИИ медицинской генетики [1], выполнено с помощью масс-спектрометрии на приборе Sequenom MassARRAY® (США). Анализ ассоциаций генетических маркеров с ХГС проводился в программной среде R с помощью стандартного пакета «stats» (версия 3.0.3) [2]. Неравновесие по сцеплению между парами локусов оценивали с помощью теста отношения правдоподобия в пакете программ Arlequin v.3.1.1.1. [3]. Наличие функциональной связи между SNP предполагалось в случае существенного гаметического неравновесия ($p \leq 0{,}000000$). Патологически значимыми считались комбинации генов «выпадающие» (есть в контроле, но нет у больных) или «появляющиеся» в группе больных и отсутствующие в контроле.

Основные результаты. Выявление пар маркеров, находящихся в гаметическом неравновесии, проводилось для 11 SNP в генах различных функциональных классов. Часть из которых показали ассоциации с ХГС: ген АДАМ-подобного дицеклина - ADAMDEC1 (rs10087305, rs3765124), трансформирующий фактор роста бета-1 - TGFB1 (rs1800469), ACSL1 (rs1996546), металлопротеазы 3 - MMP3 (rs679620), интегрина бета 5 - ITGB5 (rs1007856), некодирующей антисмысловой РНК гена CDKN2B - CDKN2BAS1 (rs1333049), LIG1 (rs20579), рецептора тирозинкиназы III - KDR (rs2071559), KIAA1462 (rs3739998), ген транспортного белка эфиров холестерола - CETP (rs708272) [4].

В контрольной группе проанализированные SNP находятся между собой в тесной функциональной связи. Выявлено 30 пар маркеров, находящихся в гаметическом неравновесии. Наибольшее количество связей показали маркеры rs1333049 гена CDKN2BAS1 и rs3765124 гена ADAMDEC1, находящиеся в гаметическом неравновесии с каждым из остальных 10 SNP.

В группе больных количество взаимодействующих пар маркеров значительно меньше. Выявлено только 5 таких пар, причем 4 из них являются общими для обеих исследованных групп, это: ITGB5/ CDKN2BAS1, CDKN2BAS1/ ADAMDEC1 (rs3765124), CDKN2BAS1/ KDR и MMP3/ ADAMDEC1 (rs3765124). Кроме этого, у больных выявляется гаметическое неравновесие между генами ADAMDEC1 (rs10087305)/ TGFB1, отсутствующее у здоровых. В контрольной же группе при оценке гаметического неравновесия для данной пары генов, уровень значимости не достигает

значения, выбранного в качестве порогового и равен 0.000594. Возможно что, взаимодействие данной пары генов в группе больных усиливается, а не появляется *de novo*.

Остальные 26 пар межгенных связей, выявленных у здоровых, в группе больных ХГС переходят в класс более слабых взаимодействий или полностью отсутствуют. Так, например, в группе больных пропадают взаимодействия между генами ADAMDEC1 (rs10087305)/ITGB5, ADAMDEC1 (rs10087305)/CDKN2BAS1, ADAMDEC1 (rs3765124)/ CETP, ADAMDEC1 (rs3765124)/ACSL1, ACSL1 (rs1996546)/ CDKN2BAS1, ACSL1(rs1996546)/LIG1 (rs20579), где уровень значимости для гаметического неравновесия у больных больше 0.05, в то время как в контроле эта величина ≤0,000000.

При сравнении спектра генов, вовлеченных в общие для больных и здоровых межгенные пары, и отсутствующие у больных, можно заключить, что гены ADAMDEC1, CDKN2BAS1, ITGB5 вовлечены в биохимические пути, функционирующие как у здоровых, так и у пациентов с ХГС. Вероятно, что данные гены могут оказывать влияние на развитие ХГС при взаимодействии с генами ACSL1, CETP и LIG1, которые составляют межгенные пары, пропадающие у больных по сравнению со здоровыми лицами.

Заключение. Таким образом, можно предположить, что при развитии ХГС значимую роль играют нарушения процессов репарации и рекомбинации ДНК, и биосинтез холестерола, где задействованы продукты генов лигазы - LIG1, гена CETP, ответственного за транспорт эфиров холестерола и гена ACSL1, кодирующего длинные цепи ацил-коА-синтазы.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ (договор № 20 16-04-00840\16).

Список использованной литературы

1. Гончарова И.А., Кучер А.Н., Тарасенко Н.В., Макеева О.А., Слепцов А.А., Брагина Е.Ю., Марков А.В., Пузырев В.П. Разработка панели генетических маркёров фиброгенеза и оценка её информативности для русского населения г. Томска // Медицинская генетика. 2015. Т. 14. № 8 (158). С. 7-12.

2. http://www.R-project.org/

3. Excoffier L., Slatkin M. Incorporating genotypes of relatives into a test of linkage disequilibrium. // Am. J. Hum. Genet. 1998. V. 62. P.171-180.

4. Гончарова И.А., Назаренко М.С., Тарасенко Н.В., Марков А.В., Белобородова Е.В., Пузырев В.П. Генетические маркеры фиброгенеза при хроническом вирусном гепатите С // Медицинская генетика. 2016. Т. 15. № 12 (174). С. 29-36.

ДЕЙСТВИЕ ИНГИБИТОРОВ ГИСТОНОВЫХ АЦЕТИЛТРАНСФЕРАЗ И ДЕАЦЕТИЛАЗ НА РЕПЛИКАТИВНЫЙ ЦИКЛ ВИРУСА ГЕПАТИТА В И УРОВНИ ккзДНК *IN VITRO*

Зуева А.П.[1,2], Костюшев Д.С.[2], Брезгин С.А.[2,3], Чуланов В.П.[2]

[1]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
[2]ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия
[3]Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

Введение. В мире более 350 млн человек страдают хроническим гепатитом В (ХГВ) [1]. Современные противовирусные препараты позволяют эффективно подавлять репликацию возбудителя ХГВ – вируса гепатита В (ВГВ), однако частота полной элиминации вируса из организма больного крайне низка. Это обусловлено особой формой генома ВГВ - кольцевой ковалентно замкнутой ДНК (ккзДНК), которая, являясь «депо» ВГВ в ядре гепатоцита, не доступна для действия противовирусных препаратов [2]. Технология CRISPR/Cas9 может расщеплять ккзДНК по специфическим сайтам, однако полная элиминация ккзДНК пока невозможна [3-5]. Перевод ккзДНК в транскрипционно-активное состояние с помощью факторов эпигеномного ремоделирования может увеличивать доступность ккзДНК и повышать эффективность действия нуклеаз CRISPR/Cas9.

Целью работы был подбор факторов для ремоделирования эпигентетического состояния ккзДНК *in vitro*. В процессе проведения исследования изучено действие факторов эпигеномного ремоделирования на вирусный цикл, определен комплекс условий, при которых целесообразно использовать трихостатин А и гарцинол с системами CRISPR/Cas9.

Материалы и методы. Трансгенные клетки линии гепатомы человека HepG2 с геномом ВГВ 1.1-mer и 1.5-mer обрабатывали трихостатином А в концентрации 0,1 мкМ и гарцинолом в концентрации 5 мкМ в течение 10 мин, 30 мин, 1 часа и 4 часов. ДНК ВГВ выделяли с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп». Число копий ДНК ВГВ и уровни ккзДНК определяли методом ПЦР-анализа в режиме реального времени с зондами TaqMan через 24 ч, 72 ч и 168 ч. HBcAg детектировали методом иммуноцитохимии с анти-HBcAg антителами. Статистическая обработка результатов осуществлялась методом One-way ANOVA ($p<0,05$) с использованием программы IBM SPSS Statistics 21.0.0.0.

Основные результаты. Трихостатин А и гарцинол увеличивают число копий ДНК вируса гепатита В в 2,86 раз и в 2,46 раз, соответственно к третьим суткам наблюдения. Действие трихостатина А и гарцинола на уровни ккзДНК разнонаправленно. С увеличением времени инкубации трихостатин А снижает уровень ккзДНК в 2,62±0,27 раза ($p<0,05$), тогда как гарцинол до 2,49±0,5 раз ($p<0,05$). Максимальная интенсивность окрашивания на HBcAg происходит при действии гарцинола через 168 ч, а при действии трихостатина А уже через 24 ч.

Заключение. Максимальный уровень экспрессии HBcAg отмечен при 24-часовой инкубации с 0,1 мкМ трихостатином А и 5 мкМ гарцинолом. Выявлен комплекс условий, при которых целесообразно использовать данные

малые молекулы с системами CRISPR/cas9: трихостатин А и гарцинол активируют вирусный цикл в концентрации 0,1 мкМ и 5 мкМ, соответственно.

Список литературы

1. Ganem D., Prince AM., 2004. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences // N Engl J Med. V. 350 №11. P. 1118-29.

2. Zoulim F.,2005. New insight on hepatitis B virus persistence from the study of intrahepatic viral cccDNA // J. Hepatol. V. 42. P. 302–308.

3. Dong C., Qu L., Wang H., Wei L., Dong Y., Xiong S., 2015. Targeting hepatitis B virus cccDNA by CRISPR/Cas9 nuclease efficiently inhibits viral replication // Antivir. Res. V. 118. P. 110–117.

4. Kennedy E.M., Bassit L.C., Mueller H., Kornepati A.V., Bogerd H.P., Nie T., Chatterjee P., Javanbakht H., Schinazi R.F., Cullen B.R.,2015. Suppression of hepatitis B virus DNA accumulation in chronically infected cells using a bacterial CRISPR/Cas RNA-guided DNA endonuclease // Virology. V. 476. P. 196–205.

5. Seeger C., Sohn J.A., 2014. Targeting hepatitis b virus with crispr/cas9 // Mol. Ther. Nucleic Acids. V. 3. № 12. e216.

РЕКОМБИНАНТЫ ВИРУСА ГЕПАТИТА С: РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ, ПРОБЛЕМЫ ДИАГНОСТИКИ, КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Калинина О.В.[1,2], Дементьева Н.Е.[3], Дудина К.Р.[4], Белопольская М.А.[5], Козина А.Н.[4], Климова Е.А.[4], Знойко О.О.[4]

[1]ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора, Санкт-Петербург, Россия

[2]Санкт-Петербургский государственный технологический институт «Технический университет», Санкт-Петербург, Россия

[3]Санкт-Петербургский центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, Россия

[4]ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, Москва, Россия

[5]Клиническая инфекционная больница имени С.П. Боткина, Санкт-Петербург, Россия

Введение

Значительная гетерогенность популяции вируса гепатита С (ВГС) связана не только с высокой скоростью мутаций, но также, хотя и в меньшей степени, с рекомбинациями, которые могут приводить к образованию вариантов вируса с новыми фенотипическими характеристиками, за счет комбинации различных «родительских» генов в геноме потомства. Впервые рекомбинантная форма, как номенклатурная единица, была введена в классификацию ВГС в 2005 году [1]. С тех пор идентифицировано еще более 17 рекомбинантных форм, в том числе 8 за последние два года. Выявление сразу нескольких новых межгенотипных рекомбинантов RF2b/1b и RF2b/1a на различных континентах, образованных в результате независимых рекомбинационных событий, свидетельствует о том, что рекомбинационный механизм изменчивости играет более значимую роль в эволюции ВГС, чем предполагали ранее, и что следует ожидать увеличения доли рекомбинантных форм в структуре глобальной популяции ВГС.

Целью исследования была оценка распространенности рекомбинантных вариантов, а также их клиническое значение.

Материал и методы. Изучено 108 изолятов вируса гепатита С, выделенных в 2014-2015 гг от анти-ВГС-позитивных пациентов Москвы и Санкт-Петербурга, включая пациентов с циррозом печени, а также пациентов коинфицированных ВИЧ. Нуклеотидные последовательности определяли методом прямого секвенирования ПЦР фрагментов, полученных с использованием типоспецифических праймеров из различных областей генома ВГС методом ОТ-ПЦР. Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью пакета программ MEGA версия 6,0. Для генотипирования изолятов ВГС также использовали коммерческие тест-системы «РеалБест РНК ВГС-1/2/3» («Вектор-Бест», Россия), «АмплиСенс HCV-1/2/3-FL» и «АмплиСенс HCV-генотип-FL» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия), «Abbott RealTime HCV Genotype II» (Abbott Molecular Inc., США).

Основные результаты. С помощью филогенетического анализа на основе NS5B области генома на изученных территориях выявлена циркуляция восьми субтипов ВГС 1a, 1b, 2a, 2b, 2c, 2k, 3a, 3b и рекомбинантной формы RF2k/1b. В структуре популяции генотипа 2 доля рекомбинанта RF2k/1b составила 45% и 67% в основной популяции населения и среди лиц, ко-инфицированных ВИЧ, соответственно. Результаты филогенетического анализа в совокупности с доступными эпидемиологическими данными свидетельствуют о том, что данный вариант ВГС успешно распространяется во всех группах пациентов, а также о том, что происходит постоянный вброс изолятов RF2k/1b как в основную популяцию населения, так и в группы риска. В настоящее время, изоляты RF2k/1b идентифицированы в России, Белоруссии, Эстонии, Узбекистане, Азербайджане, Швеции, Ирландии, Голландии, Франции, Испании, Бельгии, Греции, Кипре, Канаде, США, а их доля в Грузии достигла 20,8% [2].

Отличительной особенностью рекомбинантов является мозаичность генома, что затрудняет их идентификацию в стандартной лабораторной практике при использовании коммерческих тест-систем для генотипирования ВГС, основанных только на анализе 5'UTR/core области генома. Проведенное нами сравнительное исследование результатов типирования вариантов ВГС с использованием различных коммерческих тест-систем и результатов генотипирования на основе анализа фрагментов NS5B и core областей генома подтвердило невоз-

можность выявления изолятов RF2k/1b при использовании тест-систем российского производства, которые типируют такие изоляты, как генотипа 2. В то же время, дизайн тест-системы «Abbott RealTime HCV Genotype II» (Abbott Molecular Inc., США) позволил определить изоляты RF2k/1b в образцах плазмы крови, хотя в ряде случаев требовалось дополнительное подтверждение, поскольку некоторые изоляты RF2k/1b были типированы как субтип 1b.

Несмотря на большой выбор различных препаратов прямого противовирусного действия (ППВД), геновариант ВГС остается основой выбора препаратов и схемы лечения. Постепенно накапливающиеся клинические данные указывают на то, что стандартизованные схемы терапии для генотипа 2 не являются успешными для получения устойчивого вирусологического ответа у пациентов, инфицированных RF2k/1b, и что рекомбинантные варианты трудно поддаются терапии [3,4]. Это связано с особенностями их генетической структуры, определяющей эффективность лечения как пегилированным интерфероном с рибавирином, так и ППВД.

Заключение

В последние годы в мегаполисах (Москва и Санкт-Петербург) выявлен тренд значительного увеличения доли рекомбинантной формы RF2k/1b в структуре популяции ВГС генотипа 2. В этой связи, особое внимание следует уделять пациентам, инфицированным ВГС генотипа 2, поскольку коммерческие тест-системы российского производства для определения генотипа ВГС не позволяют дифференцировать изоляты RF2k/1b от изолятов 2 генотипа, что является принципиально важным для выбора адекватной схемы лечения. Для успешного выявления рекомбинантной формы RF2k/1b необходимо включение в клиническую лабораторную практику дополнительного субтипирования всех изолятов генотипа 2 на основе анализа NS5B области генома.

Список литературы

1. Smith D.B., Bukh J., Kuiken C. et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment WEB resource. *Hepatology.* 2014; 59 (1): 318-327.

2. Zakalashvili M, Weizenegger M, Bartel J, Markowski M, Zarqua J, Kavsadze S, Kvatadze K, Basheleishvili G, Phirtskhalaishvili T, Dzagania T, Zangurashvili L, Kankia N, Jashiashvili N, Lomidze M, Telia T, Kerashvili V, Zhamutashvili M, Abramishvili N, Rtskhiladze I, Metreveli D. Emergence of Hepatitis C Virus Genotype Recombinant Forms 2k/1b in Georgia. *Clin Lab.* 2016; 62 (7): 1347-1351.

3. Николаева Л.И., Сапронов Г.В., Колотвин А.В., Самохвалов Е.И. Лейбман Е.А., Самоходская Л.М. Гепатит С при инфицировании рекомбинантной формой вируса RF2k/1b: течение и терапия *Эпидем. и инфекц. болезни*. 2014; 3: 9-15.

4. Н.Д. Ющук, О.О. Знойко, К.Р. Дудина, А.Н. Козина, О.В. Калинина. Эффективность противовирусной терапии у больных хроническим гепатитом С, инфицированных вирусами гепатита С рекомбинантных вариантов. *Тер. архив.* 2016; 88 (6): 101-105.

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ РЕКОМБИНАНТНОЙ ФОРМЫ RF1_2K/1B ВИРУСА ГЕПАТИТА С В РОССИИ

Карандашова И.В., Булатова К.В., Чуланов В.П.

ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение. Согласно современной классификации вирус гепатита С (HCV) подразделяют на 7 генотипов, каждый из которых, в свою очередь подразделяется на субтипы [1]. Генотип вируса обозначается арабскими цифрами (1-7), а субтип – строчными латинскими буквами (a, b…). Генотип HCV является наиболее важным фактором, от которого зависит эффективность и тактика противовирусного лечения хронического гепатита С (ХГС). Генотипы 1 и 4 HCV хуже отвечают на противовирусное лечение с использованием ПЕГ-интерферона и рибавирина (ПЕГ-ИФН+РБВ), по сравнению с другими генотипами вируса - 2, 3, 5 и 6, причем 2 генотип возбудителя лучше всего отвечает на применение этой комбинации лекарственных препаратов. С 2011 года для лечения ХГС используются препараты прямого противовирусного действия (ППВД), которые являются ингибиторами неструктурных белков HCV, вовлеченных в жизненный цикл: NS3/4A–протеазы, NS5B-полимеразы и NS5A-белка. Схемы лечения ХГС с использованием ППВД разработаны с учетом генотипа HCV.

В 2002 г на территории Санкт-Петербурга впервые в мире была выявлена рекомбинантная форма (RF) HCV между субтипами 2k и 1b – RF1_2k/1b, причем структурные гены принадлежали 2k субтипу, неструктурные (NS) – 1b [2]. В мире были выявлены и другие RF между вторым и другими генотипами возбудителя – 2b/1a, 2b/1b, 2/5, 2/6i. Однако RF1_2k/1b является самым распространенным рекомбинантом в мире.

Большинство генотипирующих наборов реагентов используют в качестве диагностической мишени 5'-нетранслируемый (5'UTR) и/или Core-регионы генома HCV. Данный формат тестирования не позволяет выявлять RF возбудителя. В связи с этим все известные в настоящее время рекомбинанты вируса при использовании коммерческих наборов определяются как 2 генотип HCV. Для определения RF вируса рекомендуется в качестве дополнительной диагностической мишени использовать NS5B-регион генома HCV.

Целью работы было изучение распространенности RF1_2k/1b HCV среди изолятов вируса, определенных с помощью наборов реагентов, предназначенных для генотипирования HCV, как изоляты 2 генотипа.

Материалы и методы. В исследование были включены 609 образцов плазмы крови пациентов с ХГС, у которых в Лаборатории молекулярных методов Отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, при первичном тестировании, проводимом с использованием наборов реагентов «АмплиСенс® HCV-генотип-FL» или «АмплиСенс®

HBV-1/2/3-FL», был выявлен 2 генотип HCV. Выделение РНК проводили с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп», обратную транскрипцию - с помощью комплекта реагентов «REVERTA-L». Все указанные комплекты реагентов производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (ФБУН ЦНИИЭ). В связи с тем, что указанные наборы для генотипирования в качестве диагностической мишени используют Core-регион или 5'UTR генома HCV, для выявления RF проводили прямое секвенирование ПЦР-фрагмента NS5B-региона генома HCV длиной 690 п.н. Для изолятов, которые были определены по NS5B-региону генома HCV как 1b проводили дополнительное секвенирование ПЦР-фрагмента Core-региона генома вируса размером 580 п.н. Для получения ПЦР-фрагментов и их очистки для проведения последующего секвенирования были использованы реагенты ФБУН ЦНИИЭ. Прямое секвенирование проводили с использованием реагентов и на автоматическом секвенаторе 3500xl Genetic Analyzer производства Applied Biosystems (США). Для сборки полученных секвенированных последовательностей в консенсус-последовательность и проведения филогенетического анализа было использовано программное обеспечение Geneious версии 6.1 (Biomatters Limited, Новая Зеландия, http://www.geneious.com/). Определение субтипической принадлежности полученной секвенированной последовательности проводили с использованием информационных ресурсов NCBI (Viral genotyping tool и BLAST).

Результаты. 2 генотип HCV был подтвержден для 61,9% (377/609) исследованных изолятов, 38,1% (232/609) образцов, включенных в работу, были определены как рекомбинантная форма вируса - RF1_2k/1b. У этих изолятов Core-регион генома принадлежал 2k субтипу HCV, а NS5B-регион – 1b субтипу. При проведении филогенетического анализа все выявленные рекомбинантные формы попадали в кластер штаммов, сформированный RF1_2k/1b.

Среди изолятов 2 генотипа 72,7% (274/377) принадлежали к субтипу 2a HCV, 17,8% (67/377) – к субтипу 2c, 9,5% (36/377) – к субтипу 2k.

Заключение. Результаты, полученные в ходе исследования, показали RF1_2k/1b в российской популяции пациентов с ХГС, для которых был определен 2 генотип, встречается примерно в 40% случаев. С учетом того, что в РФ доля 2 генотипа HCV не превышает 10%, можно предположить, что количество пациентов, инфицированных RF1_2k/1b, составляет порядка 4% случаев, однако необходимо проведение дальнейших исследований по изучению распространенности этой формы возбудителя во всех субъектах РФ.

Вопрос терапии ХГС, вызванного RF1_2k/1b HCV, остается до сих пор открытым. Однако известно, что пациенты, инфицированные этой формой возбудителя, хуже отвечают на терапию с использованием ПЕГ-ИФН+РБВ или с использованием ППРД, предназначенную для лечения 2 генотипа, по сравнению с больными, инфицированными 2 генотипом HCV. В ряде исследований было показано, что при использовании для этих пациентов схем и препаратов, предназначенных для лечения ХГС, вызванного 1 генотипом возбудителя, возрастает количество пациентов, достигших устойчивого вирусологического ответа. Поэтому рекомендуется учитывать возможность наличия рекомбинантных форм вируса у пациентов с установленным 2 генотипом HCV с помощью секвенирования NS5B-региона генома вируса. Также является актуальной разработка набора реагентов для генотипирования HCV, который позволял выявлять, в том числе и RF1_2k/1b.

Список литературы

1. Smith D. et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource//Hepatol. – 2014. - Vol. 59. – P. 318-327.

2. Kalinina O. et al, A Natural Intergenotypic Recombinant of Hepatitis C Virus Identified in St. Petersburg // J. Vir. – 2002. – Vol. 76. – P. 4034-4043.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПАНЕЛИ ОБРАЗЦОВ QCMD-2015 HBV DR С ПОМОЩЬЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ «АМПЛИСЕНС® HBV-RESIST-SEQ»

Карандашова И.В., Чуланов В.П., Шипулин Г.А.

ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение. Гепатит В (ГВ) - инфекционная болезнь человека с преимущественным поражением печени, возбудителем которой является ДНК-содержащий вирус гепатита В (HBV). Согласно оценкам Всемирной Организации Здравоохранения в мире насчитывается порядка 240 млн человек с хроническим течением ГВ (ХГВ). Наиболее тяжелыми исходами ХГВ являются цирроз печени (ЦП) и гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК). Противовирусная терапия (ПВТ) ХГВ должна обеспечивать стойкое подавление репликативной активности вируса, которое ведет к нормализации биохимических показателей, улучшению гистологической картины ткани печени и снижению неблагоприятных исходов ХГВ (ЦП и ГЦК). Достичь данного эффекта позволяют препараты из группы аналогов нуклеозидов/нуклеотидов (АН), ингибиторы РНК-зависимой ДНК-полимеразы (обратной транскриптазы), которая кодируется P-геном вируса гепатита В (HBV). Однако продолжительные курсы ПВТ могут приводить к развитию устойчивости (резистентности) вируса к применяемым лекарственным средствам. Причиной резистентности вируса к действию АН являются мутации лекарственной устойчивости, которые формируются в ревертазном (RT) домене P-гена HBV, как правило, в процессе ПВТ. Проведение исследования для обнаружения этих мутаций рекомендуется больным ХГВ, перед проведением повторной терапии АН, и пациентам с выявленной первичной резистентностью или вирусологическим рецидивом на фоне ПВТ.

В клинической лабораторной диагностике для выявления мутаций лекарственной устойчивости HBV ис-

пользуют молекулярно-биологические методы – амплификацию RT-домена P-гена вируса с последующим анализом полученных ПЦР-фрагментов методами прямого секвенирования или обратной гибридизации (LiPA).

В ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора разработан набор реагентов «АмплиСенс® HBV-Resist-Seq», предназначенный для выявления мутаций устойчивости HBV к АН на основе прямого секвенирования. Результатом исследования, проведенного с помощью набора, является информация по каждой аминокислотной позиции, ассоциированной с мутацией лекарственной устойчивости, в соответствии с которой определяется наличие устойчивости (R), чувствительности (S) или возможности формирования устойчивости (I) HBV к следующим противовирусным препаратам (ПВП) – ламивудину (LAM), телбивудину (LdT), энтекавиру (ETV), тенофовиру (TDF) и адефовиру (ADV).

Начиная с 2012 года ежегодно международной организацией QCMD (Quality Control for Molecular Diagnostics) для внешней оценки качества лабораторных молекулярно-биологических исследований, проводятся программы по выявлению мутаций устойчивости HBV к ПВП (Hepatitis B Virus Drug Resistance Typing).

Целью работы было исследование панели образцов QCMD-2015 HBV DR с использованием набора реагентов «АмплиСенс® HBV-Resist-Seq» для оценки эффективности его работы.

Материалы и методы. Панель QCMD-2015 HBV DR состояла из 5 замороженных образцов плазмы крови (№№ 1-5), содержащих HBV в концентрации от $1{,}46 \times 10^3$ МЕ/мл до $6{,}67 \times 10^5$ МЕ/мл. ДНК выделяли «РИБО-преп», ДНК HBV выявляли с помощью «АмплиСенс® HBV-FL». Мутации лекарственной устойчивости HBV определяли с использованием «АмплиСенс® HBV-Resist-Seq» в соответствии с инструкцией производителя. Все вышеперечисленные наборы и комплекты реагентов производства ФБУН ЦНИИЭ. Прямое секвенирование проводили на автоматическом секвенаторе 3500xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

Результаты. Все образцы панели были ДНК HBV-положительными. Фрагмент RT-домена P-гена вируса, пригодный для секвенирования, был амплифицирован для каждого образца панели. В результате проведенного исследования были получены следующие результаты – образец № 5 в исследуемых сайтах содержал только позиции дикого типа (WT), которые полностью совпали с приведенными в отчете QCMD. В образцах №№1-4 по ряду анализируемых позиций были выявлены мутантные и/или отличные от WT варианты, результаты исследования по которым приведены в Таблице. Во всех остальных сайтах были выявлены кодоны WT, соответствующие приведенным в отчете.

Таблица

Результаты тестирования образцов панели QCMD-2015 HBV DR

№ образца панели	№ кодона в RT-домене P-гена HBV	Кодон WT	Результаты (кодон)		Выявленная мутация	Баллы[1]
			Отчет QCMD-2015	АмплиСенс®		
1	RT_173	GTG	TTG	TTG	V173L	1
	RT_180	CTG	ATG	ATG	L180M	1
	RT_204	ATG	GTG	GTG	M204V	1
2	RT_80	TTA	ATA	ATA	L80I	1
	RT_180	CTG	ATG	ATG	L180M	1
	RT_204	ATG	ATT	ATT	M204I	1
	RT_236	AAC	AAT	AAT	-	1
3	RT_180	TTG	ATG	ATG	L180M	1
	RT_202	AGC	GGC	GGC	S202G	1
	RT_204	ATG	GTG	GTG	M204V	1
4	RT_180	CTG	ATG	ATG	L180M	1
	RT_204	ATG	GTG	GTG	M204V	1
	RT_250	ATG	GTG	GTG	M250V	1

[1] Согласно правилам отчета «Hepatitis B Virus Drug Resistance Typing. 2015 EQA Programme Final Report», за полное соответствие выявленной последовательности нуклеотидов приведенному в отчете кодону начисляется 1 балл.

Заключение. В соответствии с отчетом «Hepatitis B Virus Drug Resistance Typing. 2015 EQA Programme Final Report», результаты, полученные при использовании набора реагентов «АмплиСенс® HBV-Resist-Seq», полностью совпали с заявленными характеристиками образцов панели, в процессе тестирования было набрано максимальное количество баллов - 50. Аналогичные результаты показали 12 участников, использующих прямое секвенирование для анализа проб проводимого исследования. Таким образом, максимальную сумму получили 26,5% (13/49) участвующих в тестировании организаций. Остальные 36 участников (73,5%) набрали от 18 до 49 баллов. Таким образом, набор реагентов «АмплиСенс® HBV-Resist-Seq» как и во время участия в пилотной программе QCMD2012 - Hepatitis B Virus Drug Resistance Typing продемонстрировал высокие диагностические характеристики.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ В ПОЗИЦИЯХ 70 И 91 БЕЛКА CORE ВИРУСА ГЕПАТИТА С НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ И В ДРУГИХ РЕГИОНАХ МИРА

Кичатова В.С.[1,2], Соболева Н.В.[3], Карлсен А.А.[1,2], Исаева О.В.[1,2], Кюрегян К.К.[1,2], Михайлов М.И.[1,2]

[1]ФГБОУ ДПО «РМАНПО» Минздрава России, Москва, РФ
[2]ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, РФ
[3]ФГБНУ «Федеральный научный центр исследования и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН», Москва, РФ

Введение. Комбинированная терапия хронического гепатита С препаратами интерферона (ИНФ) и рибавирином по-прежнему является актуальной клинической практикой в Российской Федерации (РФ) из-за высокой стоимости и низкой доступности препаратов прямого действия. В нашей стране на долю субтипа 1b ВГС (ВГС-1b), хуже поддающегося интерферонотерапии по сравнению с другими генотипами, приходится около 55% всех случаев инфицирования ВГС [1]. В ряде исследований было показано, что замены аминокислот Q/H70R и M91L в участке генома, кодирующем капсидный белок (core) ВГС-1b, ассоциированы с низкой частотой достижения устойчивого вирусологического ответа (УВО) при лечении препаратами ИНФ, а также с повышенным риском развития гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) [2]. Распространенность данных полиморфизмов среди штаммов ВГС-1b, циркулирующих на территории РФ, неизвестна.

Цель исследования. Изучение частоты встречаемости штаммов ВГС, несущих замены Q/H70R и M91L, среди населения РФ в сравнении с другими географическими регионами.

Материалы и методы. В анализ было включено 314 последовательностей участка core ВГС. Вирус выделялся из сывороток крови пациентов, собранных нами с 2007 по 2014 год в разных регионах РФ. Также в выборку образцов из РФ были включены 95 нуклеотидных последовательностей, импортированных из базы данных GENBANK. Для групп сравнения были взяты нуклеотидные последовательности из Лос-Аламосской базы данных США: Азия (n=374), Северная Америка (n=1343), Европа (n=493). Помимо субтипа 1b, в анализ были включены последовательности других, наиболее распространенных в нашей стране субтипов ВГС - 1a, 3a, 2k/1b.

Результаты. Среди изолятов ВГС-1b, встречающихся на территории РФ, мутантная аминокислота Q70R наблюдается в 26,7% случаев, что достоверно реже, чем в Северной Америке (59.6%, $p<0.01$) и чаще, чем в Европе (17.7%, $p<0.01$). Различий между показателями РФ и Азии, а также исследуемых стран в целом, выявлено не было. Замена H70R в РФ встречается в 4,7% случаев, что достоверно чаще, чем в Европе (0.3%, $p<0.01$), но не отличается от распространенности в остальных регионах. Мутантная аминокислота M91L встречается среди российских изолятов ВГС-1b в 80,6% случаев, что достоверно чаще, чем в остальных регионах в целом (74.9% $p<0.05$) и в Азии (43.8%, $p<0.01$). В то же время, показатели распространенности этой мутации в РФ, странах Северной Америки и Европы схожи. Среди последовательностей субтипов 1a, 3a, 2k/1b не было выявлено достоверных различий в распределении аминокислот в 70 и 91 позиции, кроме одного: Q70R в изолятах ВГС субтипа 3a российского происхождения встречается в 2,9% случаев, что достоверно реже, чем в Азии (9.8%, $p<0.01$).

Выводы. Согласно полученным результатам, почти каждый третий человек, инфицированный ВГС-1b в РФ, имеет мутантный вариант вируса по позиции 70. Сравнительный анализ изолятов ВГС-1b показал, что неблагоприятные мутации Q/H70R встречаются в РФ чаще, чем на территории близлежащих Европейских стран. Северная Америка является единственным регионом, где частота встречаемости мутации Q70R оказалась гораздо выше, чем в РФ и в остальных регионах мира. Мутация M91L представлена в большей части штаммов ВГС-1b, циркулирующих в мире, за исключением Азии, где аминокислота L является доминирующей для позиции 91. Представляется целесообразным включение в рекомендации по выбору терапии для пациентов с неблагоприятными мутациями в белке core ВГС-1b схем, исключающих препараты интерферона. В будущем, при полном переходе на безинтерфероновые схемы лечения, значимость анализа данных полиморфизмов может сохраниться для выявления пациентов с повышенным риском развития ГЦК, нуждающихся в безотлагательном начале лечения.

Используемая литература

1. Petruzziello A. et al. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: an up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes //World Journal of Gastroenterology. – 2016. – Т. 22. – №. 34. – С. 7824.

2. El-Shamy A., Hotta H. Impact of hepatitis C virus heterogeneity on interferon sensitivity: an overview //World J Gastroenterol. – 2014. – Т. 20. – №. 24. – С. 7555-7569.

ФИЛОДИНАМИКА И ЭВОЛЮЦИОННАЯ ИСТОРИЯ ГЕНОТИПА 3 ВИРУСА ГЕПАТИТА Е В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Карлсен А.А.[1,2], Солонин С.А.[3], Потёмкин И.А.[1,2], Исаева О.В.[1,2], Лукашев А.Н.[4], Кюрегян К.К.[1,2], Михайлов М.И.[1,2]

[1] ФГБОУ ДПО «РМАНПО» Минздрава России, Москва, РФ
[2] ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова», Москва, РФ
[3] ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского» ДЗМ, Москва, РФ
[4] ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», Москва, РФ

Введение. Вирус гепатита Е (ВГЕ) - оболочечный вирус, принадлежащий роду *Hepevirus*, семейства *Hepeviridae*. ВГЕ подразделяется на 7 генотипов и ряд субтипов, из них патогенными для человека являются четыре генотипа (1-4). Самым распространенным в странах умеренного климата, в том числе в России, является генотип 3 (ВГЕ-3), способный инфицировать как человека, так и животных. Эволюционная история ВГЕ во всем мире по-прежнему в значительной степени не известна.

Цель. Реконструировать историю заносов ВГЕ-3 на территорию РФ с помощью филодинамического анализа нуклеотидных последовательностей штаммов вируса, выделенных от разных видов хозяев.

Материалы и методы. Анализ включал 706 последовательностей участка открытой рамки считывания 2 (ORF2) ВГЕ-3, доступных в GenBank на момент начала исследования: 439 последовательностей были выделены от человека (Hs), 219 – от домашней свиньи (Ssd), 32 – от диких кабанов (Ss) и 16 образов были выделены из других млекопитающих. Для всех образов были известны дата и место забора образцов.

Для филодинамического анализа использовался Байесовский анализ, реализованный в пакете программ BEAST v1.8.3. При построении деревьев применяли модель замен Yang96 и ослабленные логнормальные часы. Скорость накопления замен была 2,5 x 10^{-3} замен/сайт/год (доверительный интервал 1,76–3,29 x 10^{-3} замен/сайт/год). Расчет был сделан в двух повторах для 300 млн. генераций.

Результаты. Большинство последовательностей ВГЕ-3, выделенных от заболевших людей и домашних свиней на территории РФ, относятся к двум группам, ранее обозначавшимся как субтипы 3e и 3g. Результаты филодинамического анализа свидетельствуют о том, что 3g субтип пришел на территорию РФ порядка 70 лет (доверительный интервал 60-86 лет назад) назад и с тех пор широко распространился на территории страны. Данный вариант вируса встречается у свиней в географически удаленных регионах РФ – Свердловской, Владимирской, Белгородской и Архангельской областях, а также был выделен от людей в Белгородской области, и формирует отдельные региональные группы штаммов. Другой распространенный субтип, 3e, неоднократно заносился на территорию РФ несколько раз в течение последних 25-30 лет из Европы. Данный субтип также выявлялся в РФ как у людей, так и у домашних свиней. Отдельно следует отметить кластер, отличающийся от известных субтипов ВГЕ-3, который образуют штаммы, выделенные от свиней из Саратовской области, и от домашних и диких свиней из Монголии. Разделение данного кластера на российскую и монгольскую подгруппы произошло около 45 лет (доверительный интервал 38-59 лет) назад.

Заключение. Современные штаммы ВГЕ-3, выявляемые на территории РФ, являются результатом неоднократных заносов как из Европы, так и из Азии, и их последующей длительной циркуляции среди поголовья свиней в регионах страны. Выделяемые от заболевших людей штаммы ВГЕ-3 не группируются вместе, но имеют общих предков со штаммами, выделенными от свиней, максимум за 20 лет до выделения, что указывает на регулярную передачу вируса от свиней к человеку.

КОМПЛЕКСНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ИНТЕРЛЕЙКИНА 28В В ЛОКУСАХ rs12979860 И rs8099917 У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ С В КРАСНОДАРСКОМ КРАЕ

Книжник Т.А.[1], Ерёмина Г.А.[1], Моренец Т.М.[2], Городин В.Н.[1], Яковчук Е.Е.[1]

[1]ГБУЗ «Специализированная клиническая инфекционная больница» Министерства здравоохранения Краснодарского края, Краснодар, Россия
[2] ГБОУ ВПО «КубГМУ» Минздрава России, Краснодар, Россия

Введение. В противовирусной терапии (ПВТ) больных хроническим гепатитом С (ХГС) с генотипом 1 важен учет прогностически значимого маркера – однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) в гене Интерлейкина 28В (ИЛ 28В) в локусах rs12979860 и rs8099917, который определяет чувствительность иммунной системы к стимуляции интерфероном (ИФН). Полиморфизм заключается в двух однонуклеотидных заменах в 19-й хромосоме человека: цитозина на тимин (C> T) в локусе rs12979860 и тимина на гуанин (T>G) в локусе rs8099917. В настоящее время показано, что генотип TT rs8099917 может определять спонтанное разрешение инфекции, аллель G - риск низкого ответа на ПВТ пегилированным ИФН (ПЕГ-ИФН) с рибавирином; генотип CC rs12979860

характеризуется высокой частотой спонтанного клиренса ВГС при остром гепатите С, положительным ответом на ПВТ при «двойной» терапии ПЕГ-ИФН/рибавирином. Показана также положительная прогностическая значимость вышеуказанного генотипа и генотипа ТТ rs8099917 при тройной терапии с включением ингибиторов протеазы 1-го поколения у больных ХГС с генотипом 1.

Материалы и методы. В микробиологической лаборатории ГБУЗ «Специализированная клиническая инфекционная больница» (г. Краснодар) выполняется определение полиморфизма гена Интерлейкина 28В с использованием термоциклера «ROTOR-GENE Q» (Qiagen, Германия), тест-системы «АмплиСенс Геноскрин IL28B–FL» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Основные результаты. Проведен анализ частоты встречаемости полиморфных вариантов гена ИЛ-28В по локусам rs12979860 и rs8099917 у 833 жителей Краснодарского края с ХГС, вызванным генотипом 1 ВГС, в возрасте от 18 до 73 лет. У 260 из них определена вирусная нагрузка (ВН). Прогностически благоприятная гомозигота СС по локусу rs12979860 ИЛ-28В выявлена у 231 чел. (27,7%); «неблагоприятные» варианты СТ - у 486 чел. (58,3%) и ТТ - у 116 чел. (13,9%), то есть «благоприятный» генотип СС выявлялся в 2 раза реже по сравнению с прогностически неблагоприятной аллелью Т (72,3%), что определяет такую же частоту потенциального риска отсутствия вирусологического ответа на терапию с применением ПВТ ИФН и рибавирином в данной группе больных ХГС. В локусе rs8099917 прогностически благоприятные гомозиготы ТТ выявлены у 445 чел. (53,4%), которые незначительно доминируют над прогностически неблагоприятной аллелью G: генотип GT обнаружен у 343 чел. (41,2%), GG – у 45 чел. (5,4%) (табл.1).

Таблица 1

Распространенность различных генотипов IL28B в Краснодарском крае

ОНП	Генотип	Больные ХГС, n=833	
		Кол-во	%
rs 12979860	CC	231	27,7
	CT	486	58,3
	TT	116	13,9
rs 8099917	TT	445	53,4
	GT	343	41,2
	GG	45	5,4

При комплексном одновременном исследовании двух локусов - rs12979860 и rs8099917 - выявлены прогностически благоприятные гомозиготы СС+ТТ у 226 чел. (27,1%), менее благоприятные сочетания СТ+ТТ у 219 чел. (26,3%), наиболее прогностически негативный комплекс гетерозигот CT+ GT у 266 чел. (32%). То есть, сочетание упомянутых генотипов по двум локусам гена ИЛ 28В примерно одинаково. Распределение остальных комбинаций неблагоприятных аллелей в гомо- и гетерозиготах: ТТ+ GT, ТТ+GG и СС+GT составило 8,5; 5,4 и 0,6%, соответственно.

Сопоставление вирусной нагрузки, определенной у 260 больных исследованной группы, не выявило существенной разницы между сочетанием прогностически благоприятных гомозиготных генотипов СС+ТТ и остальными вариантами генотипов, менее благоприятными в плане прогноза ПВТ с использованием ИФН/. Исключением является достоверно ($P< 0,05$) более высокая вирусная нагрузка у больных с прогностически благоприятные гомозиготами СС+ТТ ($7,2*10^5 \pm 1,2*10^5$ МЕ/мл) по сравнению с группой больных с неблагоприятными гомозиготами ТТ+GG ($2,9*10^5 \pm 1,2*10^5$ МЕ/мл).

Заключение. Таким образом, в Краснодарском крае у больных с ХГС, вызванным генотипом 1 ВГС, по локусу rs12979860 ИЛ-28В преобладает потенциально неблагоприятный по прогнозу «двойной» ПВТ гетерозиготный вариант – СТ, выявляемость прогностически благоприятной гомозиготы СС значительно (в 2,1 раза) ниже. В локусе rs 8099917 благоприятный генотип ТТ встречается несколько чаще неблагоприятных вариантов. Частота сочетаний различных – благоприятных СС+ТТ, менее благоприятных СТ+ТТ, наиболее прогностически негативных CT+ GT - по двум локусам гена ИЛ 28В примерно одинакова - от 26,3 до 32%.

Комплексное исследование полиморфизмов в локусах rs12979860 и rs8099917 гена ИЛ 28В позволяет выявить прогностически благоприятные и неблагоприятные генотипы для исхода ПВТ с использованием ПЕГ-ИФН и рибавирина, что повышает диагностическую и прогностическую ценность этого анализа. В зависимости от полученных результатов тестирования пациентам с ХГС, вызванным 1 генотипом, назначают лечение с применением интерферона или безинтерфероновую ПВТ.

ПРИМЕНЕНИЕ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ (NGS) ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ЭСКЕЙП-МУТАЦИЙ HBV У БОЛЬНЫХ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ КРОВИ

Коноплева М.В.[1], Соколова М.В.[1], Беленикин М.С.[1,4], Кирьянов С.А.[1], Шанько А.В.[1], Баженов А.И.[2], Ярош Е.В.[1], Туполева Т.А.[3], Семененко Т.А.[1], Нестеренко В.Г.[1], Суслов А.П.[1]

[1]ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия

[2]ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы», Москва, Россия

[3]ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, Москва, Россия

[4]Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный, Россия

Введение. Реактивация вируса гепатита В (HBV) – широко известное осложнение у пациентов с хронической HBV-инфекцией, получающих цитотоксическую или иммуносупрессивную терапию, в том числе у онкогематологических больных. Реактивация HBV-инфекции описана в различных исследованиях при таких заболеваниях как лейкемии и лимфомы, а также при трансплантации костного мозга и гематопоэтических стволовых клеток [1-3]. В то же время у пациентов с гемобластозами с помощью капиллярного секвенирования была показана выраженная вариабельность HBV, при этом распространенность мутантов диагностического и вакцинального ускользания (эскейп-мутантов) определяли в 9% случаев [4]. Тем не менее, публикации, посвященные оценке частоты и профиля эскейп-мутаций в группе онкогематологических больных весьма немногочисленны. Для повышения качества диагностики следует расширять спектр молекулярно-биологических методов детекции HBV у данной категории больных [4]. Применение NGS-технологий для поиска генетических вариантов HBV может быть полезно как для решения данной задачи, так и для понимания механизмов адаптации вируса и его эволюции.

Цель. Оценить распространенность эскейп-мутантов HBV, включая минорные варианты, в группе больных с сочетанием хронического гепатита В (ХГВ) и злокачественных заболеваний крови методом полногеномного секвенирования нового поколения (NGS).

Материалы и методы. С помощью высокопроизводительного секвенатора PGM Torrent методом NGS было исследовано 27 изолятов HBV, полученных от хронических HBsAg-носителей (контрольная группа ХГВ, 6 человек), а также от больных с сочетанием хронического носительства HBsAg и заболеваний крови (21 человек): миелобластный лейкоз (ОМЛ), хронический лимфобластный лейкоз (ХЛЛ), острый лейкоз (ОЛ), лимфогранулематоз (ЛГМ), апластическая анемия (АпА), миелодиспластический синдром (МДС), множественная миелома (ММ) и лимфосаркома (см. таблицу). В образцах была определена вирусная нагрузка HBV и его серологические маркеры (HBsAg, анти-HBsAg, HBeAg, анти-HBe IgG, анти-HBc IgM+IgG), а также серологические маркеры других видов гепатитов (анти–HCV и анти-HDV). Кроме того, исследуемые образцы были охарактеризованы в тест–системе «ГепаСтрип–МУТАНТ–3К», способной выявлять HBsAg с серологически значимыми эскейп–мутациями G145R и S143L.

Результаты. Анализ 27 аминокислотных последовательностей S-HBsAg позволил выявить ряд описанных в литературе 12 различных серологически значимых мутаций иммунологического ускользания: P120T, T125N, T126I, T126N, T126K, Q129H, Q129R, T131N, M133T, S143T, D144E, G145R. Частота обнаружения эскейп–мутантов в изолятах варьировалась от 21-25% до 100% (глубина прочтения образцов составляла от ~5000х до ~10000х) (см. таблицу).

Выявление эскейп-мутаций в геноме HBV у хронических HBsAg-носителей, а также у больных с сочетанием хронического носительства HBsAg и заболеваниями крови

Группа	Кол-во человек в группе	Кол-во мутаций	Вид мутаций
Контроль (ХГВ)	6	2	D144E, G145R
ОМЛ	5	5	P120T, T125M, T126I, Q129H, T131N
ХЛЛ	7	8	P120T, T126K, T126N, T131N, M133T, S143T, G145R (2 шт.)
ОЛ	1	1	Q129R
ЛГМ	3	1	G145R
МДС	1	1	T131N
АпА	1	0	–
ММ	2	0	–
Лимфосаркома	1	1	D144E
Итого:	**27**	**19**	

Всего среди 27 исследованных изолятов было обнаружено 19 значимых эскейп–мутантов HBV (70%). Распределение эскейп-мутаций было следующим: в группе гематологических пациентов – 17/19 (89%), а в контрольной группе – в 2/19 (11%) мутаций. С наибольшей частотой и достоверностью эскейп–мутации обнаруживались в группах ХЛЛ и ОМЛ. Четкой ассоциации какого–либо варианта эскейп–мутации с диагнозом пациента выявлено не было, однако довольно редкая в российской популяции мутация G145R в 2/4 случаях была обнаружена в данной выборке у пациентов группы ХЛЛ.

Выводы. Таким образом, пациенты со злокачественными заболеваниями крови являются группой высокого риска для выявления и распространения мутантов иммунологического ускользания. Среди них наибольшая частота эскейп-мутаций обнаружена в группах ХЛЛ и ОМЛ. Высокопроизводительное секвенирование позволяет выявлять минорные субпопуляции эскейп-мутантов HBV, вероятно, на самых ранних стадиях их возникновения, что открывает перспективы не только дальнейших научных изысканий, но и может внести существенный вклад в практическую медицину.

Список используемой литературы

1. Lai G.M., Yan S.L., Chang C.S., Tsai C.Y. Hepatitis B reactivation in chronic myeloid leukemia patients receiving tyrosine kinase inhibitor. World J. Gastroenterol., 2013; 19 (8): 1318-1321.

2. Ando T., Kojima K., Isoda H., Eguchi Y., Honda T., Ishigami M., Kimura S. Reactivation of resolved infection with the hepatitis B virus immune escape mutant G145R during dasatinib treatment for chronic myeloid leukemia. Int. J. Hematol., 2015. 102 (3): 379-382.

3. Gonzalez J., Nararro J., Rodrigersde S.E., Martinez A. Diagnosis and management of occult, hepatitis B virus infection: a short revive. EMJ Hepatol., 2015; 3 (1): 63-69.

4. Семененко Т.А., Никитина Г.Ю., Птушкин В.В., Ярош Л.В., Кожевникова Г.М., Полонский В.О., Суслов А.П. Распространенность скрытых и мутантных форм гепатита В у пациентов гематологических отделений многопрофильного стационара. Клин. Микробиол. и Антимикроб. Химиотерапия, 2016; 18 (1): 56-62.

ВИРУС ГЕПАТИТА В ВЫЗЫВАЕТ ФОРМИРОВАНИЕ ФОКУСОВ ФОСФОРИЛИРОВАННОГО γH2A.X SER139 ГИСТОНА НА МОДЕЛЯХ *IN VITRO* И *IN VIVO* В ГЕПАТОЦИТАХ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ В И В+D

Костюшев Д.С.[1], Брезгин С.А.[1,2], Зуева А.П.[1,3], Липатников А.Д.[1,4], Glebe D.[5], Симирский В.Н.[6], Чуланов В.П.[1]

[1]ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия
[2]Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия
[3]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
[4]Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия
[5]Institute of Medical Virology, University of Giessen, Giessen, Germany
[6]Институт биологии развития РАН, Москва, Россия

Введение. При индукции двуцепочечных разрывов (ДЦР) запускаются каскады реакций, направленные на локализацию повреждения, привлечение факторов репарации и восстановление целостности генома. Образование фокусов гистона H2A.X, фосфорилированного по остатку Ser139, считается классическим маркером ДЦР в геномной ДНК. С другой стороны, фокусы γH2A.X могут играть неканоническую роль и участвовать в репликации многих ДНК-содержащих вирусов, включая HSV-1, EBV, аденовирусы и др. [1-3].

Цель. Идентификация, подсчет и сопоставление числовых показателей γH2A.X фокусов с ходом инфекции ВГВ на модели трансгенных клеток гепатомы HepG2-1.1merHBV и на парафиновых срезах биопсий печени пациентов с хроническим гепатитом В и В+D с помощью иммуноцито/гистохимического анализа и ПЦР-анализа.

Материалы и методы. Трансгенные клетки гепатомы человека HepG2 со вставкой генома ВГВ 1.1-merHBV выращивались на покровных стеклах в среде DMEM (4 г/л глюкозы), 10% FBS, 1% L-глутамина, 1% пенициллин/стрептомицин в 6-луночных планшетах. Цикл ВГВ активировали с помощью раствора доксициклина (100 нг/мкл) в течение 24 часов. Клетки фиксировали 4% раствором параформальдегида в Tris-HCl (pH=8.0) в течение 10 минут, отмывали трижды Tris-HCl (pH=8.0). Окрашивание на γH2A.X гистон проводили при помощи анти-γH2A.X антител (Abcam, ab11174), ядра подкрашивали красителем Hoechst33342 (Abcam, ab145597). Микроскопирование и подсчет фокусов проводили на микроскопе LeicaDMI6000B в программе LAS AF. Биопсии пациентов, полученные с информированного согласия пациентов в РНЦХ им. акад. Б.В, Петровского, заключали в парафин, делали тонкие срезы (6 микрон), депарафинизировали последовательно растворами спиртов и окрашивали по стандартной методике. Анализ цикла ВГВ в культуре клеток HepG2-1.1merHBV проводили после выделения нуклеиновых кислот комплектом реагентов «РИБО-преп» - определяли концентрацию общей ДНК ВГВ (набор реагентов «АмплиСенс® HBV-monitor FL»), детектировали ккзДНК после обработки Plasmid-Safe ATP-dependent DNase (Epicentre), pgRNA, S-RNA после обработки DNase I без РНКазной активности (Thermo Fisher) с помощью ПЦР в режиме реального времени, используя специфические праймеры и зонды TaqMan.

Основные результаты. ВГВ индуцирует образование многочисленных фокусов γH2A.X в культуре клеток HepG2-1.1merHBV. Число фокусов γH2A.X увеличивается при индукции цикла ВГВ. γH2A.X фокусы детектируются

в 48,2% гепатоцитов у пациентов с хроническим гепатитом В (2,38 на клетку) и в 50,3% гепатоцитов у пациентов с В+Д (3,38 на клетку). Дальнейшие исследования необходимы для выявления корреляций между показателями вирусного цикла и образованием γH2A.X фокусов *in vitro* и *in vivo*, а также для определения функциональной роли γH2A.X в ходе вирусной инфекции.

Заключение. γH2A.X фокусы могут играть каноническую роль и участвовать в репарации ДЦР в геноме ДНК, тогда фокусы связаны с повреждениями генома, вносимыми ВГВ, в том числе за счет действия HBx белка вируса, либо неканоническую, и тогда генерация фокусов γH2A.X связана с репликацией ВГВ. γH2A.X фокусы являются важной эпигенетической меткой и могут использоваться для оценки репликации ВГВ и связанного с инфекцией генотоксичного действия на клетку.

Список используемой литературы

1. Anyong Xie and Ralph Scully. Hijacking the DNA Damage Response to Enhance Viral Replication: γ-Herpesvirus 68 orf36 Phosphorylates Histone H2AX. Mol Cell. 2007 Jul 20; 27(2): 178–179.. Doi: 10.1016/j.molcel.2007.07.005

2. Kuo LJ, Yang LX. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. In Vivo. 2008 May-Jun;22(3):305-9.

3. Mariotti LG, Pirovano G, Savage KI, Ghita M, Ottolenghi A, Prise KM, et al. (2013) Use of the γ-H2AX Assay to Investigate DNA Repair Dynamics Following Multiple Radiation Exposures. Plos ONE 8(11): e79541. Doi:10.1371/journal.pone.0079541

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕНОТИПОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА В В РЕГИОНАХ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Костюшев Д.С., Мамонова Н.А., Карандашова И.В., Лебедева Е.Б., Чуланов В.П.

ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение. Вирус гепатита В (ВГВ) является генетически гетерогенным вирусом, представленным многочисленными генотипами и субгенотипами. В Российской Федерации (РФ) распространение генотипов и субгенотипов ВГВ мало исследовано несмотря на относительно высокое распространение и наличие ряда регионов, эндемичных по хроническому гепатиту В (ХГВ).

Цель. Изучить генетическое разнообразие ВГВ на территории ряда регионов РФ. Использовать полученные данные по секвенированию геномов ВГВ для изучения филогенетических отношений между различными генотипами/субгенотипами ВГВ в РФ и мире.

Материалы и методы. 479 образцов сыворотки крови были получены от пациентов с ХГВ из 6 различных регионов РФ: из Калининградской (68 образцов), Мурманской (71 образец), Челябинской (89 образцов), Иркутской (20 образцов) областей, Пермского края (182 образца) и Республики Саха (Якутия) (49 образцов). Информированное согласие было получено от каждого пациента. На момент отбора проб пациенты не получали противовирусную терапию. ДНК из исследованных образцов выделяли комплектом реагентов «РИБО-преп», генотип ВГВ определяли с помощью комплекта реагентов «АмплиСенс HBV генотип-FL», предназначенного для дифференциации A, B, C и D генотипов вируса. Указанные комплекты реагентов производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (РФ). Для 89 случайно отобранных изолятов из всех регионов, включенных в исследование, было проведено прямое секвенирование фрагмента S-гена ВГВ длиной 950 п.н. Прямое секвенирование проводили с использованием реагентов и автоматического секвенатора 3500xl Genetic Analyzer производства Applied Biosystems (США). Референсные последовательности генотипов и субгенотипов ВГВ были загружены из ресурса GenBank. Для проведения филогенетического анализа нуклеотидные последовательности S-гена ВГВ были выравнены в программе MEGA (версия 6.0). Метод MrBayes, модель HKY85, был использован для построения филогенетических деревьев. Поиск рекомбинантов был проведен в программе SimPlot (Simplot software, версия X).

Основные результаты. Как и ожидалось, генотип D ВГВ преобладает во всех регионах РФ (86.5% всех исследованных изолятов). Частота встречаемости ВГВ генотипа D в большинстве регионов составляет 85%-96.6%. Самая низкая встречаемость этого генотипа (55.3%) наблюдается в Якутии, регионе эндемичном по ХГВ. Напротив, для этого региона характерна самая высокая распространенность генотипа A (39.5%) по сравнению с другими исследованными субъектами РФ, где доля этого генотипа варьировала от 3.1% до 15%.

Случаи инфицирования ВГВ, принадлежащим генотипу C, составляли всего 0.8% случаев. Все изоляты генотипа A принадлежали к субгенотипу A2, генотипа C - к субгенотипу C1. Пропорции субгенотипов D1, D2 и D3 отличались среди регионов и достигали 27.4%, 31.5% и 41.1%, соответственно. Якутия оказалась единственным регионом, в котором не была выявлена циркуляция субгенотипа D2. Филогенетический анализ выявил кластеризацию анализируемых последовательностей с геномами ВГВ из различных регионов мира. Образцы генотипа C обнаруживают наибольшую кластеризацию с референсными последовательностями из Восточной Азии. В ходе исследования не были выявлены рекомбинанты ВГВ, а также случаи инфицирования несколькими генотипами.

Заключение. В ходе проведения исследования было показано, что генотип D ВГВ, доминирующий на территории РФ, представлен субгенотипами D1, D2 и D3. Ранее полученные сведения об увеличении доли субгенотипа D3 и снижению доли субгенотипов D1 и D2 с запада на восток РФ подтвердились в данной работе. Вторым по распространенности на территории страны является генотип A, представленный субгенотипом A2. Изоляты генотипа C ВГВ встречаются крайне редко и представлены субгенотипом C1. Частоты встречаемости различных генотипов/субгенотипов ВГВ в большинстве исследован-

ных регионов РФ практически совпадают, однако для некоторых субъектов федерации характерно уникальное распределение генетических вариантов вируса. Рекомбинанты ВГВ практически не встречаются в РФ даже в регионах с заявленной высокой распространенностью (6%) таких форм. Большинство субгенотипов ВГВ колокализуется с геномами ВГВ по всему миру без ярко выраженной кластеризации.

ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ-ФАКТОРОВ РЕПАРАЦИИ ДНК DNA-PKcs И MRE−11 В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК HEPG2-1.1MERHBV

Липатников А.Д.[1,4], Брезгин С.А.[2,4], Зуева А.П.[3,4], Костюшев Д.С.[4], Чуланов В.П.[4]

[1]Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия
[2]Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия
[3]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
[4]ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение. У пациентов с хроническим гепатитом В (ХГВ), гепатоциты подвергаются сильному оксидативному стрессу [1], вызванному в том числе активностью HBx - белка вируса гепатита В (HBV) [2, 3]. По этой причине в зараженных клетках наблюдается увеличение числа как одно- так и двухцепочечных разрывов ДНК, и, соответственно, активация механизмов гомологичной и негомологичной репарации ДНК, в которую вовлечены такие факторы как DNA-PKcs [4] и Mre-11 [5], соответственно.

Цели и задачи. Изучить динамику изменения относительной экспрессии генов DNA-PKcs и Mre-11, в ходе инфекции, вызванной HBV, сопоставить полученные данные с данными экспрессии мРНК S-белка (sРНК), уровнями кольцевой ковалентно замкнутой ДНК (ккзДНК) и общим количеством ДНК HBV.

Материалы и методы. В качестве модели использовалась клеточная линия HepG2 с геномом HBV1.1-mer под индуцибельным Tet-on промотором. Клетки выращивали в 12-луночных планшетах. Активацию вирусного цикла проводили в четырех лунках добавлением в среду доксициклина. Через 24 часа клетки отмывали фосфатным буфером. Вслед за этим культивирование клеток продолжали в течение следующих 24, 48, 72 и 96 часов. Выделение нуклеиновых кислот осуществлялось с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп» согласно протоколу производителя. Аликвота выделенных нуклеиновых кислот (НК) обрабатывалась ДНКазой I типа, через 30 минут суммарная РНК выделялась «РИБО-преп», после чего проводили постановку реакции обратной транскрипции с помощью комплекта реагентов «РЕВЕРТА-L». Экспрессию вирусных sРНК анализировали методом ПЦР в реальном времени со специфическими праймерами и зондами TaqMan, в качестве референсного гена использовали ген *GAPDH*. Концентрацию суммарной ДНК HBV определяли с помощью набора реагентов «АмплиСенс® HBV-монитор FL». Для оценки уровня ккзДНК часть нуклеиновых кислот обрабатывали ферментом PlasmidSafe ATP-dependent DNase по протоколу производителя, и после инактивации фермента нагреванием анализировали методом ПЦР. В качестве референсного гена для анализа уровня ккзДНК использовали бета-глобин. Анализ экспрессии генов проводили по методу ddCt. Статистическая обработка результатов осуществлялась методом One-way ANOVA ($p<0,05$) с использованием программы IBM SPSS Statistics 21.0.0.0.

Основные результаты. Полученные данные представлены в Таблице, где указаны изменения в экспрессии генов и уровней ккзДНК и ДНК HBV относительно контрольного образца, в т.ч. минусом обозначены точки, в которых наблюдается уменьшение регистрируемых параметров по отношению к контрольному образцу.

Отмечается тенденция к уменьшению экспрессии Mre–11 и увеличению экспрессии DNA-PKcs в первые трое суток. К четвертым суткам после активации цикла HBV происходит значительное повышение экспрессии Mre-11 и снижение экспрессии DNA-PKcs почти до минимального уровня. Уровень экспрессии sРНК при этом снижается в первые трое суток, достигает своего минимума и на четвертые сутки принимает значение, близкое к контрольному образцу. Уровень ккзДНК достигает максимального значения на вторые сутки, но при этом уже на третьи значительно снижается. Аналогичный результат можно видеть и для концентрации ДНК HBV.

Таблица

Изменение уровней экспрессии генов MRE-11, DNA-PKcs и уровней ккзДНК и ДНК HBV

Наименование маркера	Часы после активации			
	24	48	72	96
DNA-PKcs	-0,47*(±0,15)	1,09 (±0,25)	2,02* (±0,27)	-0,66 (±0,1)
Mre -11	1,16 (±0,57)	0,65 (±0,26)	-0,05 (±0,01)	1,726 (±0,88)
sРНК	351,84* (±62,7)	26,22 (±1,56)	-0,52 (±0,03)	1,03 (±0,1)
ккзДНК	1,09 (±0,25)	18,56* (±2,4)	-0,66 (±0,14)	1,08 (±0,04)
ДНК HBV	2,24	3,51	1,03	2,53

*p<0,05

Выводы. Экспрессия факторов Mre-11 и DNA-PKcs разнонаправленна в ходе цикла HBV в культуре клеток гепатомы HepG2-1.1mer HBV, что может быть связано с (а) их ролью в процессах репарации генома и (б) в образовании ккзДНК и цикле HBV.

Список используемой литературы

1. Higgs MR, Chouteau P, Lerat H.J. 'Liver let die': oxidative DNA damage and hepatotropic viruses. Gen Virol. 2014 May;95(Pt 5):991-1004.

2. Wang, W.H.; Hullinger, R.L.; Andrisani, O.M. Hepatitis B virus x protein via the p38 mapk pathway induces e2f1 release and atr kinase activation mediating p53 apoptosis. J. Biol. Chem.2008, 283, 25455–25467.

3. Zhao, F.; Hou, N.B.; Yang, X.L.; He, X.; Liu, Y.; Zhang, Y.H.; Wei, C.W.; Song, T.; Li, L.;Ma, Q.J.; et al. Ataxia telangiectasia-mutated-rad3-related DNA damage checkpoint signalingpathway triggered by Hepatitis B virus infection. World J. Gastroenterol. 2008, 14, 6163–6170.

4. S. J. Collis, T. L. DeWeese, P. A. Jeggo, and A. R. Parker, "Thelife and death of DNA-PK," Oncogene, vol. 24, no. 6, pp. 949–961, 2005.

5. Carson CT, Schwartz RA, Stracker TH, Lilley CE, Lee DV, Weitzman MD.The Mre11 complex is required for ATM activation and the G2/M checkpoint.EMBO J. 2003 Dec 15;22(24):6610-20.

ГЕНОТИПЫ ВИРУСА ГЕПАТИТА В СРЕДИ НЕКОТОРЫХ КОНТИНГЕНТОВ НАСЕЛЕНИЯ НИЖНЕГО НОВГОРОДА В 2011-2015 ГГ.

Полянина А.В., Быстрова Т.Н.

ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, Н. Новгород, Россия

Введение. Проблема гетерогенности вируса гепатита В (ВГВ) является весьма значимой и привлекает внимание специалистов многих стран мира. К настоящему времени уже накоплен значительный объем информации о генетической вариабельности генома ВГВ, которая проявляется в виде наличия различных генотипов вируса. Распределение генотипов варьирует в зависимости от регионов мира, что отражает их различное географическое происхождение, а также пути распространения в связи с человеческой миграцией.

Целью исследования явилось изучение распространенности генотипов ВГВ среди некоторых контингентов населения Н. Новгорода.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужили образцы сывороток крови (n=21073), полученные от взрослых лиц за период 2011-2015 гг. Для оценки интенсивности латентного компонента эпидемического процесса ГВ проведено сероэпидемиологическое исследование 578 лиц из групп высокого риска инфицирования (медицинские работники, пациенты отделений хронического гемодиализа, гематологии, наркологических стационаров). Группу «условно здорового» населения (n=20495) составили лица, проходившие догоспитальное обследование в поликлиниках города. Для определения диагностической и эпидемиологической значимости тестирования отдельных контингентов населения HBsAg-позитивные образцы исследованы на наличие ДНК ВГВ с последующим генотипированием ВГВ. Серологические маркеры ГВ определяли методом ИФА с использованием коммерческих тест-систем производства ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск). Качественное выявление и генотипирование ДНК ВГВ проводили методом ПЦР в режиме «Real-time» с помощью диагностикумов фирмы ООО «ИнтерЛаб-Сервис», г. Москва («АмплиСенс HBV-FL», «АмплиСенс HBV-генотип-FL»). С целью определения превалентности HBsAg среди доноров проанализированы формы статистической отчетности.

Результаты. Анализ распространенности ГВ-инфекции среди донорской популяции населения Н.Новгорода (2013-2016 гг.) показал, что превалентность HBsAg в среднем составляет 0,03±0,004 на 100 обследованных лиц, что аргументирует отнесение Нижегородского региона к территории с низкой активностью эпидемического процесса ГВ. В группе лиц, обследованных на догоспитальном этапе, HBsAg выявлен в 1,4±0,08% случаев. Доля серопозитивных лиц в группах высокого риска инфицирования ВГВ составила 1,9±0,6% у медицинских работников, 4,1±1,2% у пациентов отделения гемодиализа, 10,0±3,0% среди пациентов гематологического отделения крупного многопрофильного стационара, при среднем показателе 4,6±0,8 на 100 обследованных лиц. Данный показатель в 3,3 раза превысил частоту обнаружения HBsAg среди пациентов, обследованных на догоспитальном этапе и в десятки раз - в донорской популяции ($p<0,01$). Значительная доля серопозитивных лиц свидетельствует о необходимости повышения эффективности контроля ГВ в отделениях гематологии и гемодиализа.

Среди HBsAg-позитивных лиц выявляемость ДНК ВГВ составила 22,7±2,4%, что позволило дифференцировать острые и хронические формы инфекции, а также носительство HBsAg. Следует отметить, что показатель превалентности ДНК ВГВ в группе повышенного риска инфицирования в 2,8 раза превышал таковой в группе сравнения (пациенты, обследованные на догоспитальном этапе).

Достоверно чаще по сравнению с другими группами обследованных лиц ($p<0,05$) ДНК ВГВ была обнаружена у пациентов отделений гематологии и гемодиализа (80,0±4,0% и 50,0±3,2% соответственно). Высокий показатель превалентности ДНК ВГВ среди групп повышенного риска инфицирования (55,5±2,1%) свидетельствует об интенсивности латентного компонента эпидемического процесса и широте распространения скрытых источников ГВ в отделениях гематологического профиля и возможности внутрибольничного инфицирования пациен-

тов ГВ. Полученные результаты аргументируют необходимость обязательного включения определения ДНК ВГВ в алгоритм обследования серопозитивных лиц на всех этапах выявления ГВ-инфекции.

В результате проведенного генотипирования ВГВ установлено, что развитие эпидемического процесса на территории Н. Новгорода, на протяжении всего периода исследования, обусловлено циркуляцией ВГВ генотипа D (87,6±5,2%), характерного для европейской части России. Доля негенотипированых образцов составила 12,4±5,1%, что возможно связано с наличием редкого для данной территории генотипа ВГВ и требует проведения дальнейшего исследования методом секвенирования.

Заключение. Значительная распространенность скрыто протекающего компонента эпидемического процесса ГВ, высокая частота обнаружения ДНК ВГВ у HBsAg-позитивных лиц, относящихся к группам повышенного риска инфицирования, является неблагоприятным прогностическим признаком развития ситуации по ГВ в будущем и служит обоснованием необходимости включения в эпидемиологический надзор мониторинга молекулярно-генетических характеристик ВГВ, циркулирующего среди населения каждой конкретной территории.

РАСПРОСТРАНЁННОСТЬ ГЕНОТИПОВ/ПОДГЕНОТИПОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА С В БЕЛАРУСИ В 2004–2016 ГОДАХ

Гасич Е.Л., Еремин В.Ф., Сосинович С.В.

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Республика Беларусь

Введение. Одной из особенностей вируса гепатита С (*ВГС*) является его генетическая изменчивость, отражением которой служит наличие 7 генотипов, 67 подгенотипов и множества квазивариантов вируса [1]. Определение вариантов *ВГС* является не только основой молекулярно-эпидемиологического мониторинга, но и способствует назначению адекватного лечения [2–4]. Несмотря на значимость таких исследований, у нас в стране, до настоящего времени, они проводись очень ограничено и только с возможностью определять 1, 2 и 3 генотипы *ВГС*.

В этой связи настоящим этапом исследования явилось определение генотипов генотипов/подгенотипов *ВГС* у пациентов с острой и хронической формами *ВГС*. Исследования выполнены общепринятым методом прямого секвенирования по core/E1 и NS5B участкам генома *ВГС* с последующим филогенетическим анализом, который позволяет установить генетическое родство между нуклеотидными последовательностями вируса гепатита С [5].

Цель исследования. Методом секвенирования 2 участков генома определить генотипы/подгенотипы *ВГС*, циркулирующие на территории Республики Беларусь в течении 2004-2016 годов, в группах населения с разными рисками инфицирования.

Материал и методы. Исследован 1051 образец сыворотки/плазмы крови *ВГС* -инфицированных пациентов из Беларуси. Нуклеотидные последовательности *ВГС* получали путем амплификации core/E1 и NS5B участков генома вируса с использованием описанных ранее методов [6]. Выявление факторов риска, возможных путей инфицирования, возраста, мест проживания, эпидемиологических связей с другими инфицированными лицами проводили путем опроса пациентов при сборе эпидемиологического анамнеза либо данные были получены из направлений образцов сыворотки/плазмы крови, присланных на исследование с установленным путем заражения. Филогенетические деревья строились с применением алгоритма ML (maximum likelihood) в программе PHYML (Phylogenetic maximum likelihood) с моделью замены нуклеотидов GTR. Оптимизация топологии дерева - Best of NNIs and SPRs. Для расчёта статистической достоверности кластеров использовался тест SH-aLRT. Достоверными считались кластеры со значением SH-aLRT ≥0.9. Визуализация деревьев осуществлялась в программе FegTree v.1.4.2. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программы Statistica v.10.

Результаты исследований. Полученные результаты показали, что *ВГС* в Беларуси в профиле распределения генотипов доминировал 1-й генотип *ВГС* частота встречаемости которого составляла 68,0% (n=715). Вторым по значимости являлся 3-й генотип, определенный в 26,5% образцах сыворотки/плазмы крови (n=279) и минорными оказались 2-й (n=32) и 4-й генотипы *ВГС* (n=7), обнаруженные в 3,1% и 0,7% пробах соответственно. Результаты генотипирования, выполненного по core/E1 и NS5B участкам генома *ВГС*, показали также, что в стране выявляются рекомбинантные формы вируса RF1_2k/1b (1,6%, n=17) и 1d/1b (0,1%, n=1).

У доминирующего 1-го генотипа *ВГС* нами определены подгенотипы 1a (n=68) и 1b (n=715) в 6,5% и 61,6% пробах соответственно. Филогенетический анализ третьего генотипа показал, что все пробы РНК *ВГС* относились только к 3а подгенотипу. Второй генотип, был представлен следующими тремя подгенотипами *ВГС*: 2a (1,9%, n=20), 2c (0,7%, n=7) и 2k (0,5%, n=5). Наиболее редко встречающийся 4-й генотип вируса (всего 7 наблюдений), в 6 (0,6%) случаях был представлен 4d и в 1 (0,1%) - 4a подгенотипами *ВГС*. Таким образом, установлено, что доминирующими подгенотипами во всех регионах республики являются 1b и 3a, на долю которых приходится 94,5% всех случаев инфицирования *ВГС*.

Сопоставление двух параметров, таких как средний медианный возраст пациентов и циркулирующий подгенотип *ВГС*, показало тенденцию к увеличению возраста пациентов в группах с 1b, 2a и 2c подгенотипами *ВГС*. В целом пациенты с 1b и 3a подгенотипами *ВГС* были достоверно старше группы с 1a подгенотипом *ВГС* ($p<0,003$ и $p<0,01$ соответственно, Mann-Whitney U Test). Анализ возрастной структуры групп пациентов с более редки-

ми генотипами *ВГС*, такими как 2 и 4, показал, что лица трудоспособного возраста до 34 лет чаще имели 2k и 4d подгенотипы *ВГС*. В то же время 2a и 2c подгенотипы чаще определялись у лиц старше 50 лет.

Учитывая, что пациенты с *ВГС*-инфекцией имели разные факторы риска передачи инфекции, была проанализирована взаимосвязь между путями инфицирования и частотой выявления подгенотипов *ВГС*, кроме этого, анализ полученных данных позволил выявить закономерность между путями заражения и встречаемостью генотипов/подгенотипов *ВГС*.

В группах пациентов, инфицированных во время медицинских процедур, гетеросексуальных контактов, контактно-бытовых или неустановленных путей заражения более половины всех проб *ВГС* принадлежали к 1b подгенотипу вируса (83,1, 59,5%, 66,1% и 77,8% соответственно). *ВГС* с 3a вариантом подгенотипа определяли в диапазоне от 10% (контактно-бытовой путь передачи) до 39,1% (гетеросексуальный путь заражения). Исключением данного распределения подгенотипов являлась группа парентеральных инъекционных наркоманов. Среди них 1b и 3a подгенотипы *ВГС* встречались практически с равной частотой (42,6% и 39,1% соответственно) и именно в этой группе выявлялось наибольшее число пациентов с 1a подгенотипом *ВГС* – 18,3%.

Заключение. Анализ распространенности различных генотипов/подгенотипов *ВГС* показал, что на территории Беларуси доминируют 1b (61,5%) и 3a (26,5%) подгенотипы вируса. Среди групп населения с риском инфицирования в результате медицинских процедур, гетеросексуальных контактов, в семейных очагах удельный вес 1b подгенотип был достоверно выше по сравнению с группой ПИН, где отмечен сдвиг в сторону увеличения 1a (18,3%) и 3a (39,1%) подгенотипов вируса. Среди *ВГС*-инфицированных пациентов в возрасте до 35 лет доминируют 1a, 3a, 4d, RF1_2k/1b варианты вируса, в группах старше 40 лет – 1b, 2a, 2c, и 2k подгенотипы. Встречаемость 4 генотипа и рекомбинантной формы RF1_2k/1b свидетельствует о необходимости проведения постоянного мониторинга за циркулирующими генетическими вариантами *ВГС* с использованием современных молекулярно-генетических методов.

Список литературы

1. D.B. Smith [et al.] // Hepatology. – 2014. – Vol. 59. – № 1. – P. 318-327.

2. P. Abraham [et al.] // Indian Journal of Medical Microbiology. – 2013. – Vol. 31. – № 4. – P. 349.

3. Lavanchy D. 2011. – Vol. 17. – № 2. – P. 107-115.

4. M. Castells [et al.] // Infection, Genetics and Evolution. – 2015. – Vol. 32. – P. 231-238.

5. A.P. Avó [et al.] // Journal of Medical Virology. – 2013. – Vol. 85. – № 5. – P. 815-822.

6. Е.Л. Гасич [et al.] // Здравоохранение. – 2010. – № №12. – С. 27-34.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЯ И ДИАГНОСТИКА ГЕПАТИТА Е

Михайлов М.И.[1,2], Малинникова Е.Ю.[1,2], Кюрегян К.К.[1,2]

[1] ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, Москва, Россия

[2] ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»

Введение. В настоящее время растет интерес к гепатиту Е как к новой инфекции в странах умеренного климата, в том числе в России. Несмотря на прогресс в изучении зоонозной природы этой инфекции на неэндемичных территориях, понимание экологии вируса гепатита Е (ВГЕ) до сих пор является неполным. Изучение молекулярной эпидемиологии гепатита Е и стандартизация его диагностики позволят понять закономерности циркуляции этой малоизученной инфекции.

Цель. Обобщить и представить собственные данные по молекулярной эпидемиологии и диагностике гепатита Е, полученные за последние годы.

Материалы и методы. Распространенность анти-ВГЕ IgG среди условно здорового населения России (более 6000 человек) всех возрастных групп определяли с помощью коммерческих наборов ИФА. Выявление РНК ВГЕ в образцах фекалий домашних свиней (более 3000 образцов), кроликов (более 500 образцов), в сточных водах свиноферм и в клиническом материале от заболевших людей (сыворотка крови и фекалии, более 100 случаев заболевания) определяли методом ОТ-ПЦР с помощью вырожденных праймеров к участку ORC2 ВГЕ. Амплифицированные последовательности ВГЕ секвенировали и анализировали для определения генотипа вируса и выявления филогенетических связей между выявленными геноизолятами ВГЕ.

Результаты. Частота выявления анти-ВГЕ IgG среди условно-здорового населения РФ составляет в среднем 4,1%, при этом наблюдается резкое (до 28%) увеличение частоты выявления анти-ВГЕ IgG среди лиц старше 60 лет. Среди населения Белгородской области (региона, где сосредоточены крупнейшие свиноводческие хозяйства) распространенность анти-ВГЕ IgG достигает 10%. Анализ факторов риска инфицирования ВГЕ среди серопозитивных и заболевших лиц не выявил статистически значимых факторов, за исключением наличия туберкулеза. ВГЕ распространен среди домашних свиней в РФ повсеместно, преимущественно инфицированы животные в возрасте 2-4 месяца, не достигшие возраста забоя. РНК ВГЕ выявлена в сточных водах свиноферм, используемых для компостирования. При обследовании более 200 образцов свиной печени, попадающей в розничную продажу, РНК ВГЕ выявлена не была. Частота выявления ВГЕ у кроликов варьирует от 2% до 30%, при этом генетические варианты ВГЕ кроликов отличаются от штаммов, циркулирующих среди человека и свиней. Установлено, что все незавозные изоляты ВГЕ, выделенные на территории РФ от людей и свиней, принадлежат генотипу 3.

Описана водная вспышка гепатита Е, вызванная вирусом 3 генотипа. Также описан завозной случай ВГЕ-инфекции генотипа 4. Анализ нуклеотидных последовательностей ВГЕ показал существование специфичных для каждого региона вариантов ВГЕ, при этом сходство последовательностей штаммов, выделяемых на одной территории от заболевших людей и свиней, составляет до 94%-99%, что указывает на зоонозную природу заболевания человека.

Заключение. ВГЕ-инфекция широко распространена на территории РФ, вызывается вирусом 3 генотипа и имеет зоонозную природу. Основным резервуаром инфекции являются домашние свиньи, однако точные пути передачи ВГЕ от свиней человеку нуждаются в уточнении.

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА В СРЕДИ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ С ВИРУСОЛОГИЧЕСКОЙ НЕЭФФЕКТИВНОСТЬЮ АРВТ

Останкова Ю.В.[1], Семенов А.В.[1,2,3], Чурина М.А.[1], Тотолян Арег А.[1,2]

[1]ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

[2]ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

[3]ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Вирус гепатита В (ВГВ) является одним из наиболее распространенных гепатотропных вирусов, вызывающих хронические заболевания печени. Почти 2 млрд. человек в мире инфицированны вирусом гепатита В. При этом хронический вирусный гепатит В (ХВГВ) диагностирован более чем у 240 миллионов больных [1]. Одной из форм естественного течения ВГВ является оккультный гепатит В (окГВ). Оккультный ГВ определяется наличием ДНК ВГВ в печени (и преимущественно низкие концентрации ДНК ВГВ в плазме крови) при отсутствии обнаруживаемого HBsAg в периферической крови. Механизм данного явления связан, по всей видимости, с длительным сохранением в ядрах гепатоцитов кольцевой ковалентно замкнутой (ккз) ДНК ВГВ, способной становиться матрицей для субгеномных и прегеномных копий РНК, на основе которых синтезируется вирусный геном и вирусные белки [2]. При этом в большинстве случаев репликация вируса и экспрессия генов могут быть подавлены настолько, что вирусная нагрузка в периферической крови больного крайне низка, вплоть до невозможности выявить ДНК ВГВ стандартными методами, но элиминации вируса при подавлении репликации не происходит.

Большинство пациентов с окГВ, несмотря на отсутствие HBsAg в периферической крови, серопозитивны по одному или нескольким серологическим маркерам. Однако более 20% пациентов с окГВ серонегативны по всем маркерам - анти-HBs, HBeAg, HBe IgG, HBCore IgG [3]. В этом случае, единственным способом для надежного обнаружения окГВ становятся молекулярно-биологические методы.

В последние годы значительно увеличилась встречаемость коинфекций гепатотропных вирусов с вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), чему способствуют общие пути распространения ВГВ, вируса гепатита С (ВГС) и ВИЧ), при этом коинфекция ВИЧ + ВГВ явление сравнительно более редкое, чем ВИЧ + ВГС. По некоторым данным в мире среди ВИЧ-инфицированных больных до 10% человек больны также ХВГВ, а в странах Средиземноморья окГВ показан для трети HBsAg(-) больных ХВГС [4]. Следует отметить, что эти исследования относятся только к манифестной форме ВГВ, в то время как распространенность коинфекции ВИЧ + окГВ независимо от серологических маркеров мало описана в литературе. Обнаружение и, соответственно, оценка распространенности окГВ затруднена из-за ряда методических ограничений и неоднородности методов, используемых при его выявлении.

Целью нашей работы являлось оценить значимость молекулярных маркеров для выявления окГВ у ВИЧ-инфицированных пациентов с вирусологической неэффективностью АРВТ.

Материалы и методы. В работе были использованы образцы плазмы крови 213 ВИЧ-инфицированных (HBsAg-) пациентов с вирусологической неэффективностью АРВТ (вирусная нагрузка >50 МЕ/мл после 6 месяцев АРВТ или повышение вирусной нагрузки после первичного подавления репликации вируса), направленных на определение лекарственной устойчивости вируса для коррекции АРВТ. Все пациенты были обследовали на наличие ВГС (антитела к ВГС) и гепатита В (HBsAg, HBCore IgG, HBe IgG). ДНК ВГВ экстрагировали из плазмы крови, проводили ПЦР и в дальнейшем прямое секвенирование фрагмента, включающего рекомендованный для генотипирования ВГВ регион Pre-S1/Pre-S2/S протяженностью 1169 п.о. Первичный анализ полученных в ходе секвенирования фрагментов проводили с помощью программы NCBI Blast в сравнении с нуклеотидными последовательностями, представленными в международной базе данных GenBank. Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили в программе MEGA версия 5, используя алгоритм ClustalW.

Результаты. В группе ВИЧ-инфицированных HBsAg (-) пациентов ДНК ВГВ была обнаружена у 34,7% больных. Серологические маркеры были выявлены у 42,3% пациентов с ДНК ВГВ, из которых 5% HBe IgG(+), 15,3% HBCore IgG(+) и 22% HBe IgG(+) и HBCore IgG(+). Данные о распределении генотипов оккультного ВГВ разнообразны и

противоречивы. В обследованной нами группе преобладал ВГВ генотипа D (D1, D2, D3 субтипов). Высокая частота встречаемости в группе субтипа D1, не характерного для СЗФО, обращает на себя особое внимание. Мы считаем необходимым рассматривать в дальнейшем как минимум две возможных причины этого. Согласно некоторым источникам, частоты распространенности генотипов и субтипов оккультного ВГВ совпадают с распределением генотипов манифестного ВГВ в том или ином регионе. Однако существуют литературные данные о характерности преобладания генотипа D для оккультного ВГВ и более тяжелая клиническая картина, чем при открытом ХВГВ [5]. При этом представлено крайне мало исследований о преимущественном распределении не генотипов, а субтипов вируса при оккультном ВГВ. То есть вполне вероятно, что ВГВ субтипа D1 действительно широко распространен при оккультной форме ВГВ, но также возможно, что представленные изоляты вируса относятся к так называемым «завозным» штаммам. Источником нехарактерного для региона субтипа вируса могут быть инъекционные наркотические вещества. Большинство больных в обследуемой группе являются активными или бывшими потребителями инъекционных наркотиков и могли быть инфицированы посредством при употреблении наркотических веществ, попадающих в Россию через Среднеазиатский регион, для которого характерен ВГВ субтипа D1.

Заключение. Распространенность молекулярно-биологических маркеров окГВ высока среди ВИЧ-инфицированных пациентов. Выявление ДНК ВГВ при низкой вирусной нагрузке является сложной задачей для эффективной лабораторной диагностики. Обнаружение ДНК ВГВ в качестве маркера окГВ является важным фактором для установления диагноза, выбора соответствующей терапии, прогнозирования исхода заболевания и предотвращения развития тяжелого заболевания печени.

Список литературы

1. WHO Prevention and control of viral hepatitis infection: frame work for global action 2012. Geneva: WHO, 2012.

2. Guo J.T., Guo H. Metabolism and function of hepatitis B virus cccDNA: Implications for the development of cccDNA-targeting antiviral therapeutics // Antiviral research. 2015. vol. 122. P. 91–100.

3. Torbenson M., Thomas D.L. Occult hepatitis B // Lancet Infect. Dis. 2002. vol. 2. P. 479–486.

4. Raimondo G., Pollicino T., Cacciola I. et al. Occult hepatitis B virus infection // J. Hepatol. 2007. vol. 46. P. 160–170.

5. Kishk R., Atta H.A., Ragheb M. et al. Genotype characterization of occult hepatitis B virus strains among Egyptian chronic hepatitis C patients // East. Mediterr. Health. J. 2014. vol. 20 (2). P. 130-138.

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ МУТАЦИЙ УСТОЙЧИВОСТИ ВИРУСА ГЕПАТИТА С К ИНГИБИТОРАМ БЕЛКА NS5A СРЕДИ ПАЦИЕНТОВ, НЕ ПОЛУЧАВШИХ ЛЕЧЕНИЕ ПРЕПАРАТАМИ ПРЯМОГО ПРОТИВОВИРУСНОГО ДЕЙСТВИЯ

Булатова К.В., Карандашова И.В., Чуланов В.П.

ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение. Для лечения хронического гепатита С (ХГС) с 2014 г. применяются ингибиторы неструктурного белка NS5A вируса гепатита С (HCV) - препараты прямого противовирусного действия (ППВД). На сегодняшний день во многих странах одобрены к применению 5 NS5A-ингибиторов: даклатасвир (DCV), ледипасвир (LDV), омбитасвир (OMV), элбасвир (ELV) и велпатасвир (VEL). Противовирусная терапия (ПВТ) с использованием ингибиторов NS5A-белка может оказаться неэффективной в случае наличия в NS5A-регионе генома HCV мутаций лекарственной устойчивости. Они могут встречаться в геноме вируса как естественные полиморфизмы до приема лекарственных препаратов и быть сформированы во время терапии [1].

У пациентов, инфицированных 1b субтипом HCV, наиболее значимые для терапии мутации L31M и Y93H, обнаруживаются в 2,1-6,3% и в 3,8-14,1% случаев, соответственно [1]. Частота встречаемости данных мутантных вариантов в NS5A-области генома HCV, отличается в различных географических регионах: в Японии - 18,4%, в Корее и на Тайване – 12,8%, в неазиатских странах – 11,7% [2]. Распространенность мутаций устойчивости HCV к ППВД среди российских пациентов с ХГС остается неизученной.

Высокая стоимость терапии с использованием ингибиторов NS5A-белка и наличие мутаций устойчивости к ним в геноме вируса до начала ПВТ определяют целесообразность проведения исследования по их выявлению перед терапией ХГС.

В ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора для выявления мутаций устойчивости HCV к ППВД разработан набор реагентов «АмплиСенс® HCV-Resist-Seq», позволяющий проводить амплификацию NS3-, NS5A- и NS5B-регионов генома вируса с последующим анализом полученных ПЦР-фрагментов с помощью прямого секвенирования. Результатом исследования является информация по каждой аминокислотной позиции, ассоциированной с мутацией лекарственной устойчивости к соответствующему препарату в зависимости от субтипа вируса. Набор реагентов предназначен для работы только с определенными генотипами (субтипами) HCV - 1a, 1b, 3a и с рекомбинантной формой возбудителя - RF_2k/1b.

Целью данной работы являлось изучение распространенности мутаций лекарственной устойчивости HCV к ингибиторам белка NS5A среди пациентов с ХГС, инфицированных 1b субтипом вируса, которые ранее не получали лечение ППВД.

Материалы и методы. Образцы плазмы крови были получены от 246 пациентов с ХГС из Москвы, Санкт-Петербурга, Якутска, Тулы, Орла, Брянска и других городов РФ. Исследование было проведено с помощью

формы комплектации 2 набора реагентов «АмплиСенс® HCV-Resist-Seq» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора), предназначенной для выявления мутаций устойчивости в NS5A-регионе HCV к ПППД методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим секвенированием продуктов амплификации, в соответствии с инструкцией. Прямое секвенирование проводили на автоматическом секвенаторе 3500xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

Результаты. Среди всех проанализированных образцов различные мутации, ассоциированные с устойчивостью, были выявлены в 26,4% случаев (65/246). Согласно полученным данным (см. Таблицу), в проанализированной выборке наиболее часто встречается замена в 30 положении NS5A-белка - R30Q/H, которая была обнаружена в 9,3% случаев (23/246). Считается, что мутация в 30 кодоне не оказывает существенного влияния на противовирусную терапию ХГС, вызванного 1b субтипом HCV. Наиболее важные замены с точки зрения терапии – L31M/V/I и Y93H – встречаются в образцах с частотами 5,3% и 5,7%, соответственно. Сочетание данных мутаций в геноме HCV 1b субтипа способствует многократному возрастанию полумаксимальной ингибирующей концентрации препарата (EC_{50}) и приводит к полной неэффективности использования ингибиторов NS5A-белка для лечения ХГС. Такое сочетание мутаций встречается в 2,4% проанализированных образцов. Менее значимые для терапии мутации в 28, 32 и 58 позициях NS5A-региона были выявлены в 2,8%, 0,8% и 3,6% случаев, соответственно. Замена P58S в исследуемых образцах не была обнаружена.

Таблица

Распространенность исходных мутаций лекарственной устойчивости в NS5A-регионе генома HCV у российских пациентов, инфицированных 1b субтипом вируса

Вариант замены	Естественная распространенность на территории РФ, %	
L28M	2,8 (7/246)	2,8
R30H	0,8 (2/246)	9,3
R30Q	8,5 (21/246)	
L31M	4,5 (11/246)	5,3
L31V	0,4 (1/246)	
L31I	0,4 (1/246)	
P32L	0,4 (1/246)	0,8
P32Δ	0,4 (1/246)	
P58D	3,6 (9/246)	3,6
P58S	0 (0/246)	
Y93H	5,7 (14/246)	5,7
L31M/I/V + Y93H	2,4 (6/246)	2,4

Заключение. Наиболее значимые для терапии ПППД исходные мутации резистентности –L31M/V/I и Y93H – в NS5A-регионе HCV 1b субтипа среди российских пациентов с ХГС встречаются в 13,4% случаев, из которых 2,4% приходится на сочетание мутаций L31M/I/V + Y93H, что свидетельствует о целесообразности проведения исследования на мутации устойчивости для российских пациентов с ХГС до начала противовирусной терапии.

Список литературы

1. Sarrazinn C. Клиническое значение устойчивости вируса гепатита С к противовирусным препаратам прямого действия // Journal of Hepatology. – 2016. – Vol. 64. – P. 486–504.

2. McPhee F. et al. High Sustained Virologic Response to Daclatasvir Plus Asunaprevir in Elderly and Cirrhotic Patients with Hepatitis C Virus Genotype 1b Without Baseline NS5A Polymorphisms // Adv Ther. – 2015. – Vol. 32. – P. 637–649.

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ГЕПАТИТА С СРЕДИ НЕОБСЛЕДОВАННОГО НАСЕЛЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ САХА (ЯКУТИЯ)

Семенов С.И.[1], Скляр И.В.[2], Зуева А.П.[2,3], Слепцова С.С.[1], Никитина С.Г.[1], Максимова С.С.[1], Карандашова И.В.[2], Чуланов В.П.[2]

[1]ФГАОУ ВПО «Северо-Восточный федеральный университет», Якутск, Россия
[2]ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия
[3]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Введение. Вирусные гепатиты - группа инфекционных заболеваний печени, вызванных гепатотропными вирусами, принадлежащими к различным семействам. К вирусным гепатитам с парентеральным механизмом передачи возбудителя относятся вирусные гепатиты В (ГВ), С (ГС) и D (ГД), вызываемые вирусами В (HBV), С (HCV) и D (HDV), соответственно. Эти вирусы играют важнейшую роль в возникновении хронических вирусных заболеваний печени. Проблема парентеральных вирусных гепатитов является одной из самых актуальных в современной медицине. Постановлением правительства РФ №715 от 01.12.2004 года гепатиты В и С вошли в перечень социально значимых заболеваний и в перечень заболеваний, представляющих опасность для окружающих. Республика Саха является регионом с высоким уровнем заболеваемости хроническими вирусными гепатитами [1-3], однако реальная распространенность маркеров парентеральных вирусных гепатитов, прежде всего среди коренных малочисленных народов, проживающих на территории отдаленных районов республики, остается малоизученной.

Целью работы является изучение распространенности молекулярно-биологических маркеров гепатита С среди необследованного населения Республики Саха (Якутия).

Материалы и методы. Было исследовано 858 образцов сыворотки крови, забранных у необследованных на маркеры гепатита С жителей 7 районов Республики Саха (Якутия). Коренное население было представлено этническими якутами (345 образцов, 40,2% от общего количества образцов), эвенками (164 образца, 19,1%). Некоренное население было представлено в основном этническими русскими - 207 образцов (24,1%) и рядом других национальностей – 142 образца (16,6%). Жители, включенные в исследование, проживали на территории Момского улуса (54 образца, 6,3%), Усть-Алданского (41 образец, 4,8%), Мирнинского (304 образца, 35,4 %), Намского (90 образцов, 10,5%), Вилюйского (50 образцов, 5,8%), Жиганского (270 образцов, 31,5%) и Среднеколымского (49 образцов, 5,7%) районов. В исследование были включены образцы от 301 мужчины и 557 женщин.

Выделение РНК проводили с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп», выявление РНК HCV – с использованием «АмплиСенс HCV-FL», обратную транскрипцию - с помощью комплекта реагентов «REVERTA-L», определение генотипа HCV – с помощью «АмплиСенс HCV-Генотип-FL». Все указанные комплекты реагентов производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Результаты. РНК HCV была выявлена в 4,2% исследованных образцов (36/858). Среди всех РНК HCV-положительных проб 86,1% (31/36) принадлежал коренному населению, 13,9% (5/36) – некоренному. Среди коренного населения частота встречаемости исследованного маркера составила 6,1% (31/509), среди некоренного – 1,4% (5/349).

РНК HCV была выявлена у 11 мужчин (медиана возраста 41 год) (35,5%, 11/31) и 20 женщин (медиана возраста 53,5 лет) (64,5%, 20/31), принадлежащих коренному населению. Среди некоренных жителей указанный маркер был выявлен у 3 мужчин (медиана возраста 42 года) (60%, 3/5) и 2 женщин (медиана возраста 53 года) (40%, 2/5).

Частоты встречаемости различных генотипов HCV были следующими - 88,9% (32/36) исследованных изолятов принадлежали 1b субтипу вируса и по 5,55% (2/36) - 3a субтипу и 2 генотипу, соответственно. У всех инфицированных HCV некоренных жителей был выявлен только 1b субтип возбудителя (100%). Среди представителей коренных народов распределение генетических вариантов HCV было следующим – 87,1% (27/31) изолятов относились к 1b генотипу вируса, и по 6,45% (2/31) – к 3a субтипу и 2 генотипу, соответственно.

Заключение. Распространенность молекулярно-биологических маркеров ГС среди необследованного населения Республики Саха (Якутия) составила 4,2%, что примерно в 1,4 раза выше, чем в среднем по стране (2,8%-3,2%). Частота встречаемости РНК HCV на территории исследованных регионов Республики Саха среди коренного населения в 4,4 раза выше, чем среди некоренных жителей. Инфицированные HCV мужчины были на 10 лет моложе женщин с ГС в обеих исследованных группах.

Генетические варианты, которые были выявлены при проведении работы - 1b, 2 и 3a - являются основными, которые циркулируют в РФ, однако их популяционные частоты существенно отличаются от средних по России. На территории Якутии доминирует 1b субтип HCV, что характерно для страны в целом, но его доля значительно выше (89% против 50%). 2 и 3a генотипы вируса выявлялись равновероятно примерно в 5% случаев, частоты встречаемости этих генотипов были очень низкими по сравнению со средними по стране (8-10% для 2 генотипа и 40% для 3a).

Список литературы

1. Г.Г. Онищенко, М.Е. Игнатьева, Л.В. Будацыренова, М.И. Михайлов. Эффективность вакцинопрофилактики гепатита В в Республике Саха (Якутия) // Здоровье населения и среда обитания. - 2016.- N 6, с. 36-39.

2. Слепцова С.С. Вирусные гепатиты В и D как основные факторы формирования цирроза и первичного рака печени в Республике Саха (Якутия) // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессия. - 2012.- N 2, с. 109-115.

3. Дмитриева Т.Г. Особенности эпидемиологии и течения хронических гепатитов у детей в Республике Саха (Якутия) // Российский педиатрический журнал. - 2015.- N 2, с. 32-36.

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ВИРУСА ГЕПАТИТА В СРЕДИ НЕОБСЛЕДОВАННОГО НАСЕЛЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ САХА (ЯКУТИЯ)

Скляр И.В.[1], Семенов С.И.[2], Зуева А.П.[2,3], Слепцова С.С.[2], Никитина С.Г.[2], Максимова С.С.[2], Карандашова И.В.[1], Чуланов В.П.[1]

[1]ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия
[2]ФГАОУ ВПО «Северо-Восточный федеральный университет», Якутск, Россия
[3]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Введение. Вирусные гепатиты являются одной из самых актуальных проблем современной медицины. Особую опасность представляют парентеральные гепатиты, к которым относятся гепатиты В (ГВ) и D (ГД), вызываемые вирусами В (HBV) и D (HDV), соответственно.

Республика Саха является одним из эндемичных регионов РФ по заболеваемости ГВ и ГД, однако их реальная распространенность среди населения республики, остается малоизученной и представляет особый интерес для мониторинга [1-3].

Целью работы является изучение распространенности молекулярно-биологических маркеров ГВ и ГД среди необследованного населения Республики Саха (Якутия).

Материалы и методы. Было исследовано 858 образцов сыворотки крови жителей Республики Саха (Якутия), которые не были обследованы на маркеры ГВ и ГД. 59,3% образцов (509/858) получены от коренного населения, 40,7% (349/585) – от некоренного. Коренное население было представлено этническими якутами и эвенками - 67,8% (345/509) и 32,2% (164/509), соответственно, некоренное население - в основном этническими русскими и рядом других национальностей – 59,3% (207/349) и 40,7% (142/349), соответственно. Жители, включенные в исследование, проживали на территории Момского улуса (54 образца, 6,3%), Усть-Алданского (41 образец, 4,8%), Мирнинского (304 образца, 35,4 %), Намского (90 образцов, 10,5%), Вилюйского (50 образцов, 5,8%), Жиганского (270 образцов, 31,5%) и Среднеколымского (49 образцов, 5,7%) районов. В исследование были включены образцы от 301 мужчины и 557 женщин.

Выделение нуклеиновых кислот проводили с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп», выявление ДНК HBV и РНК HDV - комплектами реагентов «АмплиСенс® HBV-FL» и «АмплиСенс® HDV-FL», соответственно, обратную транскрипцию - комплектом реагентов «REVERTA-L», определение генотипа HBV - с помощью комплекта реагентов «АмплиСенс® HBV-Генотип-FL». Все указанные комплекты реагентов производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Результаты. Среди 858 образцов, включенных в исследование, ДНК HBV (без РНК HDV) была выявлена в 2,1% (18/858), что свидетельствует о наличии хронической инфекции, вызванной HBV. Среди всех ДНК HBV-положительных проб 94,4% (17/18) принадлежало коренному населению, 5,6% (1/18) – некоренному. Среди коренного населения частота встречаемости исследованного маркера составила 3,3% (17/509), среди некоренного – 0,3% (1/349).

РНК HDV была выделена из 2,9% (25/858) исследованных образцов, что свидетельствует о наличии HBV-HDV суперинфекции у лиц, от которых получены данные пробы. Среди всех РНК HDV-положительных проб 88% (22/25) принадлежало коренному населению, 12% (3/25) – некоренному. Частота встречаемости молекулярно-биологических маркеров HBV-HDV суперинфекции среди представителей коренного населения составила 4,3% (22/509), среди некоренного – 0,9% (3/349). Распространенность HDV среди коренных жителей с ГВ составила 52,4% (22/42), среди некоренных – 75% (3/4). ДНК HBV была амплифицирована только из 6 РНК HDV-положительных проб коренных жителей, для 19 - не удалось выделить ДНК возбудителя ГВ.

Для всех выявленных 24 ДНК HBV-положительных образцов была определена генотипическая принадлежность. По результатам исследования 70,8% (17/24) изолятов вируса относились к генотипу D, 29,2% (7/24) – к генотипу А. У единственного выявленного представителя некоренного населения с ГВ был обнаружен генотип D. Среди коренных жителей Якутии распределение D и А генотипов вируса было следующим – 69,6% (16/23) и 30,4% (7/23), соответственно.

Заключение. На территории исследованных регионов Республики Саха (Якутия) среди обследованного коренного населения распространенность молекулярно-биологических маркеров ГВ и HBV-HDV суперинфекции в несколько раз выше (ДНК HBV – в 10 раз, РНК HDV – в 4,8 раза), по сравнению с некоренными жителями. Для выявленных пациентов с ГВ из обеих исследованных групп характерна высокая распространенность инфекции, вызванной HDV.

При изучении генетического разнообразия было показано, что на территории республики доминируют те же самые генотипы HBV, что и в других регионах России – А и D, однако доля генотипа А значительно выше, чем в среднем по стране.

Список литературы

1. Г.Г. Онищенко, М.Е. Игнатьева, Л.В. Будацыренова, М.И. Михайлов. Эффективность вакцинопрофилактики гепатита В в Республике Саха (Якутия) // Здоровье населения и среда обитания.- 2016.- N 6, с. 36-39.

2. Слепцова С.С. Вирусные гепатиты В и D как основные факторы формирования цирроза и первичного рака печени в Республике Саха (Якутия)/ С.С. Слепцова, А.Г. Рахманова,Т.Т.Бугаева // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. - 2012.- N 2, с. 109-115.

3. Дмитриева Т.Г. Особенности эпидемиологии и течения хронических гепатитов у детей в Республике Саха (Якутия) // Российский педиатрический журнал.- 2015.- N 2, с. 32-36.

ВЫЯВЛЕНИЕ АНТИТЕЛ К БЕЛКУ CORE+1/ARFP HCV В СЫВОРОТКЕ КРОВИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА

Личная Е.В.[1], Климашевская С.Н.[2], Вербов В.Н.[1], Эсауленко Е.В.[1], Калинина О.В.[1]

[1] ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», Санкт-Петербург, Россия

[2] ООО «НПО «Диагностические системы», Нижний Новгород, Россия

Введение. Гепатит С (ГС) является одной из наиболее распространенных проблем общественного здравоохранения. В общей структуре хронических вирусных гепатитов (ХВГ) на долю гепатита С приходится почти 75%. ГС является одной из основных причин цирроза и гепатоцелюлярной карциномы.

В последнее время все больше изучается роль различных белков вируса в прогрессировании заболевания, в том числе белка F или core+1/ARFP (alternate reading frame protein), синтезируемого с альтернативной рамки считывания, расположенной в области core гена [1]. Состав и длина белка core+1 существенно варьирует в зависимости от генотипа вируса. В ряде исследований установлено, что антитела к данному белку имеют около 25% пациентов с ХГС и 50% больных ХГС с первичным раком печени [2].

Цель исследования – изучение возможности выявления антител к core+1 белку ВГС у анти-ВГС положительных лиц с использованием синтетического пептида.

Материалы и методы

Выявление антител к белку core+1 в образцах сыворотки крови проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА). В качестве антигена использовали синтетический пептид F 10 (110-131аа), соответствующий антигенной детерминанте F белка изолятов ВГС субтипа 1b. Для получения иммуносорбента применяли метод «пассивной» адсорбции. В качестве твердой фазы использовали планшеты фирмы «Nunc» (Дания). Антиген, разведенный до концентрации 5 мкг/мл в 0,02 М бикарбонатно-карбонатном буферном растворе (БКБ) ph=9,6, сорбировали в лунки микропланшета и инкубировали в течение 20 ч при комнатной температуре. Образцы сыворотки крови разводили 1:10 в буферном растворе (БР) (PBS с 0,05% Твин-20, содержавший 1% BSA), и вносили в объеме 100 мкл в лунки. Конъюгат (моноклональные мышиные антитела против тяжелой цепи IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена) разводили в БР 1:15000. Оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм. Для учета результатов применяли следующие параметры: коэффициент позитивности (КП) - отношение оптической плотности исследуемого образца к критической оптической плотности (ОПкрит), которая рассчитывалась по формуле 0,2 + среднее значение оптической плотности отрицательных образцов (ОПкрит=0,2+$ОП_{ср}К$-). Образцы считали положительными, если КП >2,0.

Для подтверждения иммуногенности и специфичности используемого синтетического пептида была проведена иммунизация мышей линии BALB/c (возраст 3 мес., вес 35-40 г). Мышей иммунизировали 4-кратно с интервалом в 2 недели. Антиген, разведенный до концентрации 1 мг/мл в 0,9% растворе хлористого натрия, смешивали с равным объемом полного (0, 4 недели) или неполного (2, 6 недели) адъюванта Фрейнда до получения эмульсии. Вводили антиген подкожно (0,1 мл эмульсии). Контрольной группой были интактные мыши линии BALB/c (возраст 3,5 мес., вес 32-35 г). Кровь забирали тотально через 12 дней после последнего введения антигена, полученные сыворотки аликвотировали и хранили при -20°С. Выявление антител к пептиду F10 в образцах мышиной сыворотки крови проводили методом ИФА, как описано выше. В качестве конъюгата использовали поликлональные козьи антитела против IgG мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена, которые разводили в растворе PBST (PBS с 0,05% Твин-20), содержащем 1% сыворотки крупного рогатого скота.

В работе исследовано 72 анти-HCV позитивных образца, 35 анти-HIV/анти-HCV позитивных образцов, 7 анти-HIV позитивных/анти-HCV негативных образцов, 31 HBsAg позитивный/анти-HCV негативный образец, 16 образцов сыворотки крови доноров, не содержавших антител к HCV, HBV, HIV.

Результаты

Способность пептида F10 стимулировать образование специфических антител была изучена в эксперименте на мышах линии BALB/c. Сыворотки, полученные от мышей, иммунизированных синтетическим пептидом F10, показали титры антител выше 1:1000. В сыворотках, полученных от интактных мышей, специфические антитела к пептиду F10 не выявлялись. Данные результаты подтвердили иммуногенность пептида F10.

При исследовании образцов сыворотки крови на наличие антител к белку core+1 методом ИФА с использованием синтетического пептида F10 были получены положительные результаты в 7 (9,7%) анти-HCV позитивных образцах с КП 2,0-5,8 и в 7 (20%) анти-HIV/анти-HCV позитивных образцах с КП 2,3-5,0 (Таблица 1). Среди анти-HIV позитивных/анти-HCV негативных, HBsAg позитивных/анти-HCV негативных образцов и образцов сыворотки крови доноров антитела к белку core+1 не определялись.

Выводы. Полученные результаты доказали иммуногенность и специфичность пептида F10, что позволяет использовать его в составе иммуносорбента для выявления антител к белку core+1.

Список литературы

1. Kotta-Loizou I., Vassilaki N., Pissas G., Bakiri L., Bartenschlager R., Mavromara P. Expression of the Novel Hepatitis C Virus Core1/ARF Protein in the Context of JFH1-Based Replicons. J. Virol. 2015; 89 (9):5164 –70.

2. Dalagiorgou G., Vassilaki N., Foka P., Boumlic A., Kakkanas A., Kochlios E. et al. High levels of HCV core+1 antibodies in HCV patients with hepatocellular carcinoma. J. Gen. Virol. 2011; 92 (6): 1343–51.

Таблица 1. Результаты выявления антител к белку core+1 HCV в образцах сыворотки крови

Группы образцов	Количество образцов	Количество образцов, в которых выявлены антитела к core+1, n (%)
анти-HCV(+)	72	7 (9.7%)
анти-HIV(+)/анти-HCV(+)	35	7 (20%)
анти-HIV(+)/анти-HCV(-)	7	0
HBsAg(+)/анти-HCV(-)	31	0
анти-HCV(-)	16	0
Всего	161	14 (8,7%)

РАСПРОСТРАНЁННОСТЬ ГЕНОТИПОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА В В ГВИНЕЙСКОЙ РЕСПУБЛИКЕ

Скляр И.В., Карандашова И.В., Карань Л.С., Чуланов В.П.

ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва

Введение. Проблема вирусного гепатита В (ГВ) является одной из самых актуальных в современной медицине. Согласно оценкам Всемирной Организации Здравоохранения в мире насчитывается порядка 240 млн человек с хроническим течением ГВ. Африка считается регионом гиперэндемичным по ГВ, однако страны, расположенные на территории этого континента, значительно отличаются друг от друга по распространенности инфекции, вызванной вирусом гепатита В (HBV) – более 8% инфицированного населения проживает в странах, расположенных к югу от Сахары и ряде восточноафриканских государств, 2-8% - в западноафриканском регионе, 2% - в странах, находящихся на севере материка.

На основании филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей полного генома HBV подразделяют на 10 генотипов, обозначающихся латинскими буквами от A до J. На территории Африки наиболее распространенными являются генотипы A, D и E HBV, каждый из которых доминирует в определенных регионах. Генотип A преобладает в центральных, южных и восточных прибрежных регионах, E – характерен для стран Западной Африки, D – циркулирует на севере континента [1-4].

Целью данного исследования явилось изучение генотипов HBV, циркулирующих на территории Гвинейской Республики.

Материалы и методы. Было исследовано 24 HBsAg-положительных образца плазмы крови, забранных у жителей Гвинейской Республики. Выделение нуклеиновых кислот из исследуемых проб проводили с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп». Выявление ДНК HBV, РНК HCV и РНК HDV проводили с использованием комплектов реагентов «АмплиСенс® HBV-FL», «АмплиСенс® HCV-FL» и «АмплиСенс® HDV-FL», соответственно. Определение генотипа HBV в ДНК HBV-положительных пробах проводили с помощью комплекта реагентов «АмплиСенс® HBV-Генотип-FL», предназначенного для выявления A, B, C и D генотипов вируса. Все указанные комплекты реагентов производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (ФБУН ЦНИИЭ). 11 изолятов HBV были охарактеризованы методом прямого секвенирования фрагмента S-гена длиной 950 п.н, 7 изолятов HBV, для которых не удалось получить ПЦР-фрагмент S-гена, - фрагмента P-гена длиной 970 п.н. Для получения ПЦР-фрагментов и их очистки для проведения последующего секвенирования были использованы реагенты ФБУН ЦНИИЭ. Прямое секвенирование проводили с использованием реагентов и на автоматическом секвенаторе 3500xl Genetic Analyzer производства Applied Biosystems (США). Для сборки полученных секвенированных последовательностей в консенсус-последовательность и филогенетического анализа было использовано программное обеспечение Geneious версии 6.1 (Biomatters Limited, Новая Зеландия, http://www.geneious.com/).

Результаты. ДНК HBV была амплифицирована из всех образцов плазмы крови, включенных в исследование. РНК HCV и РНК HDV в пробах не была обнаружена. Генотип HBV удалось определить для 79,2% (19/24) исследованных образцов, 20,8% (5/24) - не были генотипированы по причине низкой вирусной нагрузки. Среди всех образцов, для которых удалось установить генотипическую принадлежность, 5,3% (1/19) относились к генотипу A HBV, 94,7% (18/19) – к генотипу E HBV, доминирующему на территории изученного региона.

Заключение. В результате проведенного исследования на территории Гвинейской Республики была выявлена циркуляция двух генотипов HBV - A и E с явным доминированием последнего. Полученные результаты по частоте встречаемости указанных генотипов совпадают с литературными данными о распространенности различных генотипов HBV в Гвинейской Республике [1-4]. При проведении филогенетического анализа было показано, что все секвенированные изоляты генотипа E формируют монофилитический кластер с гвинейскими изолятами этого генотипа, взятыми из GenBank, что соответствует ранее полученным данным. Известно, что, несмотря на очень низкую вариабельность, характерную для изолятов генотипа E HBV (около 1,75%), штаммы данного генотипа, циркулирующие на территории определенной страны, формируют отдельный кластер на филогенетическом дереве [4].

Список литературы

1. Dong-De Xie et al. Seroprevalence of Human Immunodeficiency Virus, Hepatitis B Virus, Hepatitis C Virus, and *Treponema pallidum* Infections among Blood Donors on Bioko Island, Equatorial Guinea. PLoS One. 2015; 10(10): e0139947.

2. Pablo R. Hepatitis B, C, and D and HIV Infections among Immigrants from Equatorial Guinea Living in Spain. Am J Trop Med Hyg. 2013 Apr 3; 88(4): 789–794.

3. Penelope Garmiri et al. Deletions and recombinations in the core region of hepatitis B virus genotype E strains from asymptomatic blood donors in Guinea, West Africa. J. Gen. Virol., October 2009 90: 2442-2451.

4. Barbara V. et al. Analysis of Complete Nucleotide Sequences of Angolan Hepatitis B Virus Isolates Reveals the Existence of a Separate Lineage within Genotype E. PLoS One. 2014; 9(3): e92223.

КЛИНИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ ХРОНИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА D (ДЕЛЬТА) ПРИ РАЗЛИЧНОЙ РЕПЛИКАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ВИРУСОВ ГЕПАТИТА В И D В РЕСПУБЛИКЕ САХА (ЯКУТИЯ)

Семенов С.И.[1], Максимова С.С.[1], Писарева М.М.[2], Тихонова Н.Н.[3], Слепцова С.С.[4]

[1]Северо-Восточный федеральный университет, НИИ здоровья, Якутск, Россия
[2]ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия
[3]Якутская городская клиническая больница, отделение вирусных гепатитов, Якутск, Россия
[4]Северо-Восточный федеральный университет, Медицинский институт, Якутск, Россия

Введение. Хронический гепатит D (ХГD) представляет важную проблему здравоохранения Республики Саха (Якутия) вследствие их эпидемиологического распространения, а также тяжелых и фульминантных форм в период фазы активной репликации вируса. Установлена повышенная интенсивность циркуляции HDV-инфекции среди больных вирусным гепатитом В.

Целью исследования явилось установление клинических особенностей течения заболевания в зависимости от репликативной активности вирусов гепатита В и D.

Материалы и методы. Обследовано 83 больных гепатитом D, у которых определена репликативная активность вирусов гепатита В и D методом ПЦР в режиме реального времени с помощью наборов реагентов «АмплиСенс® HBV-Монитор-FL» и «АмплиСенс® HDV-Монитор-FL» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Все больные находились на стационарном лечении в инфекционном отделении для больных вирусным гепатитом Якутской городской клинической больницы (ЯКГБ) в 2015-2016 гг. Возраст больных составил от 28 до 78 лет. Больные также обследованы общеклиническими лабораторными методами, в том числе ИФА. Градация тяжести цирроза печени установлены по шкале Чайлд-Пью.

Основные результаты. В этиологической структуре хронических вирусных гепатитов установлена ведущая роль вируса гепатита D (HDV). Определен высокий для Российской Федерации удельный вес ХГD в структуре всех хронических вирусных гепатитов, составивший 40,0%. Имеющийся фактический материал свидетельствует о наличии различных вариантов течения HDV-инфекции, зависящих от репликативной активности каждого из вирусов гепатита В и D (Таблица 1).

Таблица 1. Клинико-лабораторная характеристика ХГD в зависимости от репликативной активности вирусов гепатита В и D

Признаки	ДНК HBV+ РНК HDV+	ДНК HBV- РНК HDV+	ДНК HBV+ РНК HDV-
Абсолютное кол-во больных ХГD (n-83)	17	41	25
Мужчины (%)	47,0	42,2	44,0
Женщины (%)	53,0	57,8	56,0
Средний возраст (лет)	41,8±4,1	45,2±7,7	51,5±8,5
Доля вариантов течения болезни, %	20,5	46,4	30,1
Клинико-лабораторная характеристика ХГD			
Высокая активность по клиническому диагнозу в %	71,0	17,0	25,0
АлАТ, Ед/л	349,9±228,9	67,9±33,8	65,5±26,6
Вирусная нагрузка РНК HDV, копий/мл	3.985.954±1.574.088	896.144±367.126	-
Вирусная нагрузка ДНК HBV, МЕ/мл	118±98	-	5.820±5.151
Цирроз печени, сформировавшийся в %	100,0 (у всех)	66,7	75,0

Из трех обнаруженных вариантов ХГD – репликация обоих вирусов (HBV+HDV, микст репликативный вариант) и репликация одного из вирусов (HBV или HDV, моно репликативный вариант), вариант, при котором регистрируется репликативная активность HBV и HDV отличается от двух других более тяжелым течением с неблагоприятным исходом. В условиях динамического наблюдения данной группы больных выявлено, что при выявлении репликативной активности HBV и высокой вирусной нагрузки HDV, хронический гепатит характеризуется прогрессирующим течением, яркой клинической картиной, цитолитическим синдромом. Наиболее высокая активность инфекционного процесса с интенсивным клиническим проявлением болезни при микст репликативном варианте выявлены у 71% больных (p<0,0001). Большинство больных ХГD этой группы стойко или временно утратили трудоспособность. При моно репликативном варианте (моно D/моно B) статистически значимых отличий в клиническом проявлении не выявлено. Повышение АлАТ при микст репликативном варианте было существенно выше 349,9±228,9 Ед/л, чем при каждом из моно репликативных вариантов (F=15,9; p=0,000002). Высокая вирусная нагрузка HDV 3.985.954±1.574.088 копий/мл и низкая концентрация ДНК HBV (среднее значение около 100 МЕ/мл), характерные для микст репликативного варианта, свидетельствуют о подавлении HDV репликации HBV.

Заключение. В регионе установлена повышенная интенсивность циркуляции HDV-инфекции. Гепатит D регистрируется у 40% госпитализированных больных с гепатитом B. Методы молекулярной диагностики позволяют выделить клинические варианты HDV-инфекции в зависимости от репликативной активности каждого из вирусов. Проведенные исследования еще раз доказывают, что при одновременной репликации обоих вирусов HBV и HDV заболевание имеет прогрессирующее, волнообразное течение с выраженным цитолитическим синдромом и с формированием цирроза печени.

ХГD чаще встречается среди молодых работоспособных людей и протекает в основном в тяжелой форме, с признаками портальной гипертензии, приводя к быстрой инвалидизации. Таким образом, основной особенностью хронического гепатита D является его преимущественная циррогенность. Высокая распространенность HDV-инфекции, характерная для нее низкая (вплоть до недетектируемой) репликативная активность HBV и ускорение прогрессирования поражения печени у больных с ХГD, подчеркивают важность обследования пациентов с гепатитом B на маркеры гепатита D для правильной постановки диагноза.

Работа проведена в рамках проекта ГЗ-№17.6344.2017/БЧ.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВИРУСА ГЕПАТИТА А В МОСКВЕ В 2014-2016 ГГ.

Волкова В.М.[1], Карандашова И.В.[2], Чуланов В.П.[2], Бургасова О.А.[1]

[1] ФГБОУ ДПО «РМАПО» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия
[2] ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение. Гепатит А (ГА) сохраняет важное эпидемиологическое значение в структуре инфекционных заболеваний на территории РФ. По данным Роспотребнадзора заболеваемость ГА за 2016 год в разных округах РФ неоднородна. Высокие уровни заболеваемости отмечены в Пермском крае (7,87$^0/_{0000}$ на 100 тыс. населения), Удмуртской Республике (7,27$^0/_{0000}$), Республике Дагестан (7,07$^0/_{0000}$), Калужской (6,37$^0/_{0000}$) и других областях. Заболеваемость ГА на территории Москвы за 2016 год практически не претерпела изменений по сравнению с аналогичными показателями прошлого года и составила 1,67$^0/_{0000}$ на 100 тыс. населения. Миграция населения приводит к увеличению генетического разнообразия циркулирующих штаммов вируса гепатита А (HAV) на территории мегаполиса Москва, изучение которого будет способствовать выявлению завозных случаев инфекции, установлению эпидемиологической связи между различными случаями заболевания и проведению клинико-эпидемиологического анализа.

Целью работы было изучение генетического разнообразия HAV, циркулирующего на территории Москвы, на основании анализа случаев заболевших ГА, госпитализированных в больницу им. Боткина в период с 2014 по 2016 гг.

Материалы и методы. Исследованы 80 образцов плазмы крови больных ГА. Средний возраст больных ГА составил 38 лет (18 до 77). В возрасте от 18 до 33 лет- 59,7% больных; в возрасте от 34 до 77 лет – 40,3%. Выделение РНК проводили с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп», выявление РНК HAV - комплектом реагентов «АмплиСенс® *HAV*-FL», обратную транскрипцию - комплектом реагентов «REVERTA-L». Для определения генотипов и субтипов HAV использовали экспериментальные комплекты реагентов «АмплиСенс® HAV-генотип I/III-EPh» и «АмплиСенс® HAV-генотип IA/IB-EPh», соответственно. Все указанные комплекты реагентов производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (ФБУН ЦНИИЭ). 15 изолятов HAV были охарактеризованы методом прямого секвенирования вариабельной области генома VP1/P2A длиной 410 п.н. Для получения ПЦР-фрагментов и их очистки для проведения последующего секвенирования были использованы реагенты ФБУН ЦНИИЭ. Прямое секвенирование проводили с использованием реагентов и на автоматическом секвенаторе 3500xl Genetic Analyzer производства Applied Biosystems (США). Филогенетический анализ штаммов осуществлялся методом Minimum Evolution модель TN93 (MEGA 5.1), статистическая значимость филогении оценивалась методом bootstrap 1000 повторов.

Результаты. Среди всех исследованных образцов плазмы крови 66 образцов (66/80, 82,5%) содержали РНК HAV. Для 57 изолятов вируса (57/66, 86,4%) была установлена генетическая принадлежность, для 9 (9/66, 13,6%) генотип определить не удалось вследствие низкой вирус-

ной нагрузки в образце. По результатам генотипирования 40 изолятов HAV (40/57, 70,2%), выявленных в исследуемых пробах, относились к IA субтипу HAV, 14 (14/57, 24,6%) – к IIIA субтипу и 3 (3/57, 5,2%) – к IB субтипу. Интересным является факт того, что только для одного из трех пациентов с выявленным IB субтипом вируса, было установлено пребывание в эндемичном по этому субтипу HAV регионе (Египет) за месяц до появления симптомов заболевания, двое других находились в Москве и Минске, соответственно.

Для всех выявленных изолятов IB субтипа HAV в ходе секвенирования были получены нуклеотидные последовательности фрагмента области генома VP1/P2A, также секвенирование было проведено для 11 изолятов IA субтипа и одного изолята IIIA субтипа. При проведении филогенетического анализа все секвенированные штаммы IB субтипа, принадлежали кластеру средиземноморских штаммов этого субтипа, единственный штамм IIIA субтипа - кластеру штаммов IIIA, циркулирующих на территории стран Средней Азии. Все 11 секвенированных изолятов IA субтипа HAV относились к кластеру штаммов IA субтипа, эндемичных для стран СНГ, причем 10 из них попадали в филогенетический кластер штаммов, не характерных для европейской части РФ, но встречающихся в странах Средней Азии, азиатских регионах РФ – Омской, Свердловской, Иркутской областях, Красноярском крае. Штамм IA субтипа HAV, выявленный в образце больной ГА, ранее посещавшей г. Луганск, принадлежал кластеру южных штаммов вируса, которые циркулируют в южных регионах РФ, а также на Украине.

Заключение. Результаты исследования показали**,** что HAV в Москве представлен двумя основными субтипами – IA и IIIA, причем IA субтип является доминирующим, что характерно для большинства регионов РФ в целом. Выявленные случаи ГА, вызванного IB субтипом вируса, носили явно завозной характер. При сравнении данных, полученных за исследуемый период и период с 1999 по 2007 годы, было показано, что в Москве практически не произошло значимых изменений популяционных частот встречаемости основных субтипов HAV – доля IA субтипа составила 70,2% по сравнению с 72,4% в 1999-2007 гг, IIIA - 24,6% по сравнению с 26,3%. Доля завозного IB субтипа наоборот выросла в 4 раза – с 1,3% до 5,2%, хотя туристический поток в эндемичный по этому субтипу средиземноморский регион в 2014-2016 гг. сократился. Интересным является тот факт, что среди всех секвенированных изолятов IA субтипа, не было выявлено штаммов вируса, эндемичных для европейской части РФ, которые всегда преобладали на территории Москвы и Московской области. Данное наблюдение может быть связано с небольшим количеством секвенированных образцов, или с возросшими миграционными потоками из неблагополучных по ГА регионов в Москву, что, вероятно, повлекло за собой смену доминирующих штаммов HAV.

ЭКСПРЕССИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ПОЛИПЕПТИДА НЕСТРУКТУРНОГО БЕЛКА NS4 ВИРУСА ГЕПАТИТА С В ПРОКАРИОТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ

Семижон П.А., Фомина Е.Г., Счеслёнок Е.П., Школина Т.В., Касницкая Т.Н., Дубков Н.А., Владыко А.С.

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Введение. Последние поколения современных иммунодиагностических препаратов для выявления инфекции, вызываемой вирусом гепатита С (ВГС), в обязательном порядке в качестве антитело-связывающего субстрата содержат Core, NS3, NS4 и NS5 - рекомбинантные и/или синтетические фрагменты структурных и неструктурных белков вируса. В связи с этим актуальным направлением исследований является получение высокоспецифичных рекомбинантных аналогов основных антигенов ВГС либо их фрагментов, для последующего включения в качестве антигенных компонентов в состав иммунодиагностических препаратов. Для получения препаративных количеств рекомбинантного антигена немаловажным является исходно высокий уровень экспрессии рекомбинантного полипептида в клетках-продуцентах, для чего широко используется технология fusion-белка – экспрессия химерного белка, который в своей структуре помимо основного белкового компонента (антигена) содержит так называемый белок-партнер. Помимо высокого уровня экспрессии, данная технология позволяет получать на выходе белок со свойствами, отличными от основного белка, что во многом определяет получение на последующих стадиях максимального количества высокоочищенного белкового препарата.

Целью настоящего исследования явилась экспрессия в прокариотической системе рекомбинантного fusion-белка, включающего антигензначимый фрагмент NS4 области ВГС в составе с тиоредоксином.

Материалы и методы. Используемые в качестве исходного материала образцы плазмы крови людей, содержащие РНК ВГС, были получены из Учреждения здравоохранения «Городская инфекционная клиническая больница» г. Минска.

Бактериальный штамм *Y. pseudotuberculosis* «Могилев» получен из Специализированной коллекции вирусов и бактерий, патогенных для человека, РНПЦ эпидемиологии и микробиологии.

В качестве исходного вектора для клонирования фрагментов ДНК использовали плазмидный вектор pJC40 [1].

Для выделения вирусной РНК из вируссодержащего материала (плазма крови) использовали наборы QIAamp MinElute Virus Spin Kit (Qiagen, 57704). Выделение бактериальной ДНК проводили с использованием набора реагентов «ДНК-сорб-В» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, РФ).

Олигонуклеотидные последовательности (праймеры)

TrxA Y.pseudo_for: 5'-CCGCGAAGCTTATGAGCGATAAA ATTATTCACCTG-3'

TrxA Y.pseudo_rev: 5'-GCGAATTCCAGATTTGCATCCAA GAACGC-3',

NS43aN_for: 5'-GCGCGAATTCAGCACCTGGGTGTTGCT TGGA-3',

NS43aN_rev: 5'-CGCCCGGGCAAGGCGCCTGARACW CC-3',

используемые для амплификации фрагментов ДНК, кодирующих тиоредоксин (*TrxA*) и антигензначимый фрагмент области NS4 ВГС, были синтезированы по заказу в ОДО «Праймтех», г. Минск.

Постановку обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) проводили с использованием коммерческого набора OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, 210210).

Анализ продуктов амплификации осуществляли методом электрофореза в 2 % агарозном геле, продукты рестрикции гибридных плазмид анализировали в 0,8 % агарозном геле. Электрофорез вели при напряжении тока 10 в/см геля в ТРИС-ацетатном буфере, pH 8,0. ДНК визуализировали окрашиванием геля бромистым этидием с последующим просмотром в УФ на трансиллюминаторе.

Гидролиз ДНК проводили с использованием специфических рестриктирующих эндонуклеаз производства Thermo Scientific.

Лигирование фрагментов ДНК в исходный вектор pJC40 проводили в объеме 30 мкл при температуре +22°С в течение часа с использованием T4 DNA Ligase (Thermo Scientific).

Трансформацию культуры клеток плазмидной ДНК осуществляли методом теплового шока [2].

Выделение плазмидной ДНК осуществляли с использованием коммерческого набора реагентов QIAprep Miniprep Kit (Qiagen, 27104).

Электрофорез в полиакриламидном геле проводили по методу Laemmli [3].

Результаты. Для получения векторной конструкции, обеспечивающей экспрессию рекомбинантного полипептида, включающего антигензначимые участки NS4 ВГС в качестве дополнительного белка использовали тиоредоксин (*TrxA*). По имеющимся данным, это обеспечивает высокий выход экспрессируемого fusion-белка в растворе (растворимую фракцию) и правильность замыкания дисульфидных связей у белков с высоким содержанием цистеина [4]. Первоначально на матрицах ДНК *Y.pseudotuberculosis* и РНК ВГС были амплифицированы фрагменты ДНК размерами 330 п.о. для тиоредоксина (включая сайты для клонирования HindIII и EcoRI) и 626 п.о. для NS4 (включая сайты для клонирования EcoRI и SmaI). Полученные ампликоны были последовательно клонированы в полилинкер экспрессирующего вектора pJC40, далее была проведена селекция гибридных клонов клеток и оценка специфичности вставок методом рестрикционного анализа. Для осуществления биосинтеза рекомбинантного химерного полипептида проводили трансформацию клеток *Escherichia coli,* штамм BL21(DE3), полученной гибридной плазмидой. Экспрессию рекомбинантного полипептида индуцировали внесением в среду культивирования ИПТГ. Оценку уровня экспрессии проводили методом ПААГ-элетрофореза. В результате проведенных исследований показана эффективная экспрессия рекомбинантного fusion-белка с распределением в области 32 кДа на фоне подавления синтеза клеточных белков.

Дальнейшие исследования позволят оценить возможность получения высокоочищенного препарата данного fusion-белка методом аффинной металлохелатной хроматографии и провести оценку его антигенных свойств.

Заключение. На основе методов генетической инженерии получена уникальная векторная конструкция, обеспечивающая эффективную экспрессию в прокариотической системе fusion-белка тиоредоксин-антигензначимый фрагмент NS4 ВГС.

Список используемой литературы

1. Clos, J. pJC20 and pJC40- two high-copy-number vectors for T7 RNA polymerase-dependent expression of recombinant genes in Escherichia coli / J. Clos, S. Brandau // J. Protein Exp. Purif. – 1994. – Vol. 5. – P. 133-137.

2. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э.Фрич, Дж. Сэмбрук. – Москва, Мир, 1984 - 480с.

3. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // Nature. - 1970. - Vol. 227 - P. 680-685.

4. McCoy, J., Lavallie, E. Expression and purification of thioredoxin fusion proteins // Curr. Protoc. Mol. Biol. – 2001. - Chapter 16: Unit16.8.

ВЫЯВЛЕНИЕ ДНК ВИРУСА ГЕПАТИТА В, РНК ВИРУСА ГЕПАТИТА С В ОБРАЗЦАХ КРОВИ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ В ЛАБОРАТОРИЯХ Г. ЧИТЫ

Зимина А.В., Страмбовская Н.Н., Дутова А.А.

ФГБОУ ВО «ЧГМА» Минздрава России, Чита, Россия

Введение. Парентеральные вирусные гепатиты В (ВГВ) и С (ВГС) у медицинских работников – актуальная проблема профпатологии, так как они являются группой высокого риска инфицирования по сравнению с населением. Согласно данным доклада главного внештатного инфекциониста Министерства здравоохранения Забайкальского края Е.В.Веселовой, на территории Забайкальского края в 2015 г. показатель заболеваемости ВГС в 2,5 раза превысил показатель заболеваемости ВГВ и составил 35,13 на 100 тыс. населения при показателе ВГВ – 13,89.

Цель. Выявить ДНК вируса гепатита В (HBV), РНК вируса гепатита С (HCV) в образцах крови, используемых при различных видах исследований в лабораториях г. Читы.

Задачи

1. Определить частоту качественного выявления ДНК HBV, РНК HCV в образцах исследуемой крови;

2. Определить концентрацию ДНК HBV и РНК HCV в положительных образцах.

Материалы и методы. В исследование включены 166 образцов крови, стабилизированные ЭДТА, паци-

ентов, средний возраст которых составил 38,1 ± 17,35. Среди них: 66% женщины (110 человек) и 34 % мужчины (56 человек). Для исследования были использованы образцы плазмы крови пациентов. Выделение ДНК и РНК вирусов проводили с помощью комплекта реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА–НК) компании ООО «НПО ДНК-Технология», Россия. Выявление и количественное определение ДНК HBV проводилось методом PCR-RT; выявление и количественное определение РНК HCV проводилось методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с использованием детектирующего амплификатора ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия). Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью программы MicrosoftOfficeExcel 2013. Производился расчет качественных величин. Для представления количественных величин вычисляли среднее значение, стандартное отклонение; медиану, 1 и 3 квартили.

Результаты. ДНК HBV, РНК HCV были обнаружены в 2,4% случаев (образцы крови 4х пациентов). ДНК HBV выявлялась в 1,2 % случаев (образцы крови 2х пациентов). При количественном определении ее средняя концентрация составила $6,08*10^2$копий/мл [$5,36*10^2$;$6,8*10^2$] ($2,25*10^2$ МЕ/мл [$1.98*10^2$; $2.52*10^2$]), что соответствует низкому уровню вирусной нагрузки (до $4*10^5$ МЕ/мл). РНК HCV выявлялась в 1,2 % случаев (образцы крови 2х пациентов). При количественном определении ее средняя концентрация составила $4,65*10^8$ копий/мл [$2,35*10^8$;$6,97*10^8$] ($1,7*10^8$ МЕ/мл [$1,37*10^8$;$4,1*10^8$]), что соответствует высокому уровню вирусной нагрузки (свыше $8*10^5$ МЕ/мл).

Выводы. Учитывая результаты проведенного исследования, наибольшую обеспокоенность вызывает высокая вирусная нагрузка для вируса гепатита С, в отношении которого отсутствуют меры специфической профилактики (вакцинация), в отличие от вирусного гепатита В. В связи с этим, должны строже соблюдаться меры по профилактике заражения парентеральными гепатитами на рабочем месте, в том числе использование средств защиты (очков, перчаток, масок и защитной одежды), безопасная организация труда, а также непрерывное обучение персонала методам профилактики инфекции, согласно распоряжению Министерства здравоохранения Забайкальского края № 2544 «О мерах по профилактике заражения ВИЧ и парентеральными гепатитами на рабочем месте».

Список литературы

1. Главный внештатный инфекционист Министерства здравоохранения Забайкальского края Е.В.Веселова, доклад «Внедрение лечения больных с ХВГ по программе ОМС: проблемы, пути решения». [Электронный ресурс]. - Режим доступа: http://75.rospotrebnadzor.ru/activities/epidem_nadzor/;

2. Распоряжение Министерства здравоохранения Забайкальского края № 2544 «О мерах по профилактике заражения ВИЧ и парентеральными гепатитами на рабочем месте», г. Чита, Приложение № 1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВРЕМЕНИ НАЧАЛА ЦИРКУЛЯЦИИ СУБТИПА 3А ВИРУСА ГЕПАТИТА С НА ТЕРРИТОРИИ СССР

Мануйлов В.А.[1], Чуб Е.В.[2], Кичатова В.С.[3], Соболева Н.В.[3], Исаева О.В.[3], Нетесов С.В.[2,4]

[1]Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия
[2]ФБУН «ГНЦ ВБ "Вектор"» Роспотребнадзора, Новосибирская область, р. п. Кольцово, Россия
[3]Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования МЗ РФ, Москва, Россия
[4]Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Введение. Вирус гепатита С (ВГС) – высоковариабельный РНК-содержащий вирус рода *Hepacivirus* в составе семейства *Flaviviridae*. Изменчивость участков генома ВГС, составляющего около 9 600 нуклеотидов, различна. В частности, регион NS5b, кодирующий последовательность вирусной полимеразы, накапливает замены с долгосрочной скоростью $1,3\times10^{-3}$ замен на сайт в год и является более вариабельным, чем, например, регион Core (кодирует белок вирусного нуклеокапсида), для которого показана скорость накопления замен до $6,5\times10^{-4}$ замен на сайт в год. Генетическая классификация ВГС выделяет 7 генотипов (обозначаются 1-7) и несколько десятков субтипов (1a,1b и т.д.) данного патогена. При этом гомология последовательностей РНК ВГС разных генотипов составляет всего 65-70%, а разных субтипов в пределах одного генотипа – 75-85%. Субтипы ВГС могут демонстрировать различные патологические и эпидемиологические особенности. Так, наиболее распространенные в мире (и в России) субтипы 1b и 3a отличаются как по клиническим проявлениям (субтип 1b более устойчив к некоторым формам терапии), так и по преимущественному способу заражения. Если для субтипа 3a ВГС показана достоверная связь с передачей через внутривенное употребление наркотических средств, то трансмиссия субтипа 1b ассоциирована, главным образом, с нозокомиальными факторами риска. Это позволяет отдельно рассматривать и изучать субпопуляции этих субтипов ВГС, циркулирующих в одних и тех же локальных (географических) группах населения.

Цель. Настоящее исследование посвящено определению времени начала циркуляции субтипа 3a ВГС на территории стран бывшего СССР.

Материалы и методы. Исследовали 2136 последовательностей (далее – «изолятов») фрагмента региона NS5b, относящихся к субтипу 3a ВГС. Из них 62 изолята были получены на территории России в оригинальном исследовании, а 2074 изолята – из международной базы данных *http://hcv.lanl.gov*. Для каждого изолята был известен год его сбора. Из общего числа изолятов 316 происходили из стран бывшего СССР: 29 – из Азербайджана, 24 – из Литвы, 199 – из России, 3 – из Таджикистана, 22 – из Узбекистана, 36 – из Эстонии. Все 2136 последовательно-

стей использовали для проведения филогенетического анализа – методами Maximum Likelihood (ML), Neighbor Joining (NJ) и UPGMA.

Основные результаты. На полученных любым из филогенетических методов дендрограммах 267 из 316 изолятов из бывшего СССР сформировали три обособленных филогенетических кластера, что является свидетельством общего происхождения данных изолятов. Для каждого из кластеров были реконструированы вероятные консенсусные последовательности ближайших общих предков и произведена оценка времени их завоза в СССР методом молекулярных часов. Для этого использовали показатель скорости накопления полиморфизмов для региона NS5b ВГС – $1,3\times10^{-3}$ замен на сайт в год, а также учитывали дату получения каждого из анализируемых изолятов и отношение числа замен типа транзиции/трансверсии для субтипа 3а равное 4,0. Анализ показал, что предковые изоляты для трех кластеров последовательностей из стран бывшего СССР существовали в 1981±1, 1984±2 и 1985±2 годах соответственно (указаны средние значения и доверительные интервалы для них, определенные при помощи распределения Стьюдента).

Начало распространения субтипа 3а ВГС в СССР в начале и середине 1980-х годов хорошо согласуется с историческими обстоятельствами и сопряженными эпидемиологическими факторами этого периода. Как отмечалось выше, способ передачи данного субтипа в основном связан с употреблением наркотиков. Еще в 1970-х годах наркомания не была широко распространена в СССР (исходя из официальных данных советского здравоохранения). Однако уже к 1985 году сначала западные, а затем и отечественные исследователи отмечают нарастание незаконного оборота наркотических средств и их употребления в СССР с окончательным признанием серьезности этой проблемы в начале 1990-х годов правительственными источниками. Существуют также данные о том, что начало войны в Афганистане в 1979 г. способствовало увеличению доступности нелегальных опийных средств для населения Советского Союза и, возможно, интродукции ассоциированных вариантов парентеральных инфекций.

Тот факт, что 49 из 316 исследованных изолятов из бывшего СССР не вошли ни в один из кластеров может быть объяснен последующими заносами инфекции субтипа 3а ВГС на эту территорию. Завозные случаи ВГС из стран Европы во второй половине 1990-х годов отмечены рядом авторов, исследовавших разнообразие ВГС в Прибалтике и в европейской части России. Следует также отметить, что описанные нами три кластера, помимо изолятов ВГС из стран бывшего Советского Союза, включали также и 55 изолятов из других стран, при этом большая часть из них получены в Китае (23 изолята) и на Кипре (11). Авторы некоторых из этих последовательностей в своих публикациях отмечают их обнаружение в группах населения, имевших миграционные связи с населением бывшего СССР, что только подтверждает общее происхождение изолятов в обнаруженных кластерах.

Отметим, что аналогичные территориальные кластеры не могли быть получены при анализе изолятов субтипа ВГС 1b из стран бывшего СССР и других стран. Это является следствием более широкого распространения и длительности эволюции данного субтипа у человека, что привело к относительной гомогенности субпопуляции этого варианта ВГС в различных областях земного шара.

Заключение. Обобщая результаты настоящего исследования, можно заключить, что инфицирование населения территории бывшего СССР ВГС субтипа 3а происходило, по крайней мере, трижды в начале и середине 1980-х годов (причем первая такая интродукция данного патогена достоверно произошла раньше других и пришлась на 1981±1 год) и было, очевидно, связано с распространением явления наркомании в Советском Союзе в этом историческом периоде.

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ МАРКЕРОВ ЭНТЕРАЛЬНЫХ ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТОВ СРЕДИ ТРУДОВЫХ МИГРАНТОВ, ПРИБЫВАЮЩИХ В РОССИЙСКУЮ ФЕДЕРАЦИЮ

Алсалих Н.Д.[1], Сычев Д.А.[2], Потемкин И.А.[3,4], Кюрегян К.К.[3,4], Михайлов М.И.[1,3,4]

[1] ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия
[2] ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Московской области», г. Мытищи, Россия
[3] ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия
[4] ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, Москва, Россия

Введение. Миграция населения является одним из важных факторов, определяющих распространение многих инфекций. В настоящее время Россия занимает одно из ведущих мест в мире по притоку трудовых мигрантов. Завозные случаи гепатитов А и Е в Российской Федерации описаны, однако потенциальный вклад трудовой миграции в распространение этих инфекций остается неизученным.

Цель. Определение распространенности маркеров гепатитов А и Е среди трудовых мигрантов, недавно прибывших в РФ из стран с разной степенью эндемичности в отношении этих инфекций.

Материалы и методы. Были исследованы образцы сыворотки крови от 1333 трудовых мигрантов, недавно прибывших в РФ из Узбекистана (n=464), Таджикистана (n=415), Украины (n=308) и Молдовы (n=146). Анти-ВГА IgG, анти-ВГЕ IgM и IgG определяли с помощью коммерческих ИФА-тестов. РНК ВГЕ определяли в образцах, положительных по анти-ВГЕ IgM, методом ОТ-ПЦР с вырожденными праймерами к участку генома ВГЕ, кодирующему капсидный белок.

Результаты. Анти-ВГЕ IgG достоверно чаще выявлялись среди мигрантов из Узбекистана и Таджикистана по сравнению с мигрантами из Украины и Молдовы (25,4%

и 43,1%, соответственно, против 7,8% и 12,3%, соответственно, p<0,05), что отражает степень эндемичности в отношении гепатита Е регионов происхождения обследованных лиц. Частота выявления анти-ВГА IgG также зависела от страны происхождения – серопозитивные лица достоверно реже встречались среди мигрантов из Украины по сравнению с лицами, прибывшими из Молдовы, Узбекистана и Таджикистана (70,1% против 91,8%, 98,7%, 99,8%, соответственно, p<0,05). Анти-ВГЕ IgM, свидетельствующие о текущей или недавно перенесенной инфекции, выявляли среди мигрантов из Узбекистана, Таджикистана, Украины и Молдовы с примерно одинаковой частотой – 3,9%, 7,8%, 5,8% и 6,8%, соответственно. Ни в одном из образцов, положительных по анти-ВГЕ IgM, не была выявлена вирусная РНК, что, по-видимому, связано с коротким периодом виремии при гепатите Е.

Заключение. Значительная доля трудовых мигрантов, прибывающих в РФ, имеют анамнестические антитела к ВГА и ВГЕ, величина этого показателя отражает степень эндемичности страны происхождения мигрантов. Высокая частота выявления анти-ВГЕ IgM у трудовых мигрантов, свидетельствующая о текущей или недавно перенесенной инфекции, позволяет предполагать высокую вероятность завоза ВГЕ в РФ, что делает необходимым включение в алгоритм обследования маркеров острой ВГЕ-инфекции.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ПОДГЕНОТИПОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА В В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Гасич Е.Л., Еремин В.Ф., Немира А.С.

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Республика Беларусь

Введение. Среди классических методов, использующихся для диагностики инфекции, вызванной вирусом гепатита В *(ВГВ*), таких как ИФА и ПЦР, в последнее время все большее внимание привлекают методы изучения генетического разнообразия вируса [1–3]. С одной стороны, это необходимо для решения фундаментальных задач, таких как изучение вопросов возникновения и эволюции вируса, его распространения в человеческой популяции, с другой - прикладных, которые наиболее актуальны в области разработки новых диагностических препаратов, иммунопрофилактики инфекции, тактики лечения и возможного прогноза исхода заболевания, а также проведение молекулярно-эпидемиологического надзора и расследование случаев инфицирования *ВГВ* [4–7].

Цель исследования. Изучить частоту встречаемости генотипов/подгенотипов *ВГВ* на территории Республики Беларусь в течении 2004-2016 годов, в группах населения с разными рисками инфицирования и установить особенности их распространения.

Материал и методы. Исследовано 696 образцов сывороток/плазмы крови *ВГВ* -инфицированных пациентов из Беларуси. Нуклеотидные последовательности *ВГВ* получали путем амплификации Р участка генома (обратная транскриптаза). Филогенетические деревья строились с применением алгоритма ML (maximum likelihood) в программе PHYML (Phylogenetic maximum likelihood), с моделью замены нуклеотидов GTR. Оптимизация топологии дерева - Best of NNIs and SPRs. Для расчёта статистической достоверности кластеров использовался тест SH-aLRT. Кластеры считались достоверными в случае значения SH-aLRT ≥0.9. Визуализация деревьев осуществлялась в программе FegTree v.1.4.2. С целью установления особенностей филогенетической кластеризации фрагментов ДНК *ВГВ*, полученных после секвенирования, с помощью программы Blast было отобрано по 100 максимально идентичных референс-последовательностей для каждой анализируемого образца.

Кластеры, в которых присутствовало ≥80% «белорусских» последовательностей, были определены как кластеры «белорусской» передачи. Кластеры, содержащие 2 последовательности (обозначены на рисунках как D группы), были определены как пары, имеющие генетически близкородственные вирусы. Кластеры, включающие от 3-11 последовательностей (обозначены на филогенетических деревьях как N группы), определены как средние. Кластеры, образованные 12 и более последовательностями (обозначены на филогенетических деревьях как С группы) – как крупные. Кластеры, в которых присутствовало ≤80% «белорусских» последовательностей, были определены как смешанные кластеры (обозначены на филогенетических деревьях как А группы).

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программы Statistica v.10.

Результаты исследований. Анализ результатов молекулярно-генетического типирования *ВГВ* показал, что доминирующим являлся D генотип, выявленный в 560 (80,5%) образцах. Генотип А был выявлен в 127 (18,2%) пробах, генотип С – в 6 (0,7%) и в одном – В генотип (0,1%) вируса. В образцах, полученных от двух пациентов (по одной пробе), обнаружили рекомбинантные формы вируса - A/D/C (0,1%) и D/A (0,1%). Средний возраст (медиана) пациентов, инфицированных А и D генотипами *ВГВ*, практически не отличался и составлял 32,0 и 34,0 года соответственно. Пациенты, инфицированные С генотипом *ВГВ*, были значительно моложе - 19,0 лет, однако ввиду малочисленности наблюдений (n=6) разница по отношению к D и А генотипам статистически недостоверна.

Генотип D *ВГВ* объединял четыре подгенотипа: 109 (19,5%) образцов относились к D1 подгенотипу, 283 (50,5%) – к D2, 163 (29,1%) – к D3 и в 5 случаях (0,9%) был определен D4 подгенотип вируса. При филогенетическом анализе было установлено, что каждый из А, С и В генотипов *ВГВ* были представлены только одним подгенотипом – A2, C2 и B4 соответственно.

Распределение основных А и D генотипов *ВГВ* в группах пациентов с разными путями заражения характеризовались высокой степенью сходства. Анализ удельного веса D и А генотипов *ВГВ* показал, что их соотношение

варьировало в пределах от 3,6:1 (78,3%/22,2%) в группе лиц с контактно-бытовым/гетеросексуальным путями заражения до 8,0:1 (88,9%/11,1%) в группе лиц, употребляющих инъекционные наркотики (p>0,05). Во всех исследуемых группах отмечалось достоверное увеличение D генотипа *ВГВ* по сравнению с A генотипом вируса (p<0,02). В то же время оценка распространённости отдельных подгенотипов D генотипа *ВГВ* показала высокую частоту встречаемости D2 подгенотипа *ВГВ* среди лиц, употребляющих инъекционные внутривенные препараты, по сравнению с D1 и D3 подгенотипами *ВГВ*.

Результаты филогенетического анализа показали, что 85,5% нуклеотидных последовательностей D2 подгенотипа, 71,4% *ВГВ* D3 и 80,0% *ВГВ* D4 формировали достоверные «белорусские» кластеры, имеющие значение узла SH-aLRT более 0.9, что свидетельствует о распространении этих вирусов приемущественно внутри страны. Напротив, доля образцов из «белорусских» кластеров, образованных нуклеотидными последовательностями A2 и D1 подгенотипов *ВГВ*, составила менее 50%. В ходе настоящего исследования были установлены «иммигрогенотипы», завезенные в страну из Китая (C2) и Вьетнама (B4).

Показано достоверное генетическое сходство исследованных нуклеотидных последовательностей A2 подгенотипа с сиквенсами из стран Европы (преимущественно Польши), D1 – из стран Юго-Восточной Азии, D2 – из России и стран Балтии и D3 – России и стран Центральной и Восточной Азии, Европы.

Заключение. На основании данных филогенетического анализа показано, что в Беларуси преобладает D генотип *ВГВ* (80,5%). Вторым по встречаемости явился A подгенотип, которым было инфицировано 18,2% пациентов. Впервые показано, что распространение подгенотипов *ВГВ* в стране происходит различными путями. Нуклеотидные последовательности A и D подгенотипов *ВГВ* из Беларуси были сходны с образцами, описанными в странах Европы, России, Азии. Комплексное молекулярно-генетическое исследование проб от пациентов, проживающих во всех областях страны, будет способствовать пониманию эпидемиологической ситуации по *ВГВ* -инфекции и разработке целевых профилактических мероприятий.

Список литературы

1. M. Ciccozzi et al. J Med Virol. – 2014. – Vol. 86. – № 1. – P. 109-16.
2. Croagh C.M. World Journal of Hepatology. – 2015. – Vol. 7. –№ 3. – P. 289.
3. S. Ghosh et al. 2013. – Vol. 20. – № 3. – P. 209-218.
4. S. Hahné et al. PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8. – № 7. – P. e67866.
5. A. Caballero et al. PLoS One. – 2015. – Vol. 10. – № 12. – P. e0144816.
6. M. Chudy et al. Hepatology (Baltimore, Md.). – 2006. – Vol. 44. – № 1. – P. 99-107.
7. H. Al Zabadi, H. Rahal, R. Fuqaha. BMC Infectious Diseases. – 2015. – Vol. 16. – № 1.

ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ МАРКЕРОВ ГЕПАТИТА С СРЕДИ УСЛОВНО ЗДОРОВОГО НАСЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Соболева Н.В.[1], Карлсен А.А.[2,3], Кожанова Т.В.[1,4], Кичатова В.С.[2,3], Клушкина В.В.[5], Исаева О.В.[2,3], Игнатьева М.Е.[6] , Романенко В.В.[7], Ооржак Н.Д.[8], Малинникова Е.Ю.[2,3], Кюрегян К.К.[2,3], Михайлов М.И. [2,3]

[1] ФГБНУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова»
[2] ФГБОУ ДПО «РМАПО» Минздрава России
[3] ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»
[4] ГБУЗ «НПЦ медицинской помощи детям с пороками развития челюстно-лицевой области и врожденными заболеваниями нервной системы» ДЗМ
[5] ФГБОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России
[6] Управление Роспотребнадзора по Республике Саха (Якутия), г. Якутск
[7] ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии Свердловской области», г. Екатеринбург
[8] ГБУЗ РТ «Инфекционная больница», Республика Тыва, г. Кызыл

Введение. Гепатит С (ГС) является одной из важнейших медико-социальных проблем здравоохранения во многих странах мира, в том числе и в Российской Федерации. Фундаментальные научные исследования молекулярной биологии вируса гепатита С (ВГС) позволили расшифровать различные аспекты его репликации и создать высокоэффективные безинтерфероновые лекарственные препараты. Наличие таких лекарств сделало реальными разработку и осуществление программ по контролю за гепатитом С. В разрабатываемых глобальных и региональных программах контроля за ГС существенное место отводится определению широты распространения ВГС в различных группах населения. Изменение интенсивности циркуляции ВГС находит своё отражение в частоте обнаружения анти-ВГС и РНК ВГС, что делает актуальным проведение новых скрининговых исследований.

Цель. Определить долю инфицированных ВГС лиц в различных возрастных группах условно здорового населения, проживающих в регионах России с разными уровнями заболеваемости гепатитом С.

Материалы и методы. Исследованы образцы сыворотки крови, полученные от условно здорового населения РФ из пяти географически удаленных регионов с разным уровнем заболеваемости гепатитом С: Свердловской, Ростовской, Московской областей, Республики Тыва и Республики Саха (Якутия). Всего исследовано

4764 образца, полученные от лиц из 10 возрастных групп: меньше 1 года, 1-4 лет, 5-9 лет, 10-14 лет, 15-19 лет, 20-29 лет, 30-39 лет, 40-49 лет, 50-59 лет, старше 60 лет. Анти-ВГС определяли методом иммуноферментного анализа с коммерческими тест-системами. РНК ВГС в полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с использованием праймеров к 5′-нетранслируемой области (5′-НТО). Выделение нуклеиновых кислот проводили с помощью набора «QIAamp Viral RNA Mini Kit (производитель Qiagen GmbH)» по протоколу производителя из образцов сыворотки крови объемом 140 мкл.

Результаты. Общая распространенность анти-ВГС в 5 регионах РФ составила 2,6% (126/4764), доля лиц с текущей ВГС-инфекцией (положительный результат выявления РНК ВГС) - 1,1% (50/4764). Наибольшая распространенность анти-ВГС была выявлена в Республиках Тыва и Якутия (3,3%), в остальных регионах данный показатель варьировал от 1,7% (Московская область) до 3,0% (Свердловская область). Наибольшая частота выявления РНК ВГС была отмечена в двух регионах: Республике Тыва и Ростовской области (1,3% в обоих регионах). В Якутии частота выявления РНК ВГС составила 1,2% (12/982), в Московской области - 0,9% (9/910), в Свердловской области – 0,6% (5/871). Пиковые показатели выявления анти-ВГС в разных регионах были приурочены к разным возрастным группам: ≥ 60 лет в Республиках Тыва и Якутия (11,0% и 9,9%, соответственно), 40-49 лет в Московской области (6,2%), 1-4 года и 30-39 лет в Свердловской области (5,9% и 4,9%, соответственно), 20-39 лет в Ростовской области (3,9%). Среди лиц в возрасте от 0 до 19 лет РНК ВГС не была выявлена ни в одном регионе, за исключением Республики Тыва (1% (1/98) в группе 15-19 лет). Пиковые показатели выявления РНК ВГС в Ростовской области были выявлены в возрастных группах 20-29 лет и 30-39 лет (3,9% и 3,0%, соответственно); в Якутии - в возрастной группе 30-39 лет (3,7%), в Тыве - в возрастной группе 40-49 лет (3,6%), в Московской области - в возрастных группах 20-29лет и 30-39 лет (2,9% и 2,5%, соответственно).

Заключение. Результаты выявления маркеров ГС в различных возрастных когортах условно здорового населения РФ свидетельствуют о высокой степени пораженности ВГС практически всех возрастных групп в интервале от 20 лет до ≥ 60 лет. В каждом из обследованных регионов выявлены возрастные когорты, для которых целесообразно включение в региональные скрининговые программы.

ПЦР КАК МЕТОД В КОМПЛЕКСНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ГЕПАТИТА С

Хайтович А.Б., Колесникова И.О.

ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернандского», Медицинская академия им. С.И. Георгиевского, Симферополь, Россия

Введение. Гепатит С (ГС) - антропонозная инфекция с парентеральным механизмом передачи и поражением печени. По оценкам Всемирной организации здравоохранения около 3 % населения планеты, или около 300 миллионов человек, инфицировано гепатитом С, и ежегодно в мире выявляется 3-4 миллиона случаев инфицирования. В России инфицированность вирусом гепатита С (ВГС) составляет около 2%. Однако тенденции в распространении острого гепатита С (ОГС) и хронического гепатита С (ХГС) отличаются. В последние годы произошло снижение ОГС, так уровень заболеваемости в 2013 году в России на 100 тыс. населения снизился в 15 раз по сравнению с 2000 г. Заболеваемость ХГС на 100 тыс. населения в 2013 г. незначительно увеличилась, по сравнению с 2005 г. в 1,2 раза. В Крыму регистрируется около 2000 инфицированных вирусным гепатитом С. Своевременное выявление инфекционного процесса, вызванного вирусом гепатита С, и определение его формы, а также контроль течения заболевания осуществляется с помощью методов лабораторной диагностики.

Для выявления инфицированных ВГС и слежения за состоянием пациентов с ГС применяются специфические и неспецифические методы лабораторной диагностики. Среди специфических методов лабораторной диагностики ГС наибольшее распространение получили молекулярно-генетические и серологические, а среди неспецифических – общий и биохимический анализ крови, фиброскан, ультразвуковая диагностика печени и.т.д.

В настоящее время наиболее доступным лабораторным методом для выявления ВГС является молекулярно-генетический, который использует технологию полимеразной цепной реакции (ПЦР) в т.ч. ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени. ПЦР выявляет специфический фрагмент РНК ВГС в крови больного. Используют качественное выявление и количественное определение РНК ВГС. Качественный вариант применяют для обнаружения в организме человека ВГС и его использование возможно через несколько дней после заражения, еще до появления специфических антител. Количественный вариант ПЦР применяют для определения вирусной нагрузки. Использование количественного теста целесообразно для мониторинга специфического лечения ХГС химиотерапевтическими препаратами.

В диагностике ГС необходимо использовать определение генотипа ВГС до начала противовирусной терапии для выбора схемы лечения. Генотипирования ВГС позволяет в определенных случаях установить завоз нового генотипа вируса с других территорий, а также изучить распространенность циркулирующих генотипов ВГС на определенных территориях и проследить ее динамику за определенный временной период.

Серологические методы широко применяются для диагностики ГС, при этом проводится определение специфических анти-ВГС класса IgG или суммарных IgG и IgM иммунохимическими методами в скрининговых и подтверждающих исследованиях. В подтверждающем тесте, как правило, проводится определение антител к индивидуальным белкам ВГС - core, NS3, NS4, NS5 методом ИФА или иммуноблоттинга. Антитела к ВГС в крови больного обнаруживаются через 2-3 недели от момента инфицирования.

Неспецифические методы диагностики (общий и биохимический анализ крови, фиброскан, ультразвуковая диагностика печени) применяются для оценки состояния и степени поражения печени.

Цель исследования. Использовать современные высокоэффективные методы лабораторной диагностики для установления формы инфекционного процесса, прогноза заболевания и терапии.

Материалы и методы. В исследование были включены образцы 30 пациентов с ГС. Для оценки эффективности лабораторной диагностики ГС, выполнена комплексная лабораторная оценка состояний у 30 пациентов с установлением формы инфекционного процесса. Наряду с клиническими исследованиями проведено анкетирование больных для полноты оценки состояний. Возраст пациентов составлял 25-47 лет (медиана – 33 года), что позволяет отнести эту категорию обследованных по классификации ВОЗ к лицам молодого возраста. Были использованы качественные и количественные молекулярно-генетические тесты для выявления и определения концентрации ВГС, проведено определение генотипа ВГС, уровни активности аланинаминотрансаминаз (АлАт) и аспартатаминотрансаминаз (АсАт).

Основные результаты. РНК ВГС выявлена во всех образцах пациентов с ХГС, включенных в исследование.

Проведение количественного контроля с помощью ПЦР определило вирусную нагрузку в исследованных образцах. Низкая вирусная нагрузка вируса гепатита С определена у 16 пациентов (10^1 – 10^5 МЕ/мл), высокая – у 14 (10^6 – 10^7 МЕ/мл).

При проведении генотипирования вируса гепатита С выявлены: 1b генотип - у 13 человек (43,3%), 1b+1a генотипы - у 3 человек (10%), 3 генотип – у 8 человек (26,7%), 2 генотип – у 6 человек (20%).

Данные полученные при помощи анкетирования пациентов указывают на то, что у 14 пациентов от момента заражения прошло не более 6 месяцев (ОГС) и у 6 человек - несколько лет (ХГС).

Биохимический анализ крови определил повышение АлАт и АсАт у 15 пациентов в 10 и более раз, что указывает на острую фазу или обострение ХГС; у 15 больных выявилось незначительное увеличение указанных маркеров, что указывает на хронический процесс.

Заключение. В процессе проведения исследования были определены вирусная нагрузка и генотип ВГС. Была выявлена циркуляция 1a, 1b, 2 и 3 генотипов вируса, характерных для территории РФ. Данные анкетирования и результаты биохимического анализа позволили выявить пациентов с ОГС и обострением хронического процесса.

Использование современных специфических лабораторных технологий позволяет более достоверно и доказательно установить форму инфекционного процесса, в последующем выбрать схему лечения и проконтролировать ее эффективность, что позволяет спрогнозировать исход заболевания.

ОСОБЕННОСТИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ПОДГЕНОТИПОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА С В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Гасич Е.Л., Еремин В.Ф., Сосинович С.В.

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Беларусь

Введение. Определение генотипа/подгенотипа вируса гепатита С *(ВГС)* важно для решения задач эпидемиологии, назначения эффективной терапии, однако эти данные не являются доказательством общности источника инфицирования, путей распространения и направлений заноса вируса, т.к. не позволяют определить молекулярно-генетические взаимоотношения между его вариантами. Такие данные можно получить только на основании исследований, выполненных с помощью методов филогенетического анализа каждого его варианта. Основным преимуществом данного метода является возможность реконструкции всей цепочки передачи и распространения вируса, в отличие от единичных случаев заражения, анализ которых может быть выполнен при проведении эпидемиологического расследования, а также определения возможных направлений их заноса в страну.

Кроме того, учитывая, что для генотипов/подгенотипов *ВГС* характерно четкое географическое распределение, проведена оценка генетического разнообразия вирусов из нашей страны в географическом контексте с установлением возможных географических кластеров передачи *ВГС*. Исследования выполнены по core/E1 участку генома *ВГС*.

Цель исследования. Характеристика путей распространения, определение возможных направлений заноса подгенотипов *ВГС*, определение молекулярно-генетических взаимоотношения подгенотипов *ВГС* в разрезе групп риска и регионов страны.

Материал и методы. Исследовано 887 образцов сывороток/плазмы крови *ВГС*-инфицированных пациентов из Беларуси. Филогенетические деревья строились с применением алгоритма ML (maximum likelihood) в программе PHYML (Phylogenetic maximum likelihood), с моделью замены нуклеотидов GTR. Оптимизация топологии дерева - Best of NNIs and SPRs. Для расчёта статистической достоверности кластеров использовался тест SH-aLRT. Визуализация деревьев осуществлялась в программе FegTree v.1.4.2.

С целью установления особенностей филогенетической кластеризации фрагментов ДНК ВГС, полученных после секвенирования, с помощью программы Blast было отобрано по 100 максимально идентичных референс-последовательностей для каждого анализируемого образца. Кластеры, в которых присутствовало ≥80% «белорусских» последовательностей, были определены как кластеры «белорусской» передачи. Кластеры, со-

держащие 2 последовательности, были определены как пары, имеющие генетически близкородственные вирусы. Кластеры, включающие от 3-11 последовательностей, определены как средние. Кластеры, образованные 12 и более последовательностями – как крупные. Кластеры, в которых присутствовало ≤80% «белорусских» последовательностей, были определены как смешанные кластеры.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программы Statistica v.10.

Результаты исследований. Методом филогенетического анализа показано, что развитие эпидемического процесса *ВГС* в стране на протяжении 2005-2015 годов обусловлено циркуляцией «белорусских» вариантов вируса, о чем свидетельствует их достоверная филогенетическая кластеризация в отдельные филогенетические группы. В целом, к этим кластерам принадлежало 93,7% нуклеотидных послеовательностей 1a подгенотипа, 69,7% - 1b, 69,2% - 2a, 40,0% - 2k, 63,2% - 3a, 60,0% - 4d подгенотипов и 70,0% - сиквенсов RF1_2k/1b.

Крупные филогенетические кластеры, включающие более 12 «белорусских» сиквенсов, были характерны только для 1a (два кластера) и 1b (4 кластера) подгенотипов *ВГС*. В остальных случаях в этих группах присутствовало от двух до одиннадцати образцов, что свидетельствует о многочисленных заносах вирусов на территорию страны. Также отмечена тенденция формирования «локальных» вариантов вируса, характерных для определенных территорий страны (все подгенотипы) и/или групп риска (преимущественно 1a и 3a подгенотипы *ВГС*).

Среди крупных кластеров, включающих более 12 нуклеотидных последовательностей, образованных 1a и 1b вариантами *ВГС*, отмечены явления микроэволюции, т.е. появление групп вирусов, формирующих субкластеры в одном/разных регионах страны. Вероятно, данные варианты вирусов присутствуют на территории страны достаточно давно и благодаря высокой генетической изменчивости вируса, связанного как с ускользанием из-под действия иммунной системы хозяина, так и в результате появления мутаций в течении терапии, появились измененные варианты вирусов, получившие дальнейшее распространение.

Генетически нуклеотидные последовательности 1, 2, 3 и 4 генотипов ВГС из Беларуси были близки сиквенсам из стран Европы, Азии и США, о чем свидетельствует их достоверная принадлежность к одним филогенетическим веткам. Отсутствие генетического сходства с последовательностями вируса из стран бывшего СССР обусловлено, вероятно, их недостаточной представленностью в Международной базе данных GenBank.

Заключение. Применение молекулярно-генетических методов способствует пониманию эпидемиологической ситуации по *ВГС*-инфекции и изменению качественного уровня ее надзора, установлению новых кластеров «белорусской» передачи вируса и направлений заноса вирусов в страну.

HEPATITIS C VIRUS RESISTANCE TO ANTIVIRAL TREATMENT: DIAGNOSTICS AND CLINICAL VALUE

Francesca Ceccherini-Silberstein

Department of Experimental Medicine and Surgery, University of Rome Tor Vergata, Rome, Italy

With the stunning evolution of Hepatitis C virus (HCV) treatment, and with the introduction of new potent direct acting antiviral agents (DAAs), that specifically target NS3, NS5A and NS5B viral proteins, there is still a big debate on the clinical relevance of HCV resistance testing. The natural presence of resistance associated substitutions (RASs), as well as the ability to develop rapidly new RASs when DAAs fail to be fully suppressive, are the intrinsic characteristics of HCV that can affect treatment outcome and chances to cure HCV infection. To date, a high number of RASs in NS3, NS5A, and NS5B have been associated in vivo and/or in vitro with reduced susceptibility to DAAs, but no comprehensive list of all reported RASs is available.

In this presentation will be discussed the role of individual RASs to DAAs already approved for clinical use or still in phase 3 clinical trials. The prevalence and clinical relevance of individual and mutational patterns of RAS for different agents and different HCV-genotype will be discussed.

In accordance with current treatment guidelines, the information discussed could provide assistance for the management of patients with chronic HCV infection, allowing a fruitful use of HCV resistance testing in clinical practice before and (even more importantly) after treatment-failure.

PHENOTYPIC EVALUATION OF VIRAL INFECTIVITY AND ANTIVIRAL RESISTANCE PROFILES OF HEPATITIS B VIRUS *IN VITRO*

Glebe D.

Institute of Medical Virology, Justus-Liebig University Giessen, Germany
National Reference Centre for Hepatitis B and D Viruses

Hepatitis B virus (HBV) is a highly infectious bloodborne virus that has world-wide prevalence and is transmitted via blood, sexual contact and perinatally from HBV-infected mothers to their off-spring. Infections with HBV can cause acute and chronic infections of the liver. Although a protective vaccine is available, approximately 240 million people world-wide are chronic carriers of this virus. Especially after perinatally acquired infection, HBV can reach extremely high viral titers in the blood without significant liver damage during the so-called high-replicative, non-inflammatory

phase that can last for many years. However, progression of chronicity can also lead to chronic hepatitis B (CHB) associated with liver fibrosis, cirrhosis and eventually hepatocellular carcinoma (HCC).

Characterization of infectivity and viral fitness of HBV is indispensable to (i) access the rate of protection of current active and passive HBV vaccines against special viral strains, e.g. HBV genotype F, immune-escape variants; (ii) determine transmissibility of HBV mutants, e.g. antiviral resistance mutants; (iii) elucidate the pathogenic potential of special variants, e.g. after HBV reactivation; and (iv) estimate zoonotic potential of newly discovered animal hepadnaviruses. However, this approach is hampered by the fact that no robust and easy accessible *in vivo* infection model exists to date. In the past, primary hepatocyte cultures were the only available source for HBV-susceptible cell cultures *in vitro*, but they are limited in availability and HBV-susceptibility. The discovery of the liver-specific bile-acid transporter NTCP (sodium taurocholate co-transporting polypeptide) as a high affinity receptor for HBV in 2012 has opened the field for readily available HBV-susceptible cell culture systems. Using our newly established *in vitro* cell-culture system with inducible NTCP-expression, in combination with a special HBV-expression system, we managed to achieve up to 100% susceptibility of these cultures for HBV, thus allowing reliable quantitative infectivity and fitness tests *in vitro*. With the help of this system, we recently demonstrated the zoonotic potential of newly characterized HBV from bats that could not be neutralized by antisera from successfully vaccinated persons.

Antiviral treatment of CHB patients is currently limited to Interferon alpha (IFN) and five nucleos(t)ide analogs (NUCs), but no cure for CHB exists. While IFN has modest antiviral effects in many CHB patients, orally applicable NUCs specifically inhibit the reverse transcriptase (RT) activity of the HBV polymerase during HBV replication, but have to be taken life-long in the majority of cases. The long-term treatment of chronic hepatitis B patients with NUCs can lead to the selection of viral resistant mutants. To assess the influence of the different mutations within the polymerase frame and to get an overall picture of resistance development in treated patients, we isolated and sequenced different viral clones derived from chronic carriers under NUC therapy that showed viral breakthrough. After genotypic evaluation of known antiviral resistance mutations within the HBV RT-region, the clones were characterized phenotypically by the use of an optimized phenotypic *in vitro* resistance assay. This system allows rapid and sensitive quantification of inhibitory concentrations IC_{50} and IC_{90} of the four clinically most important NUCs lamivudine (LMV), entecavir (ETV), adefovir (ADV) and tenofovir (TDF). Analysis of the phenotypic resistance factors based on the IC_{50} showed high similarities to published data in most of the cases. However, a group of viral clones with known RT resistance-mutations against LMV, showed very high resistance factors (RF) against ETV based on the IC_{90}, whereas IC_{50} values showed only a moderate increase relative to the wildtype. Although no classical pattern of resistance mutations against ETV was present, using ETV concentrations 1000 times higher than the wildtype IC_{50}, the viral replication did not decrease below 10% with most tested viral clones. These findings demonstrate that the classical lamivudine resistance mutations (L180M, M204V) already harbor partial resistance against ETV and may explain the rapid full ETV resistance development in patients with LMV resistance. Furthermore, calculations of resistance factors based on IC_{90} are superior to IC_{50} for predicting resistance profiles against ETV.

References:

1. König et al. Kinetics of the bile acid transporter and hepatitis B virus receptor Na+/taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) in hepatocytes. J. Hepatol. 2014 October 61,(4) 867-875.

2. Drexler et al. Bats carry pathogenic hepadnaviruses antigenically related to hepatitis B virus and capable of infecting human hepatocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Oct 1;110(40):16151-16156

3. Geipel et al. Entecavir allows an unexpectedly high residual replication of HBV mutants resistant to lamivudine. Antivir Ther. 2015; 20(8): 779-87.

HEPATITIS B VACCINES: HISTORY, ACHIEVEMENTS, PROBLEMS, AND PERSPECTIVES

Gerlich W.H.

Institute for Medical Virology, Justus Liebig University Giessen, Germany

History. The concept of today's hepatitis B vaccine dates back to 1968 when Nobel Prize winner B. S. Blumberg submitted a patent application that the Australia antigen discovered by him may be used as vaccine against hepatitis B. He had observed that patients with hepatitis had often this antigen while persons with the corresponding antibody remained healthy. At that time the nature of this antigen was completely unclear. However, D.S. Dane discovered in 1970 by electron microscopy 42 nm particles which looked like small enveloped viruses and had Australia antigen on their surface. Australia antigen was then renamed hepatitis B surface antigen (HBsAg) and a rational basis for its use as vaccine was found. Initially, the HBsAg for the vaccine was purified from the plasma of chronic hepatitis B virus (HBV) carriers (1st generation), but when the HBV DNA had been cloned and the gene encoding the small HBsAg protein (SHBs) identified in 1979, it could be produced in large scale in genetically re-programmed host cells, for economic reasons preferably in yeast cells (2nd generation).

Achievements. This type of vaccine is used since 1984 with great success and without serious side effects. It is worldwide included in childhood vaccination and can – when given at birth - prevent >90 % of the mother to child transmissions of HBV which lead without intervention virtually always to chronic hepatitis B with all serious outcomes like liver cirrhosis and hepatocellular. High prevalence countries like Taiwan or Thailand which perform vaccination since

the 1980ies have reduced the HBV carrier rate in the vaccinated population from ca. 10 % to <1 %. Incidence of acute hepatitis B in the vaccinated age groups has also drastically decreased. With this very high protection rate it appears possible to eradicate HBV within the next decades if worldwide close to complete vaccine coverage can be achieved.

Problems. After early childhood vaccination, anti-HBs titers often decrease to non-protective levels during adolescence. It is debated whether booster injections are necessary. A well-known but unsolved problem is the limited efficacy in adult persons being vaccinated because of an increased risk of HBV infection. Even factors like male gender, advanced age >40 years, obesity or smoking reduce the protection rate significantly, not to speak of diseases like diabetes, liver or kidney disease or HIV infection. Problems largely neglected by the decision-makers are the occurrence of clinically inapparent breakthroughs with transient viremia and the less efficient protection against HBV strains with another genotype than the vaccine. The efficacy of the yeast-derived vaccines is further diminished by the fact that the SHBs is partly misfolded and does not form neutralizing epitopes.

Perspectives. Due to their design in 1980, the 2nd generation vaccines do not take advantage from important later findings. The main protective factor of the vaccine is neutralizing antibodies against the HBV attachment proteins. The SHBs (present in these vaccines) attaches to the receptor heparan sulfate proteoglycan but the high-affinity attachment occurs via the large HBsAg protein LHBs with its preS1 domain to the bile acid transporter NTCP. Anti-preS1 antibodies are strongly neutralizing HBV infectivity. A vaccine produced in mammalian cells with SHBs in the correct conformation and a proportion of LHBs (3rd gen.) was shown to be more immunogenic but is (not yet?) widely used. Further improvements could be the inclusion of more HBV genotypes, the use of highly immunogenic HBV core particles as epitope carrier for neutralizing preS1 epitopes and many other approaches.

Literature: Gerlich W. H. Med Microbiol Immunol 2015; 204:39-56

Раздел 2. ВПЧ-ТЕСТИРОВАНИЕ И ПРОФИЛАКТИКА РАКА ШЕЙКИ МАТКИ

АНАЛИЗ ВЫЯВЛЯЕМОСТИ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА ВЫСОКОГО КАНЦЕРОГЕННОГО РИСКА И РАСПРОСТРАНЁННОСТИ ГЕНОТИПОВ ВИРУСА У ПАЦИЕНТОВ ЗАО «МЕДИЦИНСКАЯ КОМПАНИЯ ИДК», САМАРА

Никонорова И.В., Воронова Е.А., Кирилина Е.С.

ЗАО «Медицинская компания ИДК», группа компаний «Мать и Дитя», Самара, РФ

Введение. Актуальность изучения папилломавирусной инфекции (ПВИ) определяется чрезвычайно высоким канцерогенным потенциалом ряда генотипов вирусом папилломы человека (ВПЧ) и является не только медицинской, но и социальной демографической проблемой. ВПЧ является важным и широко распространенным инфекционным агентом. Эпидемиологические и вирусологические исследования подтверждают, по крайней мере, 95% содержание ДНК ВПЧ 16 типа при плоскоклеточном раке и ДНК ВПЧ 18 типа при аденокарциномах и низкодифференцированных опухолях шейки.

По литературным данным инфицированность населения России ВПЧ имеет региональные различия и варьируется от 40 до 80%. Однако инфицированность аногенитальными типами ВПЧ составляет от 10 до 40%.

ВПЧ-тестирование с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволяет быстро с высокой чувствительностью и специфичностью выявлять этиологический фактор возможной патологии, определять группы риска по онкозаболеваниям урогенитального тракта и вовремя предотвратить рост инфекций в популяции.

Целью нашей работы являлась оценка распространенности генитальной ПВИ среди пациентов ЗАО «Медицинская компания ИДК» (МК ИДК), а также анализ частоты встречаемости различных генотипов ВПЧ и микстинфицирования разными генотипами вируса.

В задачи исследования входило выявление закономерностей встречаемости ПВИ в зависимости от возраста пациенток; анализ корреляции выявления ДНК ВПЧ с результатами цитологического исследования; анализ частоты встречаемости различных генотипов ВПЧ при воспалительных и онкогинекологических заболеваниях.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили образцы ДНК, полученные из соскобов эпителия цервикса и с влагалищной части шейки матки женщин. Всего было исследовано 8 768 образцов ДНК с ноября 2012 по январь 2016.

Для исследования использовался набор реагентов для дифференциального выявления и количественного определения ДНК вирусов папилломы человека 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59 типов высокого канцерогенного риска методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «РеалБест ДНК ВПЧ ВКР генотип количественный» (производитель ЗАО Вектор-Бест, Россия).

Основные результаты. Результаты показали, что ДНК ВПЧ присутствовала в 2949 (34%) из 8768 проанализированных образцов. Анализ этих результатов в зависимости от возраста позволил выявить два пика выявляемости, соответствующие женщинам в возрасте до 25 лет и 50-55 лет. У молодых женщин высокий уровень инфицированности, возможно, связан с высокой сексуальной активностью и частой сменой половых партнеров, в то время как у женщин старшего возраста более высок риск длительной персистенции инфекции, возможно, в связи с возрастной инволюцией иммунной системы.

По результатам проведенного генотипирования ВПЧ-положительных образцов установлено, что чаще всего у пациенток МК ИДК встречаются 16 генотип (20,8%), 31 генотип (12%), 51 и 52 генотипы (9,3 и 8,7% соответственно). Частота выявления ВПЧ других генотипов была ниже, причем 18 генотип оказался всего лишь на 8 месте по встречаемости (6,6%). Следует отметить, что 16, 31 и 52 генотипы относятся к филогенетической группе А9, которая обладает наиболее высоким онкогенным потенциалом и способностью к персистенции.

У большинства инфицированных женщин (67%) был обнаружен ВПЧ одного генотипа, в то время как одновременное присутствие вирусов двух генотипов встречается в 22%, трех генотипов – в 7% случаев, а четырёх и более генотипов – в 4% случаев. Микстинфицирование несколькими генотипами ВПЧ способствует персистирующему течению ПВИ и менее благоприятному прогнозу терапии.

Папилломавирусная инфекция обладает дозозависимым эффектом – при высокой концентрации ДНК ВПЧ повышается риск развития неоплазии и опухоли. Пороговый уровень клинически значимого количества вируса составляет 1000 геномных эквивалентов ВПЧ (3 Lg) на 10^5 клеток человека. Проведенное исследование показало, что среди пациенток, проходивших ВПЧ-тестирование, только 24% ВПЧ-позитивных имели незначительную вирусную нагрузку (<3Lg), при которой высока вероятность спонтанной элиминации вируса. 41% ВПЧ-позитивных обследованных лиц имели ВПЧ в клинически значимой концентрации (от 3 до 5 Lg), а у 35% наблюдалась повышенная концентрация вируса (более 5 Lg). Таким образом, 76% ВПЧ-позитвных пациенток имели клинически значимую и повышенную концентрацию вируса.

Было выполнено сравнение результатов пациенток, проходивших ВПЧ-тестирование (n=1546), с результатами их цитологического исследования. В частности, было проанализировано, какие генотипы ВПЧ встречаются чаще всего при воспалительных и онкогинекологических заболеваниях. Результаты позволили установить, что лишь в 30% случаев ВПЧ-инфекция не была связана с онкоцитологическими изменениями; у остальных ВПЧ-положительных лиц наблюдалась та или иная степень атипии эпителия, причем при раке и тяжелой дисплазии выявление ВПЧ происходило в 100% случаев. При этом 16 генотип встречался наиболее часто при любом характере поражений (пролиферации (гиперплазии) железистого

эпителия, воспалительном процессе слизистой оболочки, при наличии атипичных клеток эпителия неопределенного значения (ASCUS), лёгкой, умеренной и тяжёлой дисплазии). Обращает на себя внимание тот факт, что с большой частотой при различных патологиях встречаются 31, 52, 58 генотипы вируса – все они относятся к филогенетической группе А9. По литературным данным, около 70% случаев рака шейки матки (РШМ) тесно ассоциированы с 16 и 18 типами ВПЧ, еще 20% - с 31, 33, 35, 45, 52 и 58 типами. Однако ранговое и долевое распределение типов ВПЧ в этиологической структуре РШМ имеет региональные различия. Например, в Европейском регионе первые пять ранговых мест занимают 16, 18, 45, 31 и 33 типы, в то время как в азиатских странах на первые ранговые места после 16 и 18 выходят 52 и 58 типы.

Выводы. Выявляемость ВПЧ ВКР у пациентов МК ИДК (Самара) сопоставима с общепопуляционными данными, согласно литературным источникам, и составляет 34%.

Наиболее распространёнными генотипами ВПЧ явились 16, 31, 51, 52.

Выявленная высокая частота микстинфицирования несколькими генотипами ВПЧ (33%) и высокая вирусная нагрузка способствует персистирующему течению ПВИ и менее благоприятному прогнозу.

Клинически значимый и повышенный уровень вирусной нагрузки был выявлен у 76% ВПЧ-положительных проб.

Продемонстрирована достаточно высокая корреляция (70%) между выявлением ВПЧ методом ПЦР и наличием отклонений в результатах цитологических исследований.

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ПЕРСИСТЕНЦИЕЙ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА

Морозова О.А., Миктадова А.В., Сараев К.Н., Коваленко К.А., Машкина Е.В.

Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия
Клинико-диагностическая лаборатория «Наука», Ростов-на-Дону, Россия

Вирус папилломы человека (ВПЧ) выступает основным этиологическим фактором развития рака шейки матки. Особенности функционирования иммунной системы человека способны привести либо к элиминации вируса, либо к его длительной персистенции в эпителиальных клетках, чему способствует нарушение местного иммунитета у организма-хозяина. Поскольку вирус передается половым путем, основной пик инфицирования приходится на женщин молодого, сексуально активного возраста. Следует отметить, что среди женщин старше 30 лет уменьшается частота выявления ВПЧ, но в то же время в некоторых случаях наблюдается высокая концентрация вируса. Это свидетельствует о длительной персистенции папилломавирусной инфекции в организме. Возможно, это связано с особенностями генотипа женщины, который благоприятствует размножению ВПЧ. Полиморфизмы в генах контроля клеточного цикла и системах апоптоза и репарации, изменяя ферментативную активность кодируемых белков, могут быть ассоциированы с характером течения папилломавирусной инфекции. Однако, генетическая предрасположенность организма человека к персистенции вируса папилломы человека практически не исследована.

Целью работы было изучить ассоциацию полиморфных вариантов *Pro72Arg* гена *TP53, 4153 delA* гена *BRCA1 и G-308-A* гена *TNF* к длительной персистенции ВПЧ.

Материалом для исследования послужили образцы ДНК, полученные из эпителиальных клеток, забранных с использованием одноразовых зондов в транспортную среду «АмплиСенс» для забора материала из урогенитального тракта 159 женщин в возрасте от 30 лет и старше, проходивших обследование в клинико-диагностической лаборатории «Наука». Среди них – 54 женщины, инфицированные ВПЧ (с вирусной нагрузкой более 4 lg (ВПЧ на 100 тысяч клеток)) и 105 женщин - с отсутствием вируса.

ДНК из эпителиальных клеток выделяли сорбентным методом с использованием набора реагентов «ДНК-сорб-АМ) (ООО «НекстБио», Россия). Количественный анализ онкогенно опасных типов ВПЧ (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 типы) проводили с помощью тест-системы «АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL». Выявление аллельных вариантов генов *TP53, BRCA1 и TNF* проводили методом аллель-специфичной амплификации с использованием реагентов SNP-экспресс (Литех, Россия).

Распределение частот генотипов и аллелей по всем исследуемым полиморфизмам соответствует равновесию Харди-Вайнберга в обеих группах женщин. В исследуемых группах по полиморфизму *Pro72Arg* гена *TP53* преобладают гомозиготы по аллели *72Arg*. Среди инфицированных ВПЧ женщин частота генотипа *Arg/Arg* составляет 65 %, а среди неинфицированных женщин – 48 %. Частота гетерозигот в группе инфицированных женщин составляет 35 %, а в группе женщин без вируса – 44 %. Частота встречаемости генотипа *Pro/Pro* во второй группе составила 9 %. Среди женщин с высокой нагрузкой ВПЧ данный генотип не выявлен. Распределение частот генотипов и аллелей по данному полиморфизму статистически значимо отличается в двух группах женщин. Генотип *Arg/Arg* гена *TP53* ассоциирован *с* повышенным относительным риском длительной персистенции вируса папилломы человека *(*OR 2.03 (95% CI 1.03-3.99), так же как и аллель *72Arg* (OR 2.05 (95% CI 1.15-3.65)). В то же время для аллели *72Pro* выявлен пониженный риск длительной персистенции ВПЧ в эпителиальных клетках женщин (OR 0.49 (95% CI 0.27-0.87)).

В исследуемых группах по полиморфизму *4153 delA* гена *BRCA1* выявлены только гомозиготы по нормальной аллели. Следовательно, ассоциации полиморфизма *4153 delA* гена *BRCA1* с персистенцией ВПЧ не выявлено. В ходе исследования мы не обнаружили статистически значимых различий и в частотах генотипов и аллелей по полимор-

физму *G-308A* гена *TNF-a* между двумя группами женщин.

Таким образом, в ходе исследования мы определили наличие ассоциации с длительной персистенцией ВПЧ только для полиморфизма *Pro72Arg* гена *TP53*.

Транскрипционный фактор p53 является основным онкосупрессором, который регулирует клеточный цикл и запускает механизмы апоптоза. При наличии полиморфных вариантов гена *TP53* возможно изменение функциональной активности белка. Известно, что онкобелки Е6 и Е7 ВПЧ ингибируют действие опухолевых супрессоров, в том числе и p53. A. Storey с коллегами (1998) обнаружили, что вариант белка p53, кодируемый аллелью *72Arg,* разрушается белком Е6 ВПЧ 18 со значительно большей скоростью, чем вариант белковой молекулы аллели 72*Pro*. Это позволяет предположить, что аллельное состояние гена TP53 может способствовать возникновению рака шейки матки, ассоциированного с папилломавирусной инфекцией.

ХАРАКТЕР ЛОКАЛЬНЫХ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ШЕЙКИ МАТКИ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Андосова Л.Д., Конторщикова К.Н., Шахова К.А.

ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная медицинская академия», Нижний Новгород, Россия

В результате проведенных многочисленных эпидемиологических и клинико-лабораторных исследований было установлено, что важнейшим фактором канцерогенеза шейки матки является инфицирование женщин вирусом папилломы человека высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР). Вирус способен существовать как в свободной эписомальной, так и в интегрированной форме. Ключевым событием в злокачественной трансформации эпителиальных клеток считается интеграция вирусной ДНК в ДНК клетки «хозяина», формирование интегративной (Е7+) стадии папилломавирусной инфекции (ПВИ). Несмотря на то, что явление интеграции вирусной ДНК активно изучается, имеющиеся данные не позволяют однозначно оценить его клиническое значение. Считая вирус папилломы человека главным фактором риска предрака и рака шейки матки, нельзя не учитывать другие возможные влияния. Развитие заболеваний на фоне вирусной инфекции во многом определяется состоянием иммунной реактивности организма, в первую очередь, локальной защиты репродуктивного тракта женщины. Целью настоящего исследования является выявление иммунологических особенностей продуктивной и интегративной стадий папилломавирусной инфекции при заболеваниях шейки матки. Материалы и методы. Для реализации поставленной цели изучали иммунологические показатели цервикальной слизи у 280 женщин (средний возраст 32±2,56 года), у которых предварительно методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) выявили ВПЧ ВКР. Пациентки были разделены на группы по экспрессии протеина Е7 (продуктивная и интегративная формы ПВИ): 1 группа: 20 практически здоровых женщин, с отрицательным результатом ВПЧ-теста; 2 группа: латентная форма ПВИ, белок Е7 отрицательный результат «ВПЧ+ Е7-» (n=40); 3 группа: латентная форма ПВИ, белок Е7 положительный результат «ВПЧ+ Е7+» (n=40); 4 группа: низкая степень плоскоклеточного интраэпителиального поражения (LSIL), белок Е7 отрицательный результат «LSIL Е7-» (n=40); 5 группа: низкая степень плоскоклеточного интраэпителиального поражения (LSIL), белок Е7 положительный результат «LSIL Е7+» (n=40); 6 группа: высокая степень плоскоклеточного интраэпителиального поражения (HSIL), белок Е7 отрицательный результат «HSIL Е7-» (n=20); 7 группа: высокая степень плоскоклеточного интраэпителиального поражения (HSIL), белок Е7 положительный результат «HSIL Е7+» (n=40); 8 группа: рак шейки матки (РШМ) «РШМ Е7+» (n=40). Объектом изучения являлись соскобы эпителиальных клеток из влагалища, цервикального канала. Материал исследовали с использованием анализатора «iQ5» Cycler («Bio-RAD», США) комплекта тест-систем ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора. ВПЧ-скрининг осуществлялся с применением набора реагентов для выявления ДНК ВПЧ ВКР 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 53, 56, 58, 59, 60, 70 типов «Ампли Сенс ВПЧ ВКР скрин-EPh». Определение онкобелка Е7 ВПЧ 16 и 18 типов проводилось с применением набора реагентов для выявления – «Е7-ВПЧ-16/18-Диагност» производства ОАО «Биомед» им. И.И. Мечникова, Россия. Для анализа локальных иммунологических нарушений у женщин исследовалась цервикальная слизь с изучением экспрессии цитокинов: ИФН-α, ИФН-γ, ИЛ-10, ТФР-β. Количественное определение ИЛ-10 проводилось иммуноферментным методом с использованием реактивов ЗАО «Вектор-Бест» (Россия); трансформирующего фактора роста бета (ТФР-β) – тест-системой компании «DRG ELISA-TGFβ1» (Германия); интерферонов наборами «Bender Med Systems» (США). Полученные результаты были обработаны общепринятыми методами вариационной статистики с использованием пакета статистических программ Statistica for Windows 6.0. Основные результаты. При сравнении групп с латентной формой ПВИ между собой по экспрессии интерферонов отмечается незначительное повышение ИФН-α в 3 группе «ВПЧ+ Е7+» (p_{3-2} = 0,014). При сравнении группы «LSIL Е7-» с группой «ВПЧ+ Е7-» различия не выявлены, с группой «ВПЧ+ Е7+» отмечается снижение концентрации ИФН-α (p_{4-3} = 0,004). В группе женщин «LSIL Е7+» наблюдается повышение концентрации интерферонов по сравнению с группой контроля (ИФН-α p_{5-1} = 0,000019, ИФН-γ p_{5-1} = 0,00019) и снижение значений во всех группах сравнения. В категории «HSIL Е7-» значения отличаются от группы контроля в сторону повышения (ИФН-α p_{6-1} = 0,00996, ИФН-γ p_{6-1} = 0,0360). При анализе категорий «HSIL Е7-», «HSIL Е7+» и РШМ обнаружено статистически значимое снижение интерферонов по сравнению с группами латентная форма ПВИ и LSIL. Экспрессия интерферонов в группах «HSIL Е7+» и РШМ не отличается от значений в группе контроля и не изменена при сравнении групп между собой (p_{7-1}, p_{8-1}, p_{8-7} > 0,05). При исследовании характера локальных иммунологических нарушений, обуслов-

ленных продуктивной или интегративной стадиями ПВИ, установлено, что в группах женщин «LSIL E7+» и «LSIL E7-» существуют статистически значимые различия по концентрации ИФН-α (p_{5-4} = 0,000010) и ИФН-γ (p_{5-4} = 0,00202) с уменьшением значений в группе «LSIL E7+». Супрессирующий цитокин ИЛ 10 обнаружил следующую тенденцию: в группах с латентной формой ПВИ «ВПЧ+ E7-», «ВПЧ+ E7+», легких дисплазий «LSIL E7-» отличия не выявлены; в группе «LSIL E7+» наблюдаются достоверные отличия с группой контроля (p=0,000020) и группами сравнения в сторону повышения, та же тенденция имеет быть в группе тяжелых дисплазий «HSIL E7-», «HSIL E7+» и РШМ. На стадии плоскоклеточных интраэпителиальных поражений низкой степени «LSIL E7+» (5 группа) содержание ИЛ-10 оказалось почти в 3 раза выше, чем в группе плоскоклеточных интраэпителиальных поражений низкой степени «LSIL E7-» (p_{5-4} = 0,000026). На стадии «HSIL E7-» (6 группа) имеет место повышение значений ИЛ-10 по сравнению с группами – контрольной (p_{6-1} = 0,0029), «ВПЧ+ E7-» (p_{6-2} = 0,0155), «ВПЧ+ E7+» (p_{6-3} = 0,0128), «LSIL E7-» (p_{6-4} = 0,0328); с группой «LSIL E7+» – понижение концентраций (p_{6-5} = 0,031). Не выявлены различия по содержанию ТФР-β в категориях «ВПЧ+ E7-», «ВПЧ+ E7+», «LSIL E7-», «LSIL E7+». Повышение концентраций ТФР-β отмечено в группе «HSIL E7-» по сравнению с группой контроля (p_{6-1} = 0,0056) и в группах сравнения (p < 0,05); повышение со статистически значимыми различиями также отмечено в группах «HSIL E7+», РШМ и группах сравнения (p < 0,05). Обращает на себя внимание отсутствие статистически значимой разницы в группах «HSIL E7+» и РШМ ни по одному из анализируемых иммунологических показателей (p_{8-7} > 0,05). Концентрация ТФР-β в группе пациенток с HSIL в 7 раз выше, чем при LSIL (p = 0,000012). Полученные результаты свидетельствуют об особенностях цитокинового профиля у женщин с ВПЧ-ассоциированными заболеваниями шейки матки в зависимости от стадии папилломавирусной инфекции. Отмечены повышение значений интерферонов альфа и гамма на репродуктивной стадии папилломавирусной инфекции «E7-» и снижение значений на стадии интегративной формы инфекции «E7+». На конечных этапах опухолевой прогрессии – «HSIL E7+» и рак шейки матки «E7+» имеет место повышение цитокинов ИЛ 10, TGFβ1, что сопровождается формированием локальной иммуносупрессивной среды. Из этого можно заключить, что характер локальных иммунологических нарушений имеет особенности, обусловленные продуктивной и интегративной стадиями ВПЧ-инфекции. Цитоморфологическая форма цервикальной патологии не отражает патогенетические аспекты формирования иммунитета при ПВИ.

ОЦЕНКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВПЧ В МОЧЕ ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО СКРИНИНГА

Шарипова И.П., Мустафаев Х.М., Латыпов Р.Р.

Научно-исследовательский институт вирусологии МЗ РУз, Ташкент, Узбекистан

Вирус папилломы человека (ВПЧ) одна из наиболее распространённых инфекций, передающихся половым путем. Инфекция ВПЧ определенных генотипов ассоциирована с развитием рака шейки матки (Шмидт 2007). Необходимо отметить недостаточность системы обнаружения предраковых и раковых изменений у женщин младше 35 лет и отмечается тенденция к снижению охвата профилактическим обследованием в данной возрастной группе. Так, в странах Европы, где проводятся профилактические осмотры на постоянной основе, охват осмотрами снизился на 80%. В какой-то степени это может быть объяснено инвазивностью теста, а также затратами на проведение теста и необходимостью наличия специально подготовленного персонала (Waller et al., 2009).

В 2012 году учеными Сасловым и др. в качестве нового метода вторичной профилактики РШМ было предложено проведение скрининга на наличие ВПЧ в цервикальном канале, эффективность которого впоследствии была подтверждена в нескольких исследованиях. Однако, определение ВПЧ в материале из цервикального канала обладает теми же негативными сторонами что и рутинные методы цитологии, что ограничивает использование его в скрининговых программах. Этот метод также инвазивен, требует специальных затрат и подготовленного персонала. Обнаружение ВПЧ в моче более доступный метод и может использоваться для поствакцинального скрининга, особенно в тех случаях, когда вагинальное обследование недоступно. В литературе совсем недавно стали появляться сообщения об использовании метода обнаружения ВПЧ в моче, в качестве альтернативы цервикальному материалу (Pathak et al., 2014). Необходимо отметить, что результаты исследований показывают довольно различные уровни чувствительности и специфичности, в среднем эти показатели составляли 80% (95%ДИ 71-88%) и 98% (95%ДИ 89-100%) соответственно. Однако, эти данные были получены для стран Европы и Америки, тест-системы, использованные в данных исследованиях, недоступны для рутинной диагностики в нашем регионе.

Целью данного исследования явилось проведение сравнительных испытаний коммерчески доступных тест-систем для проведения обнаружения ВПЧ методом ПЦР для использования в скрининговых целях в условиях Узбекистана.

Материалы и методы. Было проведено параллельное тестирование образцов клинического материала, полученного из цервикального канала и образцов мочи 166 женщин в рамках оппортунистического скрининга на ВПЧ в НИИ вирусологии МЗ РУз за период с 2015 по 2016 г. Исследование проводили с использованием Набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК вирусов папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска (ВКР) 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 типов в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-титр-FL» производства ООО «Интерлабсервис», Россия. Исследо-

вание проводилось по трем филогенетическим группам: A7 – типы 18, 39, 45, 59; A9 – 16, 31, 33, 35, 52, 58; A5/A6 – 51, 56. Сравнение проводили методами непараметрической статистики с использованием теста Mc Nemar.

Результаты. В результате обследования клинического материала (мазок из цервикального канала) 166 женщин у 24 (14,5%) было обнаружено наличие генетического материала ВПЧ с высоким онкогенным риском. Обнаружено, что у 17 из 24 инфицированных отмечался тип A9 (70.8%), далее следовал тип A7 у 9 из 24 (37,5%). В меньшей степени отмечался тип A5A6, у 4 случаев (16%). В 6 случаях отмечалось сочетание двух типов: A7 и A9 в 3 (12,5%), A9 и A5/A6 в 2 (8,3%) и A7 и A5/A6 в 1 (4,1%) случае. В двух третях всех случаев (16 из 24) отмечалась повышенная концентрация вируса в крови, в 7 случаях отмечалась клинически значимая концентрация и в 1 случае отмечалась клинически не значимая концентрация.

При тестировании образцов мочи тех же женщин в 23 случаях (13,8%) был получен положительный результат. Достоверность различий между методами составила p=0,31. При этом чувствительность метода определения ВПЧ в моче по сравнению с классическим образцом составила 95,8%, а специфичность 100%. Один образец, не определённый в моче, относился к филогенетической группе A9 и при тестировании мазка показывал клинически не значимую концентрацию.

Заключение. Результаты, полученные нами, указывают на то, что по показателям чувствительности и специфичности метод определения ВПЧ в моче сопоставим с результатами тестирования мазка из цервикального канала, а неинвазивность и простота получения клинических образцов характеризует данный метод наиболее предпочтительным для проведения эпидемиологических скрининговых исследований. Однако необходимо отметить, что выводы сделаны на основании результатов тестирования только 24 положительных образцов, что не даёт полной уверенности в экстраполяции результатов на всю популяцию и требует дополнительных исследований.

ВИРУСНАЯ НАГРУЗКА КАК ФАКТОР, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЙ ВЕРОЯТНОСТЬ ОБНАРУЖЕНИЯ КОЙЛОЦИТАРНОЙ АТИПИИ В ТРАДИЦИОННОЙ И ЖИДКОСТНОЙ ЦИТОЛОГИИ У ЖЕНЩИН, ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИРУСОМ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА 16 ТИПА

Ворошилина Е.С., Владимирова Н.Б., Игнатова К.Ю., Куклин Е.С., Плотко Е.Э.

Медицинский центр «Гармония», Екатеринбург, Россия
ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Екатеринбург, Россия

Главная задача цитологического скрининга – своевременно выявить рак шейки матки и предраковые состояния, а именно плоскоклеточное интраэпителиальное поражение (SIL). Ведущей причиной развития данной патологии является вирус папилломы человека (ВПЧ), онкогенный потенциал которого различается в зависимости от типа вируса. Наряду с традиционной цитологией (ТЦ) широкое распространение получила жидкостная цитология по технологии BD SurePath, признанная наиболее чувствительным и специфичным вариантом цитологической диагностики [1]. Ключевым цитологическим признаком, указывающим на вероятное наличие ВПЧ в клетках, является обнаружение койлоцитов. Выявление койлоцитарной атипии в соответствии с классификацией Bethesda является основанием для постановки заключения «Low grade squamous intraepitelial lesion (LSIL)», расцениваемым как предраковое состояние. Однако прямыми методами выявления ВПЧ являются молекулярно-генетические методы, среди которых ПЦР является самым доступным в России. Зарегистрированные тест-системы позволяют выявлять до 21 типа вируса и определять их количества. Вероятность выявления койлоцитарной атипии при цитологическом исследовании у пациенток с установленной ВПЧ-инфекцией требует оценки для обоснования протоколов обследования и лечения женщин с данной патологией.

Цель. Определить частоту выявления койлоцитарной атипии при использовании традиционной и жидкостной цитологии (выполненной по технологии BD SurePath) у женщин, инфицированных ВПЧ 16 типа, в зависимости от уровня вирусной нагрузки.

Материалы и методы. В исследование были включены 324 женщины, у которых был выявлен ВПЧ 16 типа методом ПЦР с детекцией результатов в реальном времени (ПЦР-РВ), в том числе у 261 пациентки ВПЧ присутствовал в количестве более 10^3 ГЭ/10^5 клеток, у 153 более 10^5 ГЭ/10^5 клеток. 187 женщин были обследованы методом традиционной цитологии (ТЦ) с окраской по Романовскому-Гимза, 137 – методом жидкостной цитологии с окраской по Папаниколау по технологии BDSurePath (ЖЦ). Типирование ВПЧ и определение вирусной нагрузки проводили методом ПЦР-РВ с использованием тест-системы HPV Квант 21 (НПФ ДНК-Технология, Москва) согласно инструкции производителя.

Результаты исследования. Было показано, что вероятность выявления койлоцитарной атипии при цитологическом исследовании у пациенток с ВПЧ 16 типа зависит от уровня вирусной нагрузки. При использовании ТЦ частота обнаружения койлоцитарной атипии повышается с 36,5% до 51,9% по мере увеличения вирусной нагрузки от клинически мало значимой (менее 10^3 ГЭ/10^5 клеток) до превышающей порог прогрессии (более 10^5 ГЭ/10^5 клеток). Аналогичная зависимость наблюдалась и при использовании ЖЦ.

Отмечена достоверно более высокая частота выявления койлоцитарной атипии при использовании ЖЦ по сравнению с ТЦ для женщин с клинически значимой вирусной нагрузкой (более 10^3 ГЭ/10^5 клеток). Частота выявления LSIL методом ЖЦ у пациенток с вирусной нагрузкой более 10^5 ГЭ/10^5 клеток составила 80,3%.

Заключение. Полученные результаты демонстрируют более высокую чувствительность жидкостной ци-

Таблица 1. Частота выявления койлоцитарной атипии (КА) при использовании ТЦ и ЖЦ у пациенток с ВПЧ 16 типа в зависимости от вирусной нагрузки (ГЭ/10^5 клеток)

	Вирусная нагрузка а < 10^3		Вирусная нагрузка а > 10^3<10^5		Вирусная нагрузка а > 10^5	
	N в группе	Частота КА	N в группе	Частота КА	N в группе	Частота КА
Традиционная цитология	39	36,50%	71	47,30%	77	51,90%
Жидкостная цитология по технологии BDSurePath	24	37,80%	37	77,90%*	76	80,30%*

*- p<0,01

тологии по технологии BD SurePath выявления койлоцитарной атипии у пациенток, инфицированных ВПЧ 16 типа. Установлена прямая зависимость эффективности цитологического исследования от вирусной нагрузки. Вероятность обнаружить цитологические признаки ВПЧ 16 типа наиболее высока у пациенток с вирусной нагрузкой более 10^5 ГЭ/10^5 клеток при использовании жидкостной цитологии по технологии BD SurePath. Отсутствие цитологических признаков ВПЧ-инфекции было установлено только у 19,7% женщин в данной группе. Учитывая данные о высоком онкогенном потенциале ВПЧ 16 типа, пациентки с высоким уровнем вирусной нагрузки должны находиться на диспансерном учете.

Список литературы:

1. Kirsten Rozemeijer et al. Comparing SurePath, ThinPrep, and conventional cytology as primary test method: SurePath is associated with increased CIN II+ detection rates/ Cancer Causes Control. 2016; 27: 15–25.

АЛГОРИТМ ДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ ШЕЙКИ МАТКИ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ПАПИЛЛОМАВИРУСАМИ

Дианова Т.В.[1], Свердлова Е.С.[2], Комарова Ю.В.[1]

[1] ОГАУЗ «Ангарский перинатальный центр»

[2] Клиника доктора Шерман, Иркутск, Россия

По данным ВОЗ, ежегодно в мире регистрируется около 600000 случаев рака шейки матки и, несмотря на проводимые лечебные мероприятия, смертность составляет 45-50%. С появлением полимеразной цепной реакции (ПЦР) и новых цитологических исследований (жидкостная цитология) в арсенале диагностических методов выявление вируса в урогенитальных пробах предельно упростилось. ПЦР позволяет не только с высокой чувствительностью обнаружить ДНК вируса, но и определить его тип, что исключительно важно в прогнозировании заболевания, а жидкостная цитология более точно определяет степень поражения клеток.

Цель и задачи. Выявить распространенность заболеваний шейки матки, ассоциированных с папилломавирусами у женщин, обратившихся к гинекологу, и оценить диагностические возможности лабораторных, эндоскопических и морфологических методов.

Материалы и методы. Для решения поставленных задач, на сугубо добровольной основе, с информированным согласием на обследование и лечение в специализированном кабинете патологии шейки матки в период с августа 2012 по сентябрь 2016 гг. обследованы 976 в возрасте от 16 до 50 лет. Состояние шейки матки оценивали по разработанному нами алгоритму: осмотр в зеркалах, соскоб с экзо- и эндоцервикса, направляемый на жидкостную о/цитологию, расширенная видеокольпоскопия на аппарате SENSITEC с архивацией данных в ПК, ПЦР и бактериологическая диагностика инфекций, передаваемых половым путем (ИППП), а также обследование на ВПЧ методом ПЦР. Для верификации клинического диагноза проводилось морфологическое исследование материала, полученного путем биопсии шейки матки и соскоба цервикального канала. Формулировка диагноза по МКБ-10. Для генотипирования и количественного ВПЧ-теста использовался «АмплиСенс ВПЧ ВКР Скрин-Титр FRT» производства ФГУН «ЦНИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора. Обработку полученных результатов производили с применением стандартных пакетов программ прикладного статистического анализа (Statistica for Windows 6.0, Microsoft Excel 2007 и др.), с помощью вариационной статистики с вычислением средних величин (M), ошибки средней (м), квадратичного отклонения, выборочной дисперсии, вариабельности. Показатель достоверности различий (p) определен по таблице Стьюдента-Фишера. При сравнении показателей по группам достоверность различий вычисляли с использованием непараметрических критериев статистической оценки, в выборках небольшого объема п ≤ 30 – критерий Вилькоксона-Манна-Уитни, доверительные вероятности, и доверительные пределы генеральной средней. Использовались общепринятые уровни значимости: p<0,05; p< 0,01. При p<0,05 вероятность безошибочного прогноза соответствовала 95%, при p< 0,01 – 99%.

Основные результаты. Согласно Приказу Министерства здравоохранения РФ от 1.11.2012г. № 572н «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи по профилю «акушерство и гинекология (за исключением использования вспомогательных репродуктивных технологий)»» (приложение 20) 976 женщинам выполнен вагинальный осмотр в зеркалах, после проведения простой кольпоскопии взят соскоб с экзо- и эндоцервикса на онкоцитологию и выполнена расширенная кольпо-

скопия с использованием 5% раствора уксусной кислоты и 1% раствора Люголя. Кольпоскопические картины оценивались согласно Международной классификации кольпоскопических терминов 2011 г. Нормальная кольпоскопическая картина установлена у 264 (27%) женщин, в том числе у 195 (73,9%) с признаками воспаления. Аномальная кольпоскопическая картина выявлена у 712 женщин (73%), в том числе 1 типа (легкой степени выраженности) у 484 (68%) и 2 типа (тяжелой степени) – у 228 (32%). По результатам цитологического исследования NILM диагностирован у 74 (7,6%), ASCUS у 301 (31%), LSIL у 493 (50,3%), HSIL у 108 (11,1%) обследуемых. Затем пациентки с признаками воспаления по КПС (195) независимо от данных о/цитологии обследованы на ИППП. В этой группе у 104 женщин обнаружены следующие инфекции: хламидии - у 17 (16,3%), уреамикоплазменная инфекция – у 30 (28,8%), а у 22 (21,2%) – герпесвирусы. Дополнительно, по результатам бактериоскопии выявлены грибы рода Candida у 18 (17,3%) и гарднерелла – у 17 (16,4%). Из 712 женщин с аномальной кольпоскопической картиной, представленной уксусно-белым эпителием, мозаикой и пунктацией разной степени выраженности у 375 диагностированы следующие ИППП: хламидии – у 49 (13%), уреамикоплазменная инфекция – у 50 (13,3%), герпесвирусы – у 64 (17,1 %). При этом дополнительно обнаружены грибы рода Candida – у 139 (37,1%) и облигатные анаэробы методом ПЦР – у 73 (19,5 %) женщин. Зная об этиологической роли ВПЧ в развитии рака шейки матки всем пациенткам было предложено ВПЧ тестирование, но выполнено оно у 732 (75%). ВПЧ обнаружен у 610 (83,3%), При сравнении с КПС картинами и о/цитологией различные онкогенные типы ВПЧ чаще встречались при КПС картинах с признаками воспаления и цитологическими заключениями ASCUS и LSIL. В группе женщин с подтвержденными ИППП (479) после купирования воспалительного процесса была выполнена биопсия шейки матки и соскоб цервикального канала, а у 497 морфологическая диагностика выполнялась без предварительной подготовки. В соскобах цервикального канала были элементы желез и цервикального эпителия без признаков атипии. Исследование биоптатов щейки матки у 712 женщин показало наличие только хронического цервицита у 236 (33,1%), хр. цервицита с признаками папилломавирусного инфицирования у 403 (56,6%) и дисплазию разной степени выраженности у 73 (10,3%). Пациенткам с подтвержденной цервикальной интраэпителиальной неоплазией 2-3 ст. после локального хирургического лечения с целью профилактики развития рака шейки матки применялся интерлейкин-2 по схеме: в толщу шейки матки в 2 точки за одно введение в дозе 500000 ЕД, растворенных в 1 мл 0.9% физ. раствора. На курс 5 процедур с интервалом 2 – 3 дня, 3 курса в течение 3 месяцев. При наблюдении от 6 месяцев до трех лет случаев перехода ЦИН 2-3 в рак шейки матки не выявлено.

Выводы. Учитывая большую распространенность ВПЧ и высокий процент выявленных цервикальных интраэпителиальных неоплазий разработанный алгоритм диагностики заболеваний шейки матки позволяет своевременно верифицировать диагноз и персонализировать лечение.

ДИАГНОСТИКА ЗАБОЛЕВАНИЙ ШЕЙКИ МАТКИ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ У ВИЧ-ПОЗИТИВНЫХ ЖЕНЩИН

Дианова Т.В.[1], Свердлова Е.С.[2]

[1] ОГАУЗ «Ангарский перинатальный центр»
[2] Клиника доктора Шерман, Иркутск, Россия

Известно, что рак шейки матки имеет вирусную этиологию. Активность ВПЧ зависит от сопутствующих инфекционных факторов и состояния иммунной системы. Течение заболеваний шейки матки у женщин с ВИЧ усугубляется особенностями «двойного иммунодефицита» при сочетании ВИЧ и ВПЧ. Частота цервикальных интраэпителиальных неоплазий в 3 раза выше, чем у женщин без ВИЧ и составляет 43%, рак шейки матки формируется в 5% наблюдений, развивается в сроки от 6 месяцев до 2 лет.

Цель и задачи. Разработка алгоритма диагностики ВПЧ и интраэпителиальных неоплазий у ВИЧ-позитивных женщин с последующей персонализацией лечения.

Материалы и методы. На сугубо добровольной основе с информированным согласием на наблюдение и лечение в кабинете патологии шейки матки в период август 2012 – сентябрь 2016 обследована 641 женщина с ВИЧ согласно разработанному нами алгоритму, включающему в себя: анамнез, осмотр, цитологические исследования, ПЦР на ИППП и ВПЧ, расширенную кольпоскопию, биопсию шейки матки и выскабливание цервикального канала. Комплексная терапия интрацервикальных неоплазий тяжелой степени включала в себя АРВТ и интерлейкин-2 до и после хирургического лечения.

Основные результаты. Средний возраст 23 – 28 лет. Сочетание ВИЧ с другими инфекциями: с туберкулезом – 26 (4,1%); с сифилисом – 83 (12,9%); с гонореей – 4 (0,6%); с трихомонадной инфекцией – 42 (6,6%); с хламидийной инфекцией - 25 (3,9%); с генитальным герпесом – 11 (1,7%); с уреамикоплазменной инфекцией – 47 (7,3%); с вагинальным кандидозом – 219 (34,2%); с бактериальным вагинозом – 207 (32,3%).

У большинства женщин обнаружено несколько ИППП. По данным цитологии и кольпоскопии эпителий с различной степенью атипии обнаружен у 124 (19,3%) пациенток, всем выполнена прицельная биопсия и соскоб цервикального канала, и 56 (45,2%) сделан ВПЧ-тест. По данным морфологического заключения выявлены: CIN 1 – у 14 (11,3%); CIN 2 – у 64 (51,6%); CIN 3 – у 32 (25,8%) и инвазивный рак – у 14 (11,3%). ВПЧ более 10^5 копий обнаружены у 52 (92,9%), преобладали 16, 45, 33 и 35 генотипы. Выраженность аномальных КПС картин, соответствие цитологическим заключениям и тяжесть дисплазии находились в прямой зависимости от вирусной нагрузки ВИЧ, которая колебалась от 912 (при CIN 1) до 928 000 (при инвазивном раке). Назначение АРВТ в сочетании с деструктивными методами лечения позволило стабили-

зировать процесс на стадии CIN 2 у 45 (70,3%) и CIN 3 – у 28 (87,5%) ВИЧ – позитивных женщин. В тех случаях, когда не проводилось специфическое лечение, процесс перехода из дисплазии средней степени в пре- и инвазивный рак составил от 6 месяцев до 1 года - у 23 (23,4%) пациенток. Интерлейкин-2 использован у 32 женщин с ЦИН 2-3 и ВИЧ в стадии 4а; без ИППП, бактериального вагиноза и кандидозного вагинита, без сопутствующего туберкулеза и гепатитов В, С. Препарат вводился в толщу шейки матки в 2 точки за одно введение в дозе 500000 ЕД, растворенных в 1 мл 0.9% физ. раствора. По схеме: на курс 5 процедур с интервалом 2 – 3 дня, 3 курса в течение 3 месяцев. В результате местного применения интерлейкина-2 у женщин с ВИЧ и ВПЧ повышался уровень CD4+-клеток, увеличивался показатель CD4/CD8, повышалось CD 16+.

Выводы: выполнение алгоритма диагностики ВПЧ ассоциированных заболеваний шейки матки у ВИЧ-позитивных женщин позволяет своевременно диагностировать тяжелые цервикальные интраэпителиальные неоплазии и использовать комбинированное лечение. Включение интерлейкина-2 в комплексную терапию ЦИН, ассоциированных с ВПЧ у женщин с ВИЧ позволяет восстановить взаимосвязи в системе общего и локального иммунитета, что повышает эффективность АРВТ и способствует предупреждению перехода ВИЧ в стадию СПИДа, а ЦИН 2-3 в рак шейки матки, снижает активность ВПЧ в цервикальном эпителии, вызывая регресс цервикальных интраэпителиальных неоплазий в 37,5% наблюдений.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ ВПЧ 16 ТИПА У ВПЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ЖЕНЩИН Г. МОСКВЫ

Дмитрюкова М.Ю., Романюк Т.Н., Шипулина О.Ю.

ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение. Вирусы папилломы человека высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР) являются этиологической причиной развития рака шейки матки (РШМ), при этом более 60% случаев РШМ ассоциированы с наличием ВПЧ 16 типа. Геном ВПЧ представлен двуцепочечной молекулой ДНК, для него характерна крайне низкая изменчивость. В классификации ВПЧ принято выделять типы на основании наличия различий в нуклеотидной последовательности более 10%; линии внутри типа - 1-10% различий и 0,5-1% (сублинии). Таким образом, выделено более 200 типов ВПЧ, в пределах 16 типа – 4 линии: A (Европейская), B (Африканская -1), C (Африканская-2) и D (Американская), по нескольку сублиний внутри каждой линии. Названия были выделены по группам населения, среди которых данная линия преобладает.

В последнее время обсуждается возможность зависимости между вариантом ВПЧ и прогнозом заболевания. К примеру, некоторые исследователи показали, что линия D чаще ассоциирована с развитием РШМ и чаще встречается в аденокарциномах (в 3-45 раз). Так же, считается, что мутация T350G (L83V) линии A, увеличивает риск персистенции и развития тяжелой дисплазии в 2 раза. Однако, многие авторы предполагают, что риск персистенции связан не столько с различием в вирусной последовательности, сколько с биологическими и поведенческими особенностями той или иной группы населения. Поэтому для понимания наличия зависимости между вариантом ВПЧ и прогнозом заболевания необходимы полномасштабные исследования. При этом, на данный момент, исследования распространенности различных линий ВПЧ на территории Российской Федерации не проводились.

Цель работы. Оценить распространенность линий и сублиний ВПЧ 16 типа среди женского населения г. Москвы.

Материалы и методы. Для оценки распространенности линий и сублиний ВПЧ 16 типа было проведено секвенирование LCR и E6 фрагментов генома ВПЧ от 29 пациентов. Амплификацию участка генома длиной в 1500 нуклеотидов проводили двумя перекрывающимися фрагментами, по 750 нуклеотидов каждый (фрагмент LCR - от 7127 до 87 нуклеотида и фрагмент E6/E7 - от 87 до 743 нуклеотида), по методу Сэнгера. Выбор фрагментов для секвенирования был сделан по работе [Cornet et al., 2012].

Для проведения секвенирования были отобраны образцы, положительные на ДНК ВПЧ 16 типа, полученные от пациентов Российского онкологического научного центра им Н.Н. Блохина и Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена, а также полученные в ходе скрининговых исследований.

Результаты. По цитологическому/гистологическому диагнозу, исследованные образцы распределились следующим образом: 2 пациента с цитологическим диагнозом норма, 1 – ASCUS, 1 - L-SIL и 25 пациентов – с диагнозом РШМ/тяжелая дисплазия. Для последних было проведено определение наличия интеграции вируса в геном путем дифференциальной амплификации фрагментов E7/E6 и E1/E2. Из 25 образцов РШМ/тяжелая дисплазия 13 образцов содержали ДНК ВПЧ 16 в неинтегрированной форме, 12 - в частично/полностью интегрированной форме.

Наличие SNP и принадлежность к тому и иному варианту анализировались визуально в сравнении с референсной последовательностью ВПЧ 16 типа [Myers et al., 1995], по методу, описанному [Cornet et al., 2012].

Подавляющее большинство исследованных образцов относилось к линии A (Европейской). Только один образец – к D1 варианту (Северо-Американская линия).

Всего было обнаружено 34 полиморфных позиции, при этом в 7 позициях (24, 109, 350, 7193, 7316, 7450, 7521) замена присутствует более чем в 1 последовательности. Аллель 350G предположительно ассоциирована с прогрессией тяжелой дисплазии. В нашем исследовании из 25 образцов рак/тяжелая дисплазия 18 содержали аллель 350G, 7 - аллель 350 T. При этом из четырех образцов NILM/LSIL 2 образца содержали аллель 350G, 2 – 350T.

Вывод. Для популяции г. Москвы характерна достаточно однородная структура ВПЧ инфекции, представленная, в первую очередь линией A. Интересно, что некоторые из обнаруженных SNP не описаны до этого в литературе.

Хотя в нашем исследовании было показано, что ал-

лель 350G более чем в два раза чаще встречается в образцах с тяжелой дисплазией/рак, чем аллель 350T, для более убедительных выводов необходимо провести исследование большего количества образцов.

ОБНОВЛЕННАЯ ПРОГРАММА ЦЕРВИКАЛЬНОГО СКРИНИНГА АВСТРАЛИИ, ОСНОВАННАЯ НА ПЕРВИЧНОМ ВПЧ-ТЕСТИРОВАНИИ. ПОСТУЛАТЫ И ТРЕБОВАНИЯ К ЛАБОРАТОРНЫМ ТЕСТАМ

Куевда Д.А.

Confidential Pathology, Сидней, Австралия

Введение. Целью обновления национальной программы цервикального скрининга Австралии стало обеспечение доступа всех австралийских женщин, вакцинированных против вируса папилломы человека (ВПЧ) или нет, к безопасной, применимой и эффективной программе, основанной на существующей научной доказательной базе. Первый запрос по необходимости улучшения программы скрининга в связи с недостаточно удовлетворительными результатами был сформулирован комитетом по скринингу в 2012 году. После чего Департаментом Здоровья был сформирован комитет по обновлению программы, состоящий из экспертов по цервикальному скринингу из областей гинекологическая онкология, клиническая лабораторная диагностика, цитология, эпидемиология, общая практика, медсестринское дело, защита прав потребителей, а также представителей правительств Содружества, штатов и территориальных органов управления.

Предпосылки к изменению программы цервикального скрининга

Рак шейки матки занимает 12 ранговое место среди женщин Австралии. В 2009 году заболеваемость составила 8,9 новых случаев на 100 тыс. женщин в возрасте от 20 до 69 лет, смертность – 2,0 на 100 тыс. Таким образом, существующая программа скрининга, несмотря на очевидные успехи в снижении выявляемости, не позволила добиться существенной элиминации заболевания. Австралийское правительство развивает два долгосрочных проекта по дальнейшему улучшению выявления и предотвращения РШМ: вакцинопрофилактика и обновленная программа цервикального скрининга. Начиная с января 2007 года правительство поддержало фондирование программы вакцинации девочек в возрасте 12-13 лет. Начиная с 2013 года вакцинация также начата для мальчиков. Программа вакцинации направлена на предотвращение примерно 70% случаев ВПЧ инфекции, ассоциированной с развитием РШМ. В настоящее время в связи с новыми научными данными по эффективности и информативности различных скрининговых технологий, обновление программы скрининга направлено на обеспечение доступа австралийских женщин к современным, более безопасным и эффективным подходам к ранней диагностике.

Задачами программы обновления стали:

1. Оценить доказательства эффективности различных путей проведения скрининга, скрининговых интервалов, возраста начала и завершения скрининга для вакцинированного и невакцинированного населения

2. Оценить по методу "затраты-эффективность" различные варианты реализации скрининга и построить экономические модели;

3. Изучить возможности улучшения национальной системы сбора сведений о предраке и РШМ, включая раковый регистр;

4. Оценить возможность исполнения и приемлемость обновленной программы

Как результат предварительного изучения литературы, и, учитывая мнения экспертов различных отраслей, были предложены три возможных сценария совершенствования программы скрининга РШМ (*см. табл.*) для дальнейшего моделирования и проведения пилотных исследований.

Параметр	**Текущая программа**	**Сценарий 1**	**Сценарий** 2	**Сценарий 3**
Первичный скрининговый метод	Традиционная цитология	Традиционная цитология	Жидкостная цитология	ДНК ВПЧ тест
Возрастной диапазон	Женщины в возрасте 18-69 лет	Женщины в возрасте 25-64 лет		
Интервал	2 года	3 года (25-49 лет), 5 лет (50-65 лет)		5 лет
Сортировка результатов	Цитологическое руководство		Последующий ДНК ВПЧ тест	Жидкостная цитология Последующее или совместное тестирование
Дополнительные технологии	Не применимо	Не применимо	С или без автоматическими анализаторами цитологических изображений	

Параметр	Текущая программа	Сценарий 1	Сценарий 2	Сценарий 3
Стратегия выхода из скрининга	Должно быть 2 нормальных цитологических результата за последние 5 лет	ДНК ВПЧ тест в возрасте 64 лет		
Самозабор	Не применимо	Не применимо	Не применимо	ДА
Активный вызов на визит	Нет	ДА		

После ряда лет исследований финальные рекомендации экспертов, вошедшие в правительственную программу были основаны на сценарии 3.

Обновленная программа цервикального скрининга Австралии

После рассмотрения силы существующей доказательной базы в отношении безопасности, клинической эффективности, затратной эффективности различных сценариев Национальной программы цервикального скрининга были рекомендованы:

1. Цервикальный скрининг с использованием тестов направленных на выявление ДНК ВПЧ с частичным генотипированием (16 и 18 генотипы) и последующим исследованием методом жидкостной цитологии;

2. Интервал скрининга – раз в 5 лет; возрастная группа – женщины 25 – 69 лет, вакцинированные и невакцинированные;

3. Выход из программы – отрицательный ВПЧ-тест в возрасте 69-74 года;

4. Самозабор образца для тестирования на наличие ДНК ВПЧ для женщин никогда не участвовавших в программе или участвовавших недостаточно при условии, что рекомендации к проведению подобного тестирования будут опосредованы через медицинского работника, также предоставляющего возможность стандартного скринингового исследования

Дополнительные замечания к программе

1. В ходе исследования установлено, что первичный скрининг с использованием ВПЧ-тестов с частичным генотипированием 16 и 18 типов каждые 5 лет более эффективен и более затратно-эффективен чем существующая программа скрининга;

2. Вторичное исследование положительных в ВПЧ-тесте образцов методом жидкостной цитологии позволит улучшить специфичность первичного скринингового метода;

3. Совместное тестирование на ДНК ВПЧ и жидкостная цитология не рекомендованы;

4. Преимущества скрининга перевешивают вред для возрастной группы 25-69 лет;

5. Женщины моложе 25 лет не должны проходить скрининг;

6. Женщины в возрасте 69-74 лет могут получить преимущество от однократного тестирования на ДНК ВПЧ перед выходом из программы;

7. При наличии симптомов цервикальное тестирование должно быть доступно женщинам любого возраста;

8. Для обеспечения эффективности должна быть внедрена система приглашений и повторных вызовов;

9. Система самозабора образцов позволит вовлечь в скрининг традиционно труднодоступные группы населения;

Требования к лабораторным ВПЧ-тестам для целей скрининга РШМ

- руководство разработанное Meijer P. и соавт. (2009) должно быть использовано для валидации тестов, пригодных для использования в программе цервикального скрининга с целью обеспечить поддержание приемлемого уровня затрат и эффективности;
- в частности, лаборатории должны удостовериться и/или провести собственные исследования, демонстрирующие, что чувствительность и специфичность используемого метода соответствуют уровню, указанному в руководстве Meijer и соавт (клиническая чувствительность для ≥CIN2 не менее чем 90% клинической чувствительности HC2 или другого широко валидированного теста, клиническая специфичность для ≥CIN2 не менее чем 98% клинической специфичности HC2 или другого валидированного метода);
- ВПЧ-тест должен соответствовать требованиям государственного регулятора обращения медицинских изделий - TGA (Theraputic Goods Administration) и быть сертифицированным для диагностики in vitro;
- ВПЧ-тест должен выдавать результат выявления ДНК всех высокоонкогенных ВПЧ как минимум с частичным генотипированием ВПЧ 16 и ВПЧ 18
- ВПЧ-тест не может быть изготовлен в лаборатории (“in-house”).

Специальные требования к лабораториям выполняющим ВПЧ-тестирование в рамках национальной программы скрининга РШМ

Квалификация персонала

Лабораторный персонал, выполняющий ВПЧ тестирование должен пройти специализированный тренинг по использованию тестов использующих принцип амплификации нуклеиновых кислот для выявления ДНК ВПЧ, а также тренинг по системам внешней оценки качества. Сертификаты тренинга должны быть доступны для проверки.

Пре-аналитический этап

- Медицинский персонал, осуществляющий взятие материала, должен брать образец цервикального канала строго при условии прямой видимости
- Образцы, полученные для тестирования на наличие ДНК ВПЧ должны быть пригодны для последующей жид-

костной цитологии для избежания повторного взятия материала, за исключением случаев когда осуществляется самозабор;

• Транспортная среда для материала должна быть валидирована для обоих тестов (ВПЧ-тест и цитология)

• Лаборатория должна предоставить медицинским работникам инструкции по самостоятельному забору образцов.

Аналитический этап

• Лаборатории обязаны использовать только коммерчески доступные ВПЧ-тесты валидированные для первичного популяционного скрининга

• Используемый ВПЧ-тест должен быть основан на методе амплификации нуклеиновых кислот и

• детектировать генотипы 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 и 68, с раздельным выявлением ВПЧ 16 и ВПЧ 18 (где возможно генотип 45 будет рассматриваться для целей ведения больных как 18).

• Образцы для самостоятельного забора должны быть получены с использованием инструментария, предназначенного для данных целей и валидированного в лаборатории или производителем теста.

Меры по обеспечению качества

Лаборатории обязаны регулярно участвовать в циклах внешней оценки качества.

Лаборатории обязаны проводить расследование всех случаев дискордантных результатов выявления ВПЧ 16 и 18 в программах внешней оценки качества.

Лаборатории обязаны иметь документированный метод учета частот положительных, отрицательных и невалидных результатов ВПЧ-тестирования; данные величины также должны предоставляться в Страновой раковый регистр.

Лаборатории должны проводить сравнение частоты выявления ДНК ВПЧ с данными по средней частоте выявления ДНК ВПЧ в регионе, доступными в Раковом регистре.

В случае если частота выявления не попадает в диапазон двух стандартных отклонений, специальные меры по расследованию, включая перетестирование образцов, должны быть предприняты.

Заключение

Обновленная программа цервикального скрининга Австралии стартует в мае 2017 года. Ключевым отличием от ранее существовавшей программы стали внедрение валидированных ВПЧ-тестов на первом этапе скрининга с последующим анализов образцов методом жидкостной цитологии. Дополнительные возможности по охвату населения скринингом дает внедрение технологии самозабора образцов для удаленных территорий и населенных пунктов, а также активного приглашения населения к участию в программе. Серьезные требования введены в отношении централизованного контроля качества лабораторий, выполняющих ВПЧ-тестирование в рамках программы скрининга.

Литература

• MSAC Outcomes. Application No. 1276 – Renewal of the National Cervical Screening Program // Australian Government, Medical Services Advisory Committee, 2016

• Requirements for laboratories reporting cervical screening tests, First Edition, NPAAC Tier 4 Document, 2017

• C.J.L.M. Meijer,H. Berkhof, D.A.M. Heideman et al. Validation of high-risk HPV tests for primary cervical screening Journal of Clinical Virology 46 (2009) S3, S1–S4

ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ ИНТЕГРИРОВАННЫХ ВПЧ 16, 18 И 45 ТИПОВ У ЖЕНЩИН С РАЗЛИЧНЫМ ЦИТОЛОГИЧЕСКИМ ДИАГНОЗОМ

Дмитрюкова М.Ю., Романюк Т.Н., Шипулина О.Ю.

ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение. Вирус папилломы человека высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР) является главной этиологической причиной развития рака и предраковых поражений шейки матки. Геном ВПЧ представляет собой циркулярную двуспиральную ДНК, размером около 8000 пар нуклеотидов и состоит из 3 функционально дифференцированных областей: E (early - ранняя) и L (late-поздняя) и LCR (длинный контрольный регион). Регион LCR контролирует транскрипцию вирусного генома, E – инициирует функционирование ранних генов (E1-E8), экспрессирующих белки, ответственные за репликацию вирусного генома (E1 и E2), транскрипцию ДНК (E2), созревание и высвобождение вирусных частиц (E4), трансформацию клеток (E5, E6 , E7), и иммортализацию (E6 и E7). E6 и E7 белки только ВПЧ ВКР называют онкобелками, т.к. они непосредственно участвуют в процессе малигнизации. Они стимулируют пролиферацию клеток, взаимодействуя и подавляя функции клеточных белков p53 и pRB, участвующих в контроле пролиферации клеток. Интеграция ДНК ВПЧ ВКР в геном клетки хозяина также играет значимую роль в процессе малигнизации. Интеграция наблюдается во всех клеточных линиях рака шейки матки. Также очень высокий процент случаев интеграции отмечают при раке, вызванном ВПЧ 16, 18 или 45 типов, и при предраковых заболеваниях шейки матки – поражениях высокой степени тяжести, но никогда при поражениях низкой степени тяжести. При интеграции чаще всего происходит разрыв E2 гена вируса, что может запустить ингибирование вирусного промотора, который контролирует онкогены E6 и E7. В инфицированных клетках вирус может находиться в эписомальной (доброкачественная инфекция) или интегрированной (маркер малигнизации) форме. При интеграции чаще всего повреждается ген E1 или E2, продукты которого являются транскрипционными факторами, регулирующими синтез онкогенов E6 и E7. Таким образом, интеграция ДНК ВПЧ в геном клетки – важный фактор развития злокачественного процесса. Но, выявить интеграцию ВПЧ в геном клетки хозяина - очень сложная задача. Часто ВПЧ присутствует в пуле клеток соскоба как в интегрированной, так и в эписомальной форме. В редких случаях эписомальная форма ВПЧ отсутствует и выявляется только

ДНК ВПЧ E6-E7 или концентрация ДНК целого вирусного генома (E1-E2) меньше концентрации интегрированной ДНК (E6-E7).

Цель работы: сравнить частоту выявления интегрированных форм ВПЧ у пациентов с цитологическим диагнозом норма (NILM) и поражения высокой степени тяжести (H-SIL) и оценить выявление интеграции в качестве маркера тяжелых поражений.

Материалы и методы. В исследование был взят 4771 образец соскоба эпителия цервикального канала, полученные при проведении скрининговых исследований. Для всех образцов было проведено совместное ВПЧ-ПАП тестирование. Возраст пациентов составил 18-77 лет, медиана – 29 лет. Определение концентрации ВПЧ ВКР и генотипирование проводилось с использованием наборов реагентов «АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-титр-FL» и «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-FL». Наличие интегрированной формы определялось путем одновременной количественной специфической амплификации E2 и E6-E7 участков генома ВПЧ 16, 18 и 45 типов.

Результаты. По цитологическому диагнозу полученные образцы распределились следующим образом: цитологическая норма (NILM) – 4069 образцов, поражения тяжелой степени - H-SIL (CIN2+) – 702 образца. Интегрированная форма ВПЧ выявлялась у 33 (0,8%) образцов с цитологическим диагнозом норма и у 40 (5,6%) образцов с диагнозом H-SIL (CIN2+). Распределение генотипов ВПЧ среди интегрированных форм не отличалось в группах с разным цитологическим диагнозом: 16 тип встречался у 20 (50,0%) образцов CIN2+ и у 16 (48,5%) образцов NILM; 18 тип – у 10 (25%) образцов CIN2+ и у 9 образцов NILM (27,3%); 45 тип – у 10 (25%) образцов CIN2+ и у 8 (24,2%) образцов NILM.

Выводы. Интегрированная форма ВПЧ 16, 18 и 45 типов достоверно чаще встречается у пациенток с цитологическим диагнозом H-SIL, чем у пациенток с цитологической нормой. При этом, обнаружение интегрированных форм ВПЧ у пациентов с цитологическим диагнозом NILM может служить ранним маркером возможного развития тяжелой дисплазии.

ГЕНОТИПЫ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА ВЫСОКОГО ОНКОГЕННОГО РИСКА, ВЫЯВЛЯЕМЫЕ У ЖЕНЩИН РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Еремин В.Ф., Гасич Е.Л., Сосинович С.В.

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Введение. Проблема папилломавирусной инфекции остается весьма актуальной как в мире, так и в нашей республике в частности. Проведенные ранее на территории Республики Беларусь исследования по генотипированию ВПЧ высокого онкогенного риска показали, что разные генотипы вируса по-разному представлены в разных областях страны. Так, например, в городе Минске на 16 генотип ВПЧ приходилось 41,2%, ВПЧ-31- 8,8%, ВПЧ-39 – 8,8%, ВПЧ-58 – 8,8%, ВПЧ-18 – 5,9%, ВПЧ-35, ВПЧ-45, ВПЧ-56 и ВПЧ-59 – по 2,9% от всех исследованных случаев (n=68) у женщин при CIN3 и раке шейки матки, а в целом у всех исследованных пациенток (n=104) на ВПЧ-16 приходилось 28,6%, ВПЧ-31 – 7,14%, ВПЧ-58 – 7,14%, ВПЧ-33-5,4%, ВПЧ-39-5,4%, ВПЧ-18-3,6%, ВПЧ-45 – 3,6%, ВПЧ-59-3,6%. Таким образом, как видно из данных, представленных в данной статье выявляемость разных генотипов ВПЧ высокого онкогенного риска у женщин, страдающих раком шейки матки и пациенток с фоновыми заболеваниями шейки матки и клинически здоровых женщин отличается.

Изучение распространенности ВПЧ высокого онкогенного риска в разных группах населения является необходимым для прогнозирования развития онкологических заболеваний урогенитального тракта, для обоснования применения вакцинации детей и определения типа вакцины, которая будет являться наиболее эффективной применительно к нашей стране.

Цель и задачи: определить генотипы ВПЧ высокого онкогенного риска у женщин репродуктивного возраста

- провести сбор и обработку вагинальных и цервикальных образцов от здоровых и женщин с разной патологией урогентильного тракта;

- осуществить генотипирование с использованием коммерческих наборов.

- определить частоту встречаемости ВПЧ высокого онкогенного риска в разных группах пациенток.

Материалы. Цервикальные и вагинальные образцы, всего 1465, были получены из г. Минска – 1206 (82.3%), Гомельской – 218 (14.9%), Витебской – 11 (0.8), Гродненской – 1 (0.071%), Могилевской – 18 (1.2%) и Брестской областей – 11 (0.8%).

Методы. Выделение ДНК для проведения ПЦР выполняли с использованием «Комплекта реагентов для выделения ДНК из клинического материала «ДНК-сорбАМ» производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия.

Генотипирование ВПЧ методом ПЦР осуществляли с использованием коммерческого «Набора реагентов для выявления ДНК вирусов папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска (ВКР) 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 70 типов в клиническом материале методом ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле «АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-EPh», «Набора реагентов для выявления и дифференциации ДНК вирусов папилломы человека (ВПЧ) 16 и 18 типов в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле «АмплиСенс® ВПЧ 16/18-EPh», АмплиСенс ВПЧ 6/11-EPh и «Набора реагентов для выявления и дифференциации ДНК вирусов папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска (ВКР) 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 53, 56, 58, 59, 66 типов в клиническом материале методом ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-EPh» производства ЦНИИ эпидемиологии, г. Москва, в соответствии с инструкцией, прилагаемой к набору.

ПЦР выполняли с использованием амплификаторов Corbett Research LTD (Австралия) и Applied Biosystems 2700 (США).

Результаты. Было исследовано 1465 вагинальных и цервикальных образцов, полученных от женщин с диагнозами папилломатоз вульвы, шейки матки, хронический цервицит и др, проживающих в г. Минске и Минской области 1206 образцов, из г. Гомеля и Гомельской области 218 образцов, из Могилевской области 18, из Витебской и Брестской по 11 и из Гродненской -1. 18 проб было получено от детей с диагнозом папилломоматоз гортани. Возраст обследованных женщин варьировал от 16 до 67 лет, средний возраст – 28,6±3,6 лет, детей от 6 до 11 лет, средний возраст –8,0±2,3 лет.

В результате скрининговых исследований с использованием ПЦР положительные результаты получены в 764 (52.2%) образцах. Установлено, что чаще всего у обследованных пациентов встречался ВПЧ-16 – 222 (29.1%), в 125 случаях в виде моноинфекции и в 97 случаях в комбинациях с другими генотипами вируса. ВПЧ-45 - 63 (8.2%), в виде моноинфекции был обнаружен в 20 случаях, а в комбинациях с другими генотипами в 43. ВПЧ-56 – в 17 (2,2%), ВПЧ-31 – в 16 (2,1%), ВПЧ-33 и 58 в 14 (1,8%), а ВПЧ-18 и 39 – 12 (1.6%) случаях. Кроме этого были выявлены ВПЧ-52,35, 66, 59. ВПЧ-18 в наших исследованиях оказался на 7 месте вместе с ВПЧ-39.

Заключение. Изучение распространенности ВПЧ высокого онкогенного риска в разных группах населения является необходимым для прогнозирования развития онкологических заболеваний урогенитального тракта, для обоснования применения вакцинации детей и определения типа вакцины, которая будет являться наиболее эффективной применительно к нашей стране.

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА ВЫСОКОГО ОНКОГЕННОГО РИСКА

Еремин В.Ф., Гасич Е.Л., Сосинович С.В.

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Введение. Степень родства между типами ВПЧ основана на сравнении нуклеотидных последовательностей и проведении филогенетического анализа фрагментов ДНК (L1 ORF). Для получения высокоинформативного филогенетического анализа достаточно фрагмента ДНК гена L1 размером 291 п.н.. Секвенирование и последующий филогенетический анализ полученных последовательностей вирусов папилломы (ВП) используются для определения типов, подтипов и вариантов.

Использование методов молекулярной эпидемиологии позволяет решать не только чисто эпидемиологические вопросы: определять типы ВПЧ, их степень родства, направления заноса вируса, а также давать рекомендации по типам вакцин, которые будут наиболее оптимальны на территории нашей страны. Молекулярно-генетические методы исследования в настоящее время широко внедряются и используются во всем мире, например, при изучении ВИЧ-инфекции, гепатитов В и С, туберкулез и других заболеваний. Исследования по генотипированию ВПЧ в мире начались совсем недавно 6-8 лет назад, а первая объемная работа, посвященная молекулярно-эпидемиологической характеристике ВПЧ высокого онкогенного риска, вышла только в 2012 г. В Республике Беларусь исследования в данном направлении были проведены впервые.

Цель и задачи. Определить варианты ВПЧ высокого онкогенного риска у женщин репродуктивного возраста

- провести дизайн и синтез праймеров к L1 и E6/E7 участкам генома ВПЧ-16, 18, 45;
- осуществить секвенирование и филогенетический анализ полученных фрагментов ДНК;
- определить варианты ВПЧ высокого онкогенного риска, выявляемые в Беларуси.

Материалы и методы. *Анализ специфичности праймеров* проводили с использованием программы Blast (NCBI).

Дизайн пар праймеров к отдельным к L1 и E6/7 участкам генома ВПЧ 16, 18, ВПЧ 45 и подбор температуры отжига для каждого праймера осуществляли с помощью компьютерной программы FastPCR.

Синтез праймеров проводили на автоматическом синтезаторе "Expedite ™ 8900 Nucleic Acid Synthesis System", PerSeptive Biosystems, США.

Секвенирующую ПЦР проводили в объеме 20 мкл с использованием 1 мкл BigDye Terminator v3.1 и 4 мкл 5-и кратного буфера для секвенирования.

Очистку фрагментов ДНК после секвенирущей ПЦР проводили этанол/ацетатной преципитацией.

Электрофоретическое разделение очищенных фрагментов ДНК осуществляли на генетическом анализаторе ABI Prism 3100 Avant (США).

Для обработки данных секвенирования использовали программное обеспечение Sequencing Analysis 5.1.1., SeqScape v2.6, BioEdit.

Для филогенетического анализа полученных фрагментов ДНК использовали программу MEGA6.

Результаты. Для проведения секвенирующей ПЦР были разработаны и синтезированы пары праймеров (прямой и обратный), позволяющие генотипировать участок гена L1 ВПЧ 16, 18, 45 типов ВПЧ, а также пары праймеров к E6/E7 участку ВПЧ-16, 18 и 45. После очистки продуктов секвенирующей ПЦР был проведен электрофорез полученных фрагментов ДНК. Всего было проанализировано 58 проб по гену L1 и 62 по участку E6/E7 ВПЧ-16. 29 образцов по участку гена L1 и 13 по участку генов E6/E7 формировали самостоятельные группы друг с другом. p-дистанции между белорусскими образцами колебались от 0.000 до 0.024 (средняя p-дистанция 0.001), что указывает как на новые заносы вируса в страну, так и на циркуляцию наших «старых» типов ВПЧ-16, которые и формировали самостоятельные группы образцов на филогенетическом дереве. Три образца (два из Минска и один из Гродно) находились в одном кластере с пробами из Африки, остальные образцы располагались на филоге-

нетическом дереве с референс-последовательностями из юго-восточной Азии и Европы.

Для определения возможных различий по участкам генов Е6 и Е7 у пациентов с разными стадиями ЦИН и пациентов с раком шейки матки, мы сравнили полученные сиквенсы. Никаких различий в последовательностях обнаружено не было.

По участкам генов L1 и Е6/Е7 было секвенировано по 4 образца ВПЧ-18. Три фрагмента ДНК ВПЧ-18 по участку гена L1 и 4 по Е6/Е7 формировали самостоятельную группу, а один образец располагался вместе с референс-последовательностями из Азии. Средние р-дистанции между «белорусскими» образцами составили 0.001.

По участкам генов L1 и Е6/Е7 ВПЧ-45 было секвенировано по 4 образца. По L1 два образца из минской и гомельской областей формировали самостоятельную группу, а два располагались вместе с референс-последовательностями из юго-восточной Азии. Средние р-дистанции между образцами составили 0.003. По участку генов Е6/Е7 образцы из Белоруссии располагались отдельно и формировали две самостоятельные группы. р-дистанции между образцами составили 0.002.

Заключение. Были отработаны условия проведения ПЦР, секвенирующей ПЦР и секвенирование с парами праймеров к L1, Е6/Е7 участкам ВПЧ-16, 18, 45. Проведенное секвенирование и филогенетический анализ по данным участкам позволили установить, что на территории Республики Беларусь циркулируют варианты ВПЧ-16, 18, 45, занесенные из стран юго-восточной Азии. Вместе с тем, было показано, что на территории страны циркулируют «старые» местные варианты ВПЧ высокого онкогенного риска, а также вирусы с Африканского континента и это необходимо учитывать при выборе вакцин и оценке эффективности поствакцинального иммунитета. Для проведения эффективной вакцинации и оценки поствакцинального иммунитета необходимо проводить молекулярно-эпидемиологический мониторинг за ВПЧ высокого онкогенного риска определять типы ВПЧ.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИРКУЛЯЦИИ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА 16 И 18 ТИПОВ

Олюнина Е.А., Дуванова Е.А., Николаева Т.Н.

ООО «Центр лабораторной диагностики «ЦЕЛДИ», Вологда, Россия

Проблема папилломавирусной инфекции является актуальной в связи с тем, что вирус приобретает всё большее распространение в мире, вызывая рост заболеваний, ассоциированных с ним. По данным ВОЗ, ежегодно в мире диагностируется около 2,5-3 млн. случаев инфицирования ВПЧ. Обладая значительной контагиозностью и высоким онкогенным потенциалом, вирус способен вызывать как доброкачественные новообразования (папилломатоз, аногенитальные бородавки), так и злокачественную трансформацию клеток. ВПЧ считается инициирующим фактором в генезе рака шейки матки, занимающего второе место в структуре онкологической заболеваемости у женщин. Более 70% случаев РШМ в России вызвано ВПЧ 16 и 18 типов. Учитывая склонность к длительному, бессимптомному течению ВПЧ-инфекции, выявляемость её среди населения остаётся низкой.

Целью данной работы было определение частоты встречаемости ВПЧ 16 и 18 типов, как одних из наиболее канцерогенных типов ВПЧ, у женщин и мужчин Вологодской области; а также анализ количества вируса в клиническом материале пациентов различных возрастных групп.

Материалы и методы. Было обследовано 629 человек, в том числе 544 женщины и 85 мужчин, обратившихся в Центр, как с симптомами заболеваний урогенитального тракта, так и с профилактической целью. Материалом для исследования у женщин служили соскобы эпителиальных клеток цервикального канала и шейки матки, у мужчин – соскобы эпителия уретры. Пробоподготовка проводилась с использованием набора реагентов «ДНКсорб-АМ» производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора. Для амплификации использовали реагенты «Амплисенс ВПЧ 16/18-Fl». Амплификация и детекция результатов в режиме «реального времени» проводились на приборе Rotor Gene-6000.

Результаты. Из всех обследованных у 88 человек (14 %) выявлен ВПЧ, причём у 71 человека (11,3%) обнаружен только 16 тип, у 15 (2,4%) – только 18. У двоих (0,3%) выявлено оба типа.

Все пациенты были разделены на возрастные группы: до 29 лет, 30-39лет, 40-49 лет, старше 50 лет. Группа молодых людей в возрасте до 29 лет самая многочисленная – 280 человек (44,5%) и в ней отмечена наибольшая частота обнаружения вируса (19 %). С возрастом она снижается: 11,2% в группе 30-39 лет, 4,3% в группе 40-49 лет, после 50 лет повышается – 13,3%. Возможно, второй пик связан с более прицельным обследованием женщин после 50 лет при наличии у них клинических проявлений вирусной инфекции.

Во всех группах 16 тип ВПЧ в 3-4 раза встречается чаще 18-го. Соотношение между типами у женщин и у мужчин такое же, как в общей популяции, но распространённость вируса у мужчин несколько ниже, чем у женщин. Отмечена наибольшая концентрация вируса в группе пациентов до 29 лет: у 41% инфицированных ВПЧ обнаруживается в концентрации 3-5 lg на 100 тыс. клеток, у 38,6% - более 5lg. В группе 30-39 лет у 34,8% пациентов обнаруживается следовая концентрация вируса (менее 1000 копий на мл). Возможно, это результат самопроизвольной элиминации вируса или лечения.

34 пациента из 88 с выявленным ВПЧ (39%) были обследованы и на другие ИППП. У 14 из них (41%) была обнаружена гарднерелла вагиналис, у 11 (32%) – уреаплазма, у 3 (8,8%) – кандида, у 3 (8,8%) – микоплазма хоминис, у 1 (2,9%) – микоплазма гениталиум. В 29% случаев встречались сразу несколько инфекций.

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о высоком распространении ВПЧ 16 и 18 типов среди муж-

чин и женщин. У лиц молодого возраста выше инфицированность и концентрация вируса, чаще происходит его самопроизвольная элиминация. Так как онкологическая патология чаще встречается после 35 лет необходимо более пристальное внимание уделять пациентам старше этого возраста, включать обследование на ВПЧ в программу цервикального скрининга.

Сочетание ВПЧ с другими инфекциями говорит о роли сниженного иммунитета в генезе этих заболеваний и необходимости комплексного подхода к обследованию и лечению таких пациентов.

Список использованной литературы:

1. «Инфекции, передающиеся половым путем» клинические лекции под ред. В.Н.Прилепской

2. «Папилломавирусная инфекция: современный взгляд на эпидемиологию, профилактику и лечение» А.А.Хрянин, О.В. Решетников, журнал «Гинекология» том 15 №5

3. «Папилломавирусная инфекция урогенитального тракта женщин» информационно-методическое пособие, Е.В.Фоляк, Т.М.Соколова, К.Ю.Макарова, А.В.Якимова, В.Р. Мухамедшина, А.В. Усова

СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДВОЙНОЙ И МОНОЭКСПРЕССИИ БЕЛКОВ P16/KI67 И P16 ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ПОРАЖЕНИЙ ШЕЙКИ МАТКИ ТЯЖЕЛОЙ СТЕПЕНИ У ВПЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ЖЕНЩИН

Лешкина Г.В.[1], Шипулина О.Ю.[1], Романюк Т.Н.[1], Шабалова И.П.[2]

[1] ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, г. Москва

[2] Кафедра клинической лабораторной диагностики РМАНПО, г. Москва, Россия

Введение. У женщин репродуктивного возраста в России рак шейки матки (РШМ) занимает первое место среди злокачественных новообразований в этой возрастной группе. Выявление атипичных клеток и интраэпителиальных поражений шейки матки в цитологическом исследовании при цервикальном скрининге имеет важное значение в предотвращении роста этого заболевания. Однако, традиционная цитология обладает низкой чувствительностью и часто пропускает случаи предрака и рака. Жидкостная цитология и ВПЧ-тесты уже давно используются и хорошо зарекомендовали себя благодаря значительно более высоким показателям чувствительности при выявлении внутриэпителиальной неоплазии шейки матки по сравнению с традиционным цитологическим методом. Иммуноцитохимические маркеры – экспрессия белков P16 и Ki67, совместное использование которых показало высокую прогностическую значимость для выявления H-SIL (CIN-2+) в крупных исследованиях, пока только начинают внедряться в России, а их применение вызывает необходимость правильного использования и точной трактовки полученных результатов. Использование в иммуноцитохимии только одного маркера, белка p16, не позволяет достичь желаемых показателей чувствительности и специфичности. Относительно недавно появился тест для одновременного выявления двух белков – p16 и Ki67. Было показано, что совместная экспрессия этих белков в одной клетке – более специфичный маркер тяжелых поражений эпителия шейки матки, вызванных вирусом папилломы человека высокого онкогенного риска. P16 – продукт гена CDKN2A, ингибирует активность циклин-зависимых киназ, регулирующих фазу G1 клеточного цикла, экспрессия которого усиливается при инактивации протеина, регулирующего клеточный цикл белка – супрессора опухолей ретинобластомы (Rb) онкопротеином E7 вируса папилломы человека (ВПЧ). Ki67 – маркер клеточной пролиферации. Выявление атипичных клеток плоского эпителия шейки матки, экспрессирующих одновременно p16 и Ki67, указывает на индуцированное дисрегулирование клеточного цикла и обеспечивает более точную диагностику поражения высокой степени тяжести [Шамракова М.В., 2014; Коган Е.А., 2014].

Цель работы – сравнить эффективность (чувствительность и специфичность) выявления H-SIL (CIN-2+) при использовании двойного и моноокрашивания в иммуноцитохимии с помощью теста на совместную экспрессию p16/Ki67 и экспрессию только белка p16 отдельно.

Материалы и методы. В исследование включили жидкостные образцы эпителиальных клеток шейки матки от 388 пациенток, ранее исследованные в ВПЧ-ПАП-тесте. Тонкослойные препараты для иммуноцитохимии были приготовлены по инструкции BD SurePath (USA) с помощью автоматизированной станции BD (Prep Mate). Для выявления экспрессии белков использовали набор реагентов «CINtec® PLUS Cytology Kit» (Roshe Diagnostics, Germany), который содержит моноклональные мышиные антитела к белку p16 (клон E6H4) и белку Ki67 (клон 274-11 AC3). Процедуру окрашивания выполняли по инструкции к набору. Детекцию результатов окрашивания выполняли на микроскопе Leica DM-1000 с объективами x10, x20, x40 и x100 и окулярами x10. Учитывали ядерную и цитоплазматическую реакцию. Результат считали положительным при условии выявления хотя бы в одной атипичной клетке одновременного окрашивания двумя маркерами - p16 и Ki67. При экспрессия p16 цитоплазма окрашивается в коричневый цвет, а при экспрессии Ki6 - ядро окрашивается в красный цвет.

Основные результаты. Пациентки (N=338) были разделены на группы по результатам ПАП-теста. В каждой группе оценили долю ВПЧ-позитивных (≥ 3 lg ДНК ВПЧ на 10^5 клеток), долю положительных результатов по выявлению только белка p16 (моноэкспрессия) и совместной экспрессии белков p16 и Ki67 в одной клетке. Результаты представлены в таблице.

Совместная экспрессия белков p16 и Ki67 обнаружена в 100% случаев дисплазии плоского эпителия тяжелой степени (CIN3), в 98,4% случаев умеренной дисплазии (CIN2), в 33,3% случаев легкой дисплазии (CIN1), и в 30,8% случаев койлоцитарной атипии (маркер ВПЧ-инфекции). При отсутствии атипичных клеток и дисплазий (NILM) совместная экспрессия белков p16 и Ki67 была выявлена

Анализ результатов иммуноцитохимического выявления белков p16 и Ki67 338 пациенток с цитологическими результатами NILM и ASCUS+ (2015 год)				
Результат ПАП-теста	Количество пациенток в группе	Выявлено ВПЧ	Результат ИЦХ	
			Моноэкспрессия p16+ / Ki67-	Коэкспрессия p16+/Ki67+
NILM	118	91,5%	83,1%	16,9%
LSIL HPV	13	30,8%	69,2%	30,8%
LSIL CIN-1	21	100,0%	66,7%	33,3%
ASCUS	24	100,0%	45,8%	54,2%
ASC-H	60	100,0%	5,0%	95,0%
CIN-2	64	100,0%	1,6%	98,4%
CIN-3	38	100,0%	0,0%	100,0%
Всего	338			

только в 16,9% случаев. В то время как выявление экспрессии только одного белка p16 снижается по мере тяжести выявленной патологии в ПАП-тесте.

Выводы. Таким образом, выявление экспрессии только одного белка p16 не может быть использовано для выявления патологии тяжелой степени по причине его низкой специфичности, так как приведет к большому количеству ложноположительных результатов. Доля выявления тяжелой патологии при совместном выявлении двух белков в одной клетке - p16 и Ki67 - выше, чем при использовании только одного маркера - p16. Только выявление двойной экспрессии в одной клетке белков p16 и Ki67 позволяет повысить эффективность (чувствительность и специфичность) выявления H-SIL (CIN-2+).

ВЕДЕНИЕ ПАЦИЕНТОК С ВПЧ-ИНФЕКЦИЕЙ, РОЛЬ КЛЕТОЧНЫХ МАРКЕРОВ В ВЫЯВЛЕНИИ ПРЕДРАКА ШЕЙКИ МАТКИ

Минкина Г.Н.[1], Шипулина О.Ю.[2], Лешкина Г.В.[2], Романюк Т.Н.[2], Фириченко С.В.[1]

[1]Московский государственный медико-стоматологический университет имени А. И. Евдокимова, Москва
[2]ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение. Цервикальный скрининг, который является важной стратегией в снижении заболеваемости и смертности от рака шейки матки, за последние десятилетия значительно изменился. На смену традиционному ПАП-тесту, который обладает низкой чувствительностью, прежде всего, вследствие большого количества ошибок при заборе материала, пришли новые технологии – ПАП-тест жидкостный, для которого соскобный материал помещают в транспортно-фиксирующую среду, с последующим приготовлением тонкослойного препарата, что значительно снижает количество ошибок на преаналитическом этапе. Важным преимуществом жидкостной технологии является возможность исследования остаточного клеточного материала на вирус папилломы человека (ВПЧ-тестирование). ВПЧ-тест обладает более высокой чувствительностью в выявлении предраковой патологии, чем ПАП-тест, но специфичность ВПЧ-теста ограничена вследствие широкой распространенности вируса в популяции. Для повышения специфичности скрининга на основе ВПЧ-тестирования предлагаются алгоритмы, включающие различные методы сортировки ВПЧ-позитивных образцов: ПАП-тест, ВПЧ-тест с определением генотипов или отдельным выявлением наиболее онкогенных 16 и 18 типов. Но, ПАП-тест, вследствие низкой чувствительности, будет ограничивать чувствительность скрининга, а при выявлении 16 и 18 типов специфичность увеличится ненамного. Необходимо использование более специфичных для предраковых патологий маркеров. В таким маркерам относятся клеточные белки p16 и Ki67, экспрессия которых находится под влиянием вирусных онкогенов. Тест на экспрессию белка p16, который является маркером антипролиферативной активности, продемонстрировал высокую чувствительность и специфичность по отношению к CIN3 в иммуногистохимии. Однако, при исследовании цитологических препаратов специфичность оказалась недостаточной. Относительно недавно был разработан и хорошо апробирован тест на двойную экспрессию белков p16 и Ki67 в одной клетке. Экспрессия этих белков взаимоисключена в нормальных клетках, т.к. один – Ki67 – маркер пролиферации, а другой – p16 – маркер антипролиферативной активности. По результатам Европейских клинических исследований тест показал и высокую чувствительность, и высокую специфичность.

Цель и задачи. Оценить клиническую эффективность

использования теста на двойную экспрессию белков p16/Ki67 методом иммуноцитохимии как маркера предраковых заболеваний шейки матки у ВПЧ-позитивных женщин.

Материалы и методы. Исследование включало 686 женщин от 17 до 73 лет (средний возраст 35 лет), которые с октября 2013 по декабрь 2016 пришли на плановый осмотр, консультацию или были направлены на кольпоскопию. Материал для исследования (соскоб из эндо- и эктоцервикса) забирали с помощью комбинированной цитощетки Rovers® Cervex-Brush CombiRT (Нидерланды) в среду для жидкостной цитологии (SurePath, BD). Собранный материал использовали для ВПЧ-тестирования – определения количества и типа вируса – с помощью тест-систем АмплиСенс® (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии»), жидкостного цитологического исследования (ПАП-теста жидкостного) и определения ко-экспрессии (двойного окрашивания) онкобелков p16/Ki67 с помощью набора реагентов CINtec Plus (Roche Laboratories). У 188 женщин был взят материал (путем прицельной биопсии, эксцизии, конизации) на гистологическое исследование.

Основные результаты. Пациентки были разделены на группы по результату ВПЧ-теста. В первую группу включили пациенток, у которых ВПЧ-тест был негативным или количество ВПЧ было малозначимым – менее 3 lg/10^5 клеток (N=96). Вторую группу составили пациентки, у которых количество ВПЧ было в диапазоне от 3 до 4 lg/10^5 клеток (N=92), третью – от 4 до 5 lg/10^5 клеток (N=128), четвертую – выше 5 lg/10^5 клеток (N=370). Результаты выявления двойной экспрессии, атипичных клеток, патологии в ПАП-тесте и гистологическом исследовании представлены в таблице.

У ВПЧ-негативных женщин коэкспрессия p16/Ki67 не была выявлена, и тяжелые поражения (ASC-H, H-SIL) не были обнаружены. Частота выявления p16/Ki67 и тяжелых поражений увеличивалась с увеличением количества ВПЧ.

Из 188 биопсийных препаратов, направленных на гистологическое исследование, в 69 дисплазии не были выявлены (NILM), p16/Ki67 обнаружили в 23 (33,3%), а в 18 случаях в ПАП-тесте были выявлены ASC-H, H-SIL, AGC. В 22 была выявлена легкая дисплазия (D1), p16/Ki67 обнаружили в 11 (50%), тяжелые поражения обнаружены в 8 из них. В 61 случаях D2, D2-3 p16/Ki67 обнаружили в 55 (90,2%), а тяжелые поражения – в 40 из них. В 32 случаях D3, CIS p16/Ki67 обнаружили в 31 (96,9%), тяжелые поражения – в 23. В 4 случаях выявлен рак (в двух – плоскоклеточный – SCC, в двух – аденокарцинома – ADC), p16/Ki67 обнаружили во всех четырех случаях, в ПАП-тесте из двух ADC в одном ASC-H, в другом – AGC, из двух SCC в одном – ASC-H, в другом ASC-US. Чувствительность p16/Ki67-теста в выявлении H-SIL (D2, D3, CIS) и рака оказалась равной 92,8%. Если для расчета специфичности взять только ВПЧ-негативные образцы, в которых гистологически не были выявлены H-SIL, то специфичность равна 100%. Если включить и ВПЧ-позитивные образцы, в которых в ПАП-тесте не были выявлены тяжелые поражения (N=70), то специфичность p16/Ki67 равна 89,8% (в 44 из 49 p16/Ki67 не были выявлены).

Сравниваемый параметр	ВПЧ < 3 lg (N =96)		ВПЧ ≥ 3 < 4 lg (N=92)		ВПЧ ≥ 4 < 5 lg (N=128)		ВПЧ ≥ 5 lg (N=370)	
	N	доля	N	доля	N	доля	N	доля
Из них p16/Ki67 позитивных	0	0,0%	13	14,1%	38	29,7%	178	48,1%
Из них ≥ ASCUS	11	11,5%	20	21,7%	55	43,0%	251	67,8%
Из них ASC-H	0	0,0%	3	3,3%	12	9,4%	71	19,2%
Из них H-SIL+	0/2*	0,0%	3	3,3%	14	10,9%	48	13,0%
Направлены на гистологию	14	14,6%	11	12,0%	34	26,6%	129	34,9%
гистология = NILM	14	100,0%	9	81,8%	16	47,1%	35	27,1%
из них p16/Ki+	0		3	33,3%	6	37,5%	21	60,0%
гистология = D2+	0	0,0%	2	18,2%	14	41,2%	76	58,9%
из них p16/Ki+	0		2	100,0%	14	100,0%	69	90,8%

* - у двух пациенток первоначально в ПАП-тесте выявили H-SIL, но тест на p16/Ki67 был негативным, при пересмотре препаратов результат ПАП-теста исправлен.

Выводы. Результаты исследования демонстрируют высокую чувствительность и специфичность теста на коэкспрессию p16/Ki67 в выявлении CIN2+, который может успешно использоваться при сортировке ВПЧ-позитивных женщин, выявленных в цервикальном скрининге.

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВПЧ-ИНФЕКЦИИ ПРИ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ОРОФАРИНГЕАЛЬНОЙ ОБЛАСТИ

Поляков А.П., Славнова Е.Н., Никифорович П.А.

Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена Минздрава РФ, Москва, Россия

Введение. Плоскоклеточый рак орофарингеальной области представляет молекулярно и клинически гетерогенную группу. Наиболее важными факторами риска плоскоклеточного рака орофарингеальной области являются табак и алкоголь, однако, в последние пятнадцать лет растет количество ВПЧ-положительных плоскоклеточых раков, причем преобладают молодые мужчины не курящие и не употребляющие алкоголь. Эти случаи представляют собой новую и особую подгруппу. Для молекулярной классификации необходимо определять наличие вируса папилломы человека (ВПЧ) высокого риска в качестве этиологического фактора.

Цель. Определить тактику и актуальность определения ВПЧ-инфекции при плоскоклеточном раке орофарингиальной области.

Материалы и методы. Исследовано 54 больных плоскоклеточным раком орофарингиальной области различной степени дифференцировки (опухоль языка - 34, опухоль альвеолярного отростка - 9, метастазы в лимфатические узлы шеи без первично выявленного очага - 5, рак кожи - 1, рак полости рта – 5). Средний возраст больных составил – 54 года. Мужчин - 32 (60%). Женщин – 22 (40%). Особенностью нашего исследования являлось то, что клеточный материал забирали с помощью щетки в виалы фирмы BD (Becton Dickinson) с консервирующей жидкостью, что позволило параллельно проводить жидкостную цитологию методом BD SurePath, ПЦР, иммуноцитохимию. Детекция и количественное определение содержания ДНК ВПЧ в биологическом материале проводилась методом ПЦР в реальном времени. В качестве биологического материала использовали соскоб эпителиальных клеток ротоглотки или биопсийный материал. Все образцы были протестированы на 14 генотипов ВПЧ высокого канцерогенного риска (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 генотипы). Тестирование проводилось в 2 этапа: экстракция ДНК из биологического материала (коммерческим набором АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ) и непосредственно этап ПЦР с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (коммерческий набор Амплисенс ВПЧ ВКР генотип-титр FL). Иммуноцитохимическое исследование проводили с использованием методов Ultra Vision, EnVision FLEX. В качестве маркеров интегрированных форм ВПЧ использовали оценку экспрессии белка **p16ink4a** (Набор CINtec® Plus «Цитология» предназначен для качественного одновременного выявления белков p16INK4a и ki-67 в цитологическом материале методом иммуноцитохимии (ИЦХ) Биовитрум).

Результаты. У 5 больных из 54 (9.3%) выявлена инфекция ВПЧ (4 пациента с 16 типом, 1 пациент с 18 типом) методом ПЦР. Гиперэкспрессия белка супрессора опухолевого роста p16INK4a, являющегося биомаркером при диагностике интегрированных форм вируса при ВПЧ-положительных плоскоклеточных раках, выявлена в 1 (33%) случае. Гиперэкспрессия p16INK4 в сочетании с наличием ВПЧ-инфекции, согласно большинству авторов может предсказать хороший прогноз.

Заключение. Комбинация ПЦР и иммуноцитохимии оптимальное сочетание для более точного определения активной ВПЧ-инфекции при плоскоклеточном раке, чем раздельно статус ДНК ВПЧ или экспрессия p16INK4a, что является полезным и надежным способом для диагностики и определения прогноза ВПЧ-позитивного плоскоклеточного рака. Данная комбинация различных методов позволяет повысить точность диагностики в группе пациентов с плоскоклеточным раком орофарингеальной области. Планируется дальнейшая обработка полученных данных, для выявления оптимальной последовательности диагностических методов.

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ВПЧ-ИНФЕКЦИИ ВЫСОКОГО ОНКОГЕННОГО РИСКА СРЕДИ ЖЕНЩИН РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА САНКТ-ПЕТЕРБУРГА

Морозова С.Е.[1], Каменева О.А.[1], Косякова К.Г.[1,2], Пунченко О.Е.[2]

[1]СПб ГУЗ «Детская городская больница № 22», Санкт-Петербург, Россия
[2]Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

Папилломавирусная инфекция является одной из наиболее распространенных среди инфекций, передающихся половым путем, и чаще регистрируется среди женщин. При этом среди вирусов папилломы человека (ВПЧ) особо выделяют 18 генотипов высокого онкогенного риска (ВПЧ ВКР), персистенция которых играет ключевую роль в развитии интраэпителиальной дисплазиии и приводит к развитию рака шейки матки у 95,3% пациенток с данной патологией. В настоящее время факторами реализации онкогенного потенциала ВПЧ считаются: инфекция ВПЧ ВКР, одновременное инфицирование несколькими генотипами, высокая вирусная нагрузка и интеграция вирусного генома в геном пораженной клетки хозяина. Одним из наиболее удобных методов обнаружения вируса, определения его генотипов и вирусной нагрузки является метод ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

Цель. Используя метод ПЦР-РВ, оценить частоту встречаемости ВПЧ ВКР и вирусную нагрузку у женщин репродуктивного возраста в Колпинском районе Санкт-Петербурга.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили соскобы эпителия цервикального канала, взятые одноразовыми цитощетками в «Транспортную среду для клинического материала из урогенитального тракта женщин». Для выделения ВПЧ ВКР и определения вирусной нагрузки использовали тест-систему «Ампли Сенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FI». Метод основан на одновременной амплификации (мультиплекс-ПЦР) и детекции в режиме реального времени в одной пробирке участков ДНК 12 генов ВПЧ 4 филогенетических групп без определения генотипа: A9 (16, 31, 33, 35, 52, 58); A7 (18, 39, 45, 59); а также совместно A5 (51) и A6 (56); детекция участка β-глобинового гена применяется в качестве внутреннего контроля. Диагностическая чувствительность набора составляет 93,8%. Концентрацию ДНК ВПЧ в исследуемых пробах определяли с помощью калибровочных кривых, используя принцип нормализации геномной ДНК с целью нивелировать вариативность результатов при взятии материала. Вирусную нагрузку рассчитывали в lg (ВПЧ на 10^5 клеток) и оценивали в зависимости от полученных данных как клинически малозначимую (<3), клинически значимую с риском развития дисплазии (3-5), клинически значимую, повышенную с высокой вероятностью наличия дисплазии (>5). Полученный материал исследовали методом ПЦР-РВ с использованием анализатора CFX 96 (BioRad, США), комплекта тест-систем ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора.

Результаты. В 2015-2016 гг. на ВПЧ ВКР было обследовано 1205 женщин, обратившихся в женские консультации Колпинского района Санкт-Петербурга по поводу различных гинекологических заболеваний и генитальных инфекций. Вирус папилломы человека одной или нескольких из 3 групп ВКР был обнаружен у 385 обследованных (32,0%). Клинически малозначимая концентрация ВПЧ ВКР выявлена у 7,6% обследованных женщин. Клинически значимая концентрация ВПЧ ВКР с риском развития дисплазий и клинически значимая, повышенная с высокой вероятностью наличия дисплазий выявлена у 9,5 и 14,9% женщин соответственно. Учитывая высокий риск одновременного инфицирования несколькими генотипами папилломавирусов в патогенезе неопластических процессов урогенитального тракта, нами проанализирована частота обнаружения ВПЧ ВКР различных филогенетических групп в отдельных пробах. Установлено, что ВПЧ ВКР только одной филогенетической группы выявлены у 22,7% пациенток, в том числе у 6,6% в малозначимой концентрации. Папилломавирусы генотипов, относящихся к двум и трем филогруппам, были выявлены у 8,0 и 1,2% женщин соответственно, при этом в малозначимой концентрации вирус был обнаружен только у пациенток с вирусами, относящимися к двум группам – в 0,9% проб. Принимая во внимание транзиторный характер ВПЧ-инфекции, можно предположить, что у 6,6% обследованных женщин, в пробах которых был обнаружен ВПЧ ВКР одной филогенетической группы в клинически малозначимой концентрации, существует высокая вероятность самостоятельной элиминации возбудителя, без применения медикаментозных и хирургических средств в течение 1-2 лет с момента инфицирования. В то же время 6,4% обследованных пациенток следует отнести в группу риска в связи с обнаружением у них ВПЧ ВКР нескольких филогенетических групп с вирусной нагрузкой, признанной в качестве «порога прогрессии» 5 lg и выше, ассоциированной с большей вероятностью наличия или прогрессии дисплазий. Данная группа пациенток требует дальнейшего динамического наблюдения и обследования.

Вывод. Полученные данные свидетельствуют о распространенности ВПЧ-инфекции среди женщин репродуктивного возраста Санкт-Петербурга на уровне 32,0%, среди которых 6,4% следует отнести к группе повышенного риска наличия или прогрессирования дисплазий. Внедрение тестирования на ВПЧ ВКР молекулярно-биологическим методом в качестве первичного скрининга или дополнения к цитологическому исследованию соскобов цервикального канала позволит оптимизировать схему диагностики и профилактики рака шейки матки.

ОЦЕНКА ВЫЯВЛЕНИЯ *ВПЧ* У ЖЕНЩИН С ФОНОВЫМИ ПРОЦЕССАМИ ШЕЙКИ МАТКИ

Туркина И.А.[1], Пепеляева А.В.[2], Хайруллина А.М.[2], Елекова Е.Ю.[1], Денисова Е.В.[1]

[1]ООО «Кабинет лабораторных исследований «Овум», Кемерово, Россия

[2]ЧУЗ «Поликлиника Овум», Кемерово, Россия

Директор ООО «Кабинет лабораторных исследований «ОВУМ» – к.м.н. Тимощук Г.И.

На сегодняшний день в программу цервикального скрининга рака шейки матки совместно с цитологическим исследованием включен ПЦР-анализ для обнаружения ДНК высокоонкогенных генотипов *вируса папилломы человека (ВПЧ)*. ПЦР- исследование в формате Real time повышает чувствительность скрининга, позволяя диагностировать значительную часть предраковых изменений, в том числе начальных и даже субклинических форм, количественное исследование позволяет оценить уровень вирусной нагрузки и дифференцировать малозначимые, клинически значимые и повышенные концентрации ДНК *ВПЧ*, предрасполагающие к развитию изменений в клетках эпителия.

Цель исследования: оценить частоту выявления и уровень вирусной нагрузки высокоонкогенных генотипов *ВПЧ* у пациенток с интраэпителиальными неоплазиями в сравнении с женщинами без изменений клеток эпителия по данным цитологического исследования.

Материалы и методы. Обследование было проведено у 322 женщин с фоновыми заболеваниями шейки матки, возраст обследованных от 24 до 43 лет (средний возраст 30,8 лет).

Пациенткам выполнялось цитологическое и ПЦР исследование соскобов из экзо- и эндоцервикса.

Цитологическое исследование выполнялось на микроскопе Axio Lab.A1 фирмы «Карл Цейс», Германия, окраска проводилась по методам Папаниколау (ПАП-тест) и Папенгейма.

Методом ПЦР Real time определялась суммарная вирусная нагрузка *ВПЧ* 12-ти высокоонкогенных генотипов, в положительных образцах проводилось генотипирование *ВПЧ*. Для проведения исследования использовались тест-системы «АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-титр-FL» и «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-FL», производитель ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия. Результаты реакции регистрировались на детектирующем амплификаторе «Rotor Gene 6000», фирмы «Corbett», Австралия.

Результаты исследования. По результатам цитологического исследования пациентки были разделены на 3 группы: 155 с воспалительными процессом шейки матки без интраэпителиального поражения (NSIL), 135 женщин с низкой степенью интраэпителиального поражения –CIN I и/или цитологическими признаками *ВПЧ*-инфекции (LSIL) и 32 с высокой степенью интраэпителиального поражения CIN II или CIN III (HSIL).

Выявление *ВПЧ* и уровень вирусной нагрузки коррелировал с уровнем поражения клеток эпителия, нарастая с увеличением степени интраэпителиального поражения:

- у пациенток с NSIL ДНК *ВПЧ* выявлялось в 30,3% (47) в диапазоне от 0,5 до 4,65 Lg (*ВПЧ*/10^5 клеток эпителия), средняя концентрация -2,75 Lg, при этом 9,7% (15) пациенток имели высокую вирусную нагрузку более 5 Lg.
- у пациенток с LSIL ДНК *ВПЧ* выявлялось в 77,8% (105), концентрации определялись в диапазоне от 1,09 до 6,82 Lg (*ВПЧ*/10^5 клеток эпителия), средняя концентрация -3,85 Lg, 36,3% (49) пациенток имели высокую вирусную нагрузку более 5 Lg.
- у пациенток с HSIL ДНК *ВПЧ* выявлялось в 93,8% (30), концентрации определялись в диапазоне от 3,5 до 8,8 Lg (*ВПЧ*/10^5 клеток эпителия), средняя концентрация -6,6 Lg, 75% (24) пациенток имели высокую вирусную нагрузку более 5 Lg.

Среди положительных по *ВПЧ* пациенток, генотипы распределились следующим образом:

- у пациенток с интраэпителиальными поражениями (LSIL и HSIL) преобладал 16 генотип *ВПЧ*, в 67,4% (91) в виде единственного генотипа.
- у пациенток с LSIL и HSIL распределение генотипов среди положительных по *ВПЧ* пациенток было следующим: 16 тип выявлялся в 73,3 % (99), 18 тип в 13,3% (18), 31, 39, 51 и 58 типы в 7,4% (10), 35 тип в 3,7% (5), 45 тип в 6,7% (9), 33, 52 и 56 типы в 5,9% (8), 59 тип в 5,2% (7). Более 1 генотипа определялось в 33,3% (45).
- у пациенток с NSIL распределение генотипов *ВПЧ* было следующим: 16 тип выявлялся в 36,2% (17), 18 тип в 12,8% (6), 31 тип в 10,6% (5), 33, 39, 52, 56 и 59 типы в 8,5% (4), 35 тип в 4,3% (2), 45 тип в 14,9% (7), 51 и 58 типы в 17,0% (8). Более 1 генотипа определялось в 25,5% (12).

Выводы

- Полученные данные свидетельствуют о высокой инфицированности высокоонкогенными типами *ВПЧ* у женщин с фоновыми процессами шейки матки: в группе с воспалительными изменениями в 30,3%, в группе с LSIL в 77,8%, в группе с HSIL в 93,8%. Частота обнаружения *ВПЧ* увеличивается в группах пациентов при увеличении степени поражения эпителия.
- Это подтверждает целесообразность включения ПЦР- исследования для обнаружения ДНК высокоонкогенных генотипов *ВПЧ* в программу цервикального скрининга.
- У пациенток с интраэпителиальным поражением частота выявления 16 типа *ВПЧ* значительно выше – 73,3%, чем у пациенток с NSIL-36,2%, что свидетельствует о его значительной роли в канцерогенезе.
- Прослеживается корреляция уровня вирусной нагрузки и степени изменений в клетках эпителия. Это позволяет пациентов с клинически значимыми и высокими нагрузками выделять в группу риска по развитию интраэпителиальных поражений, выбирая для них активную тактику лечения и динамического наблюдения.

ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА И СВЯЗАННЫХ С НИМ ПАТОЛОГИЙ ШЕЙКИ МАТКИ У ЖЕНЩИН С ВИЧ-ПОЗИТИВНЫМ И ВИЧ-НЕГАТИВНЫМ СТАТУСОМ

Попова А.А.[1], Шипулина О.Ю.[1], Кравченко А.В.[1], Деулина М.О.[1], Дмитрюкова М.Ю.[1], Романюк Т.Н.[1], Зуева А.Г.[2]

[1]ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва
[2]ФГАО УВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

В последние годы в России увеличилось число случаев передачи ВИЧ-инфекции при гетеросексуальных контактах. Это привело к росту доли женщин репродуктивного возраста среди пациентов с ВИЧ-инфекцией. ВИЧ-инфицированные женщины имеют более высокий риск папилломавирусой инфекции, чем ВИЧ-негативные женщины, а также более высокий риск персистенции и малигнизации.

Цель и задачи: изучить распространенность вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР) и связанной с ним патологии шейки матки (CIN) у ВИЧ-инфицированных женщин.

Материалы и методы. Работа проводилась в период с января 2014 года по март 2016 года на базе ФНМЦ ПБ СПИД. В процессе работы было обследовано 575 человек, которые составили 2 исследуемые группы: 169 пациенток с ВИЧ-инфекцией и контрольная группа из 406 здоровых женщин, имеющих отрицательные результаты анализов на наличие ВИЧ-инфекции. Всем женщинам был проведен ВПЧ-ПАП-тест на основе жидкостной технологии. Для ВПЧ-тестирования – определения количества и типа вируса – использовали наборы реагентов: «АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-титр-FL» и «АмплиСенс® ВПЧ 16/18-FL» для выявления определения концентрации ВПЧ; «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-FL» для дифференцирования 12 типов ВПЧ ВКР (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59 типы).

Результаты. Среди 575 обследованных в основ-

ном преобладали женщины молодого возраста до 40 лет – 62,4%. В результате проведения ВПЧ-ПАП-теста у 69 (40,8%) из 169 пациенток с ВИЧ-инфекцией был диагностирован ВПЧ. В контрольной группе ВПЧ был обнаружен у 60 женщин (14,8%) из 406. Распространенность ВПЧ в контрольной группе статистически ниже, чем в группе с ВИЧ-инфекцией ($p<0,01$).

В группе контроля у 46 женщин (11,3%) был зафиксирован один генотип ВПЧ, в группе ВИЧ-инфицированных женщин один генотип ВПЧ был выявлен у 38 (22,5%) ($p<0,01$). У 14 (23,3%) женщин группы контроля было обнаружено сочетание двух (10 женщин, 2,5%) и трех (4 женщины, 1%) генотипов ВПЧ. У ВИЧ-инфицированных пациенток сочетание нескольких генотипов ВПЧ было зафиксировано у 37 (21,9%) женщин, микст состоял от двух до шести генотипов. Ведущими генотипами в контрольной группе были 16, 33, 45, а у ВИЧ-инфицированных женщин - 16, 18, 31 и 45 генотипы.

Из 406 женщин контрольной группы изменения ПАП-теста не соответствовали норме у 18 обследованных (4,4%), а в группе ВИЧ-инфицированных женщин у 23 (13,6%) пациенток из 169. При анализе распределения ASC-US в группе контроля и группе ВИЧ-инфицированных женщин различий не выявлено ($p>0,05$). В группе контроля ASC-US существенно преобладало, чем CIN1 и CIN2. В группе ВИЧ-инфицированных женщин мы наблюдали примерно одинаковое количество ASC-US, CIN1 и CIN2. В группе ВИЧ-инфицированных женщин CIN1 и CIN2 наблюдались чаще, чем в группе контроля ($p<0,01$).

Выводы. У ВИЧ-инфицированных женщин чаще выявляется ВПЧ, чем в группе контроля. Генотипы ВПЧ различаются в группе контроля и ВИЧ-инфицированных. Частота изменений ПАП-теста у ВИЧ-инфицированных выше, чем в группе контроля. Полученные данные говорят о высоком риске развития рака шейки матки у ВИЧ-инфицированных женщин. Необходимо создание рекомендаций для проведения ВПЧ-ПАП-теста при обследовании ВИЧ-инфицированных женщин.

ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА У ЖЕНЩИН С ВИЧ-ПОЗИТИВНЫМ СТАТУСОМ И ДАННЫЕ РАСШИРЕННОЙ КОЛЬПОСКОПИИ

Попова А.А.[1], Шипулина О.Ю.[1], Кравченко А.В.[1], Деулина М.О.[1], Дмитрюкова М.Ю.[1], Романюк Т.Н.[1], Зуева А.Г.[2]

[1]ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва
[2]ФГАО УВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Увеличение случаев передачи ВИЧ-инфекции при гетеросексуальных контактах привело к росту доли женщин репродуктивного возраста среди пациентов с ВИЧ-инфекцией. ВИЧ-инфицированные женщины имеют более высокий риск папилломавирусой инфекции, чем ВИЧ-негативные женщины, а также более высокий риск персистенции и малигнизации.

Цель и задачи: изучить выявления вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР) и связанной с ним патологии шейки матки (CIN) у ВИЧ-инфицированных женщин при наличии изменений по данным расширенной кольпоскопии.

Материалы и методы. Работа проводилась в период с января 2014 года по март 2016 года на базе ФНМЦ ПБ СПИД. В процессе работы было обследовано 169 пациенток с ВИЧ-инфекцией. Всем женщинам был проведен ВПЧ-ПАП-тест на основе жидкостной технологии. Для ВПЧ-тестирования – определения количества и типа вируса – использовали наборы реагентов: «АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-титр-FL» и «АмплиСенс® ВПЧ 16/18-FL» для выявления определения концентрации ВПЧ; «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-FL» для дифференцирования 12 типов ВПЧ ВКР (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59 типы). Всем 169 ВИЧ-инфицированным пациенткам была проведена расширенная кольпоскопия с использованием 3-х % раствора уксусной кислоты и 2-х % раствора Люголя.

Результаты: Среди ВИЧ-инфицированных женщин преобладали лица активного трудового возраста до 40 лет (80,47%), что подчёркивает значимость наносимого этим заболеванием социально-экономического ущерба. В результате проведения ВПЧ-ПАП-теста у 69 (40,8%) из 169 пациенток с ВИЧ-инфекцией был диагностирован ВПЧ.

У 107 (63,3%) ВИЧ-инфицированных женщин не обнаружено атипичных изменений в зоне трансформации при проведении расширенной кольпоскопии, а у 62 (36,7%) обнаружены изменения.

В группе ВИЧ-инфицированных женщин, с диагностированным ВПЧ, при проведении расширенной кольпоскопии не обнаружено атипичных изменений у 37 пациенток (53,6%), у 2 пациенток был выявлен АБЭ (2,9%), у 18 (26,1%)– АБЭ+ИН3 и у 12 пациенток (17,4%) – ИН3. В группе ВИЧ-инфицированных женщин, без вируса папилломы человека, при проведении расширенной кольпоскопии не обнаружено атипических изменений у 70 пациенток (70%), у 8 (8%)– АБЭ+ИН3 и у 22 пациенток (22%) – ИН3. При сравнении частоты отсутствия атипичных изменений в группе ВИЧ/ВПЧ+ и ВИЧ/ВПЧ- мы обнаружили статистически достоверное увеличение данных изменений у ВИЧ-инфицированных женщин без ВПЧ ($p<0,05$). При сравнении частоты выявления АБЭ+ИН3 в группе ВИЧ/ВПЧ+ и ВИЧ/ВПЧ- мы обнаружили статистически достоверное увеличение данных изменений у ВИЧ-инфицированных женщин с ВПЧ ($p<0,01$), в то время как при сравнении частоты выявления ИН3 различий не было выявлено ($p>0,05$). При этом у пациенток с выявленным при кольпоскопии АБЭ+ИН3 чаще наблюдаются изменения в ПАП-тесте, чем при наличии только АБЭ или только ИН3.

Атипичные изменения (АБЭ, АБЭ+ИН3, ИН3) при расширенной кольпоскопии у 32 ВИЧ-инфицированных женщин наблюдались при диагностированном вирусе папилломы человека и чаще всего сочетались со следующими ведущими генотипами ВПЧ: 9 (28,1%) случаев 16 генотипа, 7 (21,9%) случаев 31 генотипа, 4 (12,5%) случая 45 генотипа и 3 (9,4%) случая 18 генотипа. Намного реже

встречались в качестве ведущего генотипа 33 и 68 (по два случая). Остальные генотипы (35,51,52,56,59) встречались по одному разу. В то же время у 37 ВИЧ-инфицированных женщин отсутствие атипичных изменений при проведении расширенной кольпоскопии чаще всего сочеталось с 18 ведущим генотипом ВПЧ (6 женщин, 16,2%). При сравнении частоты выявления 16,31,18 и 45 ведущего генотипа ВПЧ различий не было выявлено между пациентками с атипичными изменениями и с отсутствием таковых по данным кольпоскопии. Детальный анализ АБЭ, АБЭ+ИН3 и ИН3 по ведущему генотипу ВПЧ нами не проводился по причине малого количества выборки.

Мы также проанализировали наличие атипичных изменений (АБЭ, АБЭ+ИН3, ИН3) при проведении расширенной кольпоскопии у 32 ВИЧ-инфицированных женщин в зависимости от количества выявленных генотипов ВПЧ. У 16 женщин (50%) был зафиксирован один генотип ВПЧ, в то время как у остальных 16 обследованных женщин было выявлено сочетание сразу нескольких генотипов вируса папилломы человека. Чаще это было сочетание 2 генотипов (8 женщин, 25%), но встречалось и сочетание трех (3 женщины, 9,4%), четырех (2 женщины, 6,2%) и шести генотипов (3 женщины, 9,4%) вируса папилломы человека. У остальных ВИЧ-инфицированных женщин с выявленным ВПЧ и отсутствием атипичных изменений при проведении расширенной кольпоскопии был зафиксирован один генотип ВПЧ у 22 женщин (59,5%), в то время как у остальных 15 обследованных женщин было выявлено сочетание сразу нескольких генотипов вируса папилломы человека. Чаще это было сочетание 2 генотипов (9 женщин, 24,3%), но встречалось и сочетание трех (2 женщины, 5,4%), четырех (3 женщины, 8,1%) и пяти генотипов (1 женщина, 2,7%) вируса папилломы человека.

Выводы. Полученные данные говорят о высоком риске прогрессирования цервикальных интраэпителиальных неоплазий при выявлении нескольких генотипов ВПЧ одновременно. Чаще всего ведущими генотипами ВПЧ при атипичных изменениях по данным расширенной кольпоскопии были 16, 31 и 45. Изменения в ПАП-тесте чаще регистрировались с выявленным при кольпоскопии АБЭ+ИН3, чем при наличии только АБЭ или только ИН3. Проведение только расширенной кольпоскопии или ПАП-теста недостаточно для определения тактики наблюдения и лечения ВИЧ-инфицированных женщин. Необходимо создание рекомендаций для проведения ВПЧ-ПАП-теста у ВИЧ-инфицированных женщин, что позволит снизить риск развития интраэпителиальных неоплазий и сохранит женское здоровье.

СКРИНИНГ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА У ЖЕНЩИН С ВПЧ-АССОЦИИРОВАННОЙ ПАТОЛОГИЕЙ ШЕЙКИ МАТКИ

Синицына О.В., Коваленко В.В., Попова А.А.

Клинический госпиталь Лапино, ГК «Мать и дитя», Москва, Россия

Введение. В последние годы в мире по данным Международного агентства по изучению рака (МАИР-IARC) наблюдается увеличение заболеваемости колоректальным раком. В мире выявляют более 1,3 млн случаев колоректального рака в год. Колоректальный рак занимает третье место в структуре общей онкологической заболеваемости и третье место в структуре женской онкологической заболеваемости, уступая только раку молочной железы. В настоящее время рак прямой и ободочной кишки трактуется совместно и наиболее часто используется термин колоректальный рак. Около 90% случаев рака прямой кишки связаны с персистированием папилломавирусной инфекции. Около 79% случаев рака прямой кишки вызваны ВПЧ 16 и 18 типа, около 8% процентов случаев наиболее вероятно связаны с персистированием вируса 31, 33, 45, 52 и 58 типа. Персистирование ВПЧ-инфекции является необходимым шагом между инфицированием, развитием поражения плоского эпителия прямой кишки и развитием рака. В среднем для развития рака требуется от 1 до 3 десятилетий. Женщины, имеющие в анамнезе заболевания шейки матки или вульвы имеют почти в 10 раз более высокий риск развития рака прямой кишки по сравнению с остальной популяцией. Иназивный рак прямой кишки так же как в случае рака шейки матки имеет несколько стадий развития, включающих преинвазивное поражение и дисплазию плоского эпителия - AIL (anal introephithelial lesion). Цитологическое исследование материала из прямой кишки - это скрининговое исследование с использованием PAP-теста для выявления поражения плоского эпителия прямой кишки (ASIL - anal squamous intriephithelial lesion), оно является наиболее предпочтительным и первичным при скрининге колоректального рака. Для оценки инфицированности пациентов ВПЧ высокого и низкого онкогенного типов рекомендовано проведение исследования на ВПЧ.

Цель исследования. Оценить пораженность колоректальным раком и дисплазией плоского эпителия анального канала в группе женщин высокого риска с ранее диагностированной ВПЧ-ассоциированной патологией шейки матки.

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 37 женщин в возрасте от 31-56 лет, проходившие обследование в различных клиниках. Пациентки были разделены на две группы – высокого и низкого риска развития ВПЧ-ассоциированного поражения плоского эпителия прямой кишки. В группу низкого риска включены пациентки, проходившие профилактический осмотр и не имевшие в анамнезе ВПЧ-ассоциированных заболеваний шейки матки. В группу высокого риска – пациентки с дисплазиями шейки матки в анамнезе. Группа высокого риска также была разбита по тяжести поражения плоского эпителия (LSIL, HSIL, cancer in situ). Средний возраст пациенток в группе высокого риска составил 37 лет, в группе низкого риска – 33 года. Все женщины в группе высокого риска имели в анамнезе дисплазию шейки матки: 44% - LSIL, 40% - HSIL, 16% - cancer in situ. Материал был получен путем взятия соскоба эпителия прямой кишки с использованием щетки Роверс и помещением ее в транспортную

виалу (BD SurePath) Цитологическое исследование проводилось методом жидкостной цитологии BD Shure Path с использованием системы автоматизированного просмотра препаратов BD FocalPoint. Выявление генотипов ВПЧ высокого онкогенного риска (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) проводилось методом гибридного захвата (HPV digene-test hybrid capture II).

Основные результаты. У 24% пациенток из группы высокого риска при цитологическом исследовании соскоба из прямой кишки было выявлено интраэпителиальное поражение эпителия прямой кишки, наиболее вероятно ассоциированное с ВПЧ-инфекцией: в 8% процентах – атипия плоского эпителия неясного значения (ASCUS), в 20% - легкая дисплазия плоского эпителия (LSIL), в то время как в группе низкого риска ВПЧ-ассоциированное поражение эпителия прямой кишки выявлено не было ни у одной пациентки. При проведении ВПЧ-тестирования на ДНК высоко-онкогенных типов (наиболее часто 16 типа) вируса папилломы человека была выявлена у 36% женщин в группе высокого риска и 24% женщин в группе низкого риска. У 16% женщин в группе высокого риска были выявлены одновременно цитологические признаки атипии плоского эпителия прямой кишки и присутствие ДНК одного или нескольких генотипов ВПЧ высокого онкогенного риска в клинически значимой концентрации. Клинический случай 1. Пациентка 1991 г.р. Диагноз LSIL, CIN I-II, в соскобах на ПЦР были выявлены ВПЧ 16 и 18 типов. Анализ на онкопротеин p16ink4a – негативный сигнал в диспластических клетках. Лечение – не проводилось. При исследовании материала прямой кишки: обнаружены клетки плоского эпителия с явлениями слабовыраженного дискариоза (ядра увеличены в размерах, контур ядерной мембраны неровный) без образования групп и скоплений. Косвенные цитологические признаки папилломавирусной инфекции в части клеток. Специфические изменения в ядре и цитоплазме (амфофилия цитоплазмы с участками просветления и уплотнения по периферии) Лейкоциты: 6-8 Микрофлора: смешанная. ВПЧ digene-тест, Hybrid Capture II Генотипы высокого онкогенного риска (16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,68) – 15,89 Отн. Ед. (Положительно) Клинический случай 2. Пациентка, 1974г. р. Диагноз LSIL, CIN I-II, в соскобах на ПЦР – ВПЧ 16 типа. Анализ на онкопротеин p16ink4a – негативный сигнал в диспластических клетках. Лечение – аллокин, виферон, промисан, эпиген. При исследовании материала прямой кишки: В препарате обнаружены клетки многослойного плоского эпителия поверхностных и промежуточных слоев, значительное количество безъядерных чешуек плоского эпителия в скоплениях и разрозненно. Определяется небольшое количество клеток плоского эпителия с атипией неясного значения – укрупненными ядрами неправильной формы. Ввиду дегенеративных изменений части клеток, судить о процессе уверенно не предоставляется возможным. Косвенные цитологические признаки папилломавирусной инфекции в части клеток. Специфические изменения в ядре и цитоплазме (амфофилия цитоплазмы с участками просветления и уплотнения по периферии) Лейкоциты: 6-8 Микрофлора: смешанная с преобладанием кокков. Генотипы высокого онкогенного риска (16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,68) – 2,03 Отн. Ед. (Положительно)

Выводы. Мы обнаружили, что вероятность возникновения интраэпителиального поражения прямой кишки значительно выше у женщин с ВПЧ-ассоциированной патологией шейки матки, такие пациентки находятся в группе высокого риска развития рака прямой кишки и должны подвергаться регулярному обследованию. В этой группе ДНК ВПЧ высокого онкогенного типа определяется в 36% случаев. В то же время обнаружение генотипов ВПЧ высокого онкогенного типа в 24% случаев в группе пациенток низкого риска говорит о необходимости проведения скрининга рака прямой кишки с использованием метода жидкостной цитологии BD ShurePath Pap-test и определение генотипов ВПЧ высокого онкогенного риска методом гибридного захвата ВПЧ digene-тест, Hybrid Capture II Technology вне зависимости от наличия у пациентки в анамнезе ВПЧ-асоциированного поражения эпителия шейки матки.

ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ЦЕРВИКАЛЬНЫХ ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ НЕОПЛАЗИЙ И ИНВАЗИВНОГО РАКА ШЕЙКИ МАТКИ ПАЦИЕНТОВ МЕДИЦИНСКОГО ЦЕНТРА Г. ОБНИНСКА КАЛУЖСКОЙ ОБЛАСТИ

Киселева В.И., Мкртчян Л.С., Любина Л.В., Безяева Г.П., Панарина Л.В., Замулаева И.А., Крикунова Л.И.

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМРИЦ» Минздрава России, Обнинск, Россия

Введение. В настоящее время считается признанным, что персистенция вируса папилломы человека (ВПЧ) высокого кацерогенного риска (ВКР) является необходимым условием для трансформации нормального цервикального эпителия в неоплазии высокой степени тяжести и последующего прогрессирования в инвазивный рак шейки матки (РШМ). Сведения о типоспецифическом распределении ВПЧ ВКР среди пациентов с цервикальными интраэпителиальными неоплазиями (CIN) и с инвазивным РШМ важны для понимания особенностей течения цервикальных патологий индуцированных ВПЧ различных генотипов ВКР. Кроме того, эта информация может быть полезна для совершенствования профилактики этих заболеваний.

Несмотря на многочисленные исследования, посвященные этому вопросу, проведенные в различных странах на больших когортах пациентов, они остаются актуальными до сегодняшнего дня [Ogembo R.K. et al., 2015; Kietpeerkool C. Et al., 2015]

Целью настоящей работы явилось сравнение частоты встречаемости различных генотипов ВПЧ ВКР в группах больных с CIN и инвазивным РШМ Медицинского радиологического центра г. Обнинска, Калужской области.

Материал и методы. Исследуемую группу составили первичные больные с CIN различной степени тяжести и инвазивным РШМ, в основном, жители Калужской области и близлежащих регионов Московской области, проходившие обследование и/или лечение на базе отделения лучевых и комбинированных методов лечения гинекологических заболеваний МРНЦ им. А.Ф. Цыба. У всех пациенток диагноз был верифицирован морфологически. У больных до начала лечения цитощеткой брали соскобы из цервикального канала и с наружной поверхности ШМ. Полученный биологический материал исследовали на наличие и типовую принадлежность ДНК ВПЧ 12 генотипов высокого канцерогенного риска (ВКР) методом полимеразной реакции (ПЦР) в режиме реального времени на амплификаторе "Rotor Gene" ("Corbett Research"). В работе использовали комплекты реагентов «ДНК-сорб АМ», «АмплиСенс ВПЧ ВКР–скрин EPh» и «АмплиСенс ВПЧ ВКР-генотип FL» (ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора России).

Результаты. Пациентки с ВПЧ ВКР-положительными CIN и инвазивным РШМ представлены сравнимыми по численности группами – 155 и 181 человек соответственно (таблица 1). Подавляющее большинство среди цервикальных интраэпителиальных неоплазий составляют CIN III (71,6%), объединяющие дисплазию тяжелой степени (25%) и рак *in situ* (75%). Инвазивный РШМ более чем в 91% случаев представлен плоскоклеточным (16,9% - ороговевающий, 76,9% - неороговевающий и 6,2% - недифференцированный), и примерно в 9% случаев – аденокарциномами (Ак). Инфицирование одним типом ВПЧ (моноинфекция) у женщин с CIN выявлено в 78,7% случаев и несколькими типами вируса одновременно (множественная инфекция) соответственно в 21,3% случаев. При этом среди моноинфекции отмечено преобладание 16, 31 и 33 типов (54,2; 5,8; 5,8%). Реже встречаются ВПЧ 18, 45, 35 и 58 (3,2; 3,9; 1,9; 1,9%), ВПЧ 39, 52 и 56 типа выявлена в единичных случаях, а вирусы 59 и 66 типа обнаружены в трех случаях только в составе множественной инфекции.

При инвазивном РШМ распределение по типам вируса иное. В составе моноинфекции преобладает ВПЧ 16, 18 и 45 типа (59,7; 12,2; 7,7%). ВПЧ 31 и 33 типа встречается в 5,3 и 1,8 раза реже соответственно, а ВПЧ 39 – в 3,6 раза чаще, причем у одной пациентки 62 лет с плоскоклеточным неороговевающим РШМ вирус полностью интегрирован в клетку-хозяина. ВПЧ 59 типа, который не выявлен в группе с CIN, при инвазивном РШМ обнаружен у трех человек (у одной 44-летней больной – это Ак со 100%-ной интеграцией вируса). Множественная инфекция при инвазивном РШМ встречается более чем в два раза реже, чем при CIN/

Частота встречаемости ВПЧ 16/18/45 типов при инвазивном РШМ в 1,1/3,8/2,0 раза выше, чем при CIN, что хорошо согласуется с данными, полученными на архивном материале большой когорты больных (6000 человек) 17 стран Европы (1,1/3,5/2,5 соответственно) [Tjialma W.A. et al., 2012]. Однако в нашем случае 16, 18 и 45 генотип ВПЧ преобладает как при плоскоклеточном раке (62,4; 8,5 и 7,3%), так и при аденокарциноме (31,2; 50,0 и 12,5%). В европейских странах при плоскоклеточном раке чаще встречается 16, 18 и 33 папиллома (66,2; 10,8 и 5,3%), а при Ак – 16, 18 и 45 (54,2; 40,4 и 8,3%) соответственно.

Средний возраст пациенток в объединенной группе с CIN II+III, ассоциированных с ВПЧ16, соответствует 37 лет, в группе с инвазивным РШМ – 47 лет, т.е. между заболеванием CIN и инвазивным РШМ может пройти по меньшей мере 10 лет. У пациенток, инфицированных ВПЧ18, в аналогичных группах сравнения средний возраст составляет 41 и 43 г, в у ВПЧ45-инфицированных больных – 44 и 42 г соответственно.

Вирусы 16, 18 и 45 типов в 100%-интегрированном состоянии встречаются при CIN в 8,3; 40,0 и 33,0% случаев, а при инвазивном РШМ в 26,9; 40,0 и 42,9% случаев соответственно.

Выводы. В соответствии с полученными данными наиболее агрессивными генотипами ВПЧ ВКР являются

Таблица 1. Распределение ВПЧ ВКР среди больных с CIN различной степени тяжести и инвазивным РШМ

Заболевание / ВПЧ-тип	Цервикальные интраэпителиальные неоплазии				Инвазивный РШМ		
	Все CIN n=155	**CIN I n=9**	**CIN II n=35**	**CIN III n=111**	**Все РШМ n=181**	**Плоскоклет. n=165**	**Аденокарцин. n=16**
16	84 (54,2%)	6 (66,7%)	20 (57,1%)	58 (52,3%)	108 (59,7)	103 (62,4%)	5 (31,2%)
18	5 (3,2%)	1 (11,1%)	1 (2,9%)	3 (2,7%)	22 (12,2%)	14 (8,5%)	8 (50,0%)
45	6 (3,9%)	-	1 (2,9%)	5 (4,5%)	14 (7,7%)	12 (7,3%)	2 (12,5%)
31	9 (5,8%)	-	1 (2,9%)	8 (7,2%)	2 (1,1%)	2 (1,2%)	-

Заболевание / ВПЧ-тип	Цервикальные интраэпителиальные неоплазии				Инвазивный РШМ		
	Все CIN n=155	**CIN I n=9**	**CIN II n=35**	**CIN III n=111**	**Все РШМ n=181**	**Плоскоклет. n=165**	**Аденокарцин. n=16**
33	9 (5,8%)	1 (11,1%)	3 (8,9%)	5 (4,5%)	6 (3,3%)	6 (3,6)	-
35	3 (1,9%)	-	-	3 (2,7%)	3 (1,7)	3 (1,8%)	-
39	1 (0,6%)	-	1 (2,9%)	-	4 (2,2%)	4 (2,4%)	-
52	1 (0,6%)	-	-	1 (0,9%)	1 (0,6%)	1 (0,6%)	-
56	1 (0,6%)	-	-	1 (0,9%)	-	-	-
58	3 (1,9%)	-	1 (2,9%)	2 (1,8%)	1 (0,6%)	1 (0,6%)	-
59	-	-	-	-	3 (1,7)	2 (1,2%)	1 (6,3%)
Множеств. инфекция	33 (21,3%)	1 (11,1%)	7 (20,0%)	25 (22,5%)	17 (9,4%)	17 (10,3%)	-

16, 18 и 45, а среди них наиболее высоким канцерогенным потенциалом обладают папилломы 18 и 45 типа. Об этом свидетельствует: 1 - более высокая частота встречаемости этих вирусов при инвазивном РШМ по сравнению с CIN, статистически значимая для ВПЧ18 (p=0,002) и на уровне выраженной тенденции для ВПЧ45 (p=0,1); 2 – практически полное отсутствие возрастного коридора между больными с тяжелыми дисплазиями и инвазивным РШМ; 3 – высокая частота интегрированной формы этих вирусов как при CIN II+III, так и при инвазивном РШМ.

Сравнение результатов настоящего исследования с аналогичными европейскими дает основание полагать, что распространение ВПЧ ВКР инфекции при CIN и последующее ВПЧ-типоспецифическое прогрессирование этих заболеваний в инвазивный РШМ являются географически детерминированными. Однако окончательные выводы делать рано, поскольку сравниваемые группы исследования сильно различаются по численности.

В заключение следует отметить, что в нашей стране проводится профилактика РШМ с использованием вакцины против ВПЧ16/18, а, возможно, уже следует обратить внимание и на ВПЧ 45 типа.

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВСТРЕЧАЕМОСТИ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА У ПАЦИЕНТОВ РАЗЛИЧНОЙ ВОЗРАСТНОЙ КАТЕГОРИИ, ОБСЛЕДОВАННЫХ НА БАЗЕ СЕТИ КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЙ «ОЛИМП» В РЕСПУБЛИКЕ КАЗАХСТАН ЗА 2015-2016 ГГ.

Сулейменов Е.М., Балась А.Н., Кретова И.А., Усенова О.П., Левина И.А.

Сеть клинико-диагностических лабораторий «ОЛИМП», Астана, Казахстан

Введение. На сегодняшний день вирус папилломы человека (ВПЧ) является одной из наиболее распространенных вирусных инфекций половых путей у лиц фертильного возраста. Число инфицированных людей в мире за последнее десятилетие увеличилось более чем в 10 раз. Одним из путей передачи ВПЧ является половой, но для инфицирования вирусом не обязателен полный половой контакт. Большинство женщин и мужчин, активно живущих половой жизнью приобретают инфекцию в любой момент своей жизни, а некоторые могут быть повторно инфицированы. Доказано, что пиковый период инфицирования независимо от гендерного различия на-

чинается сразу после того, как они становятся сексуально активными.

Известны около 130 штаммов ВПЧ, большая часть из них вызывает развитие бородавок, папиллом, кондилом, и почти 40 – заболевания половых органов и анального отверстия. Однако наиболее опасны онкогенные типы, которые могут провоцировать злокачественные новообразования шейки матки и полового члена.

Вопрос о распространённости ВПЧ высокого канцерогенного риска на территории Республики Казахстан является актуальным и требует проведения широкомасштабных лабораторных исследований.

Цель и задачи. Изучение эпидемиологической характеристики встречаемости и распространенности инфекции, вызванной вирусом папилломы человека, у пациентов от 18 до 45 лет, обследованных на базе сети клинико-диагностических лабораторий «ОЛИМП» в Республике Казахстан.

Материалы и методы. Работа основана на анализе результатов исследований у 40366 пациентов в возрасте от 18 до 45 лет, с предположительным инфицированием ВПЧ, из них 37705 пациентов женского пола и 2661 пациентов мужского пола. В работе были изучены следующие генотипы ВПЧ высокого канцерогенного риска: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68.

Диагностика папилломавирусной инфекции высокого канцерогенного риска проводилась методом ПЦР в режиме реального времени. Работа проводилась на амплификаторе Rotor-Gene Q (QIAGEN) и адаптированных к нему наборах реагентов торговой марки АмплиСенс производства ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, РФ: «АмплиСенс® ВПЧ 16/18-FL», "АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-FL", "АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-титр-FL". Методика основана на одновременной амплификации участков ДНК ВПЧ и участка β–глобинового гена, используемого в качестве эндогенного внутреннего контроля.

Для проведения анализа использовались образцы эпителия из цервикального канала у женщин, и уретры у мужчин, обратившихся в сеть КДЛ «ОЛИМП».

Основные результаты. В нашем исследовании была изучена встречаемость и распространенность 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 типов ВПЧ у пациентов различной возрастной категории, обследованных на базе КДЛ «ОЛИМП» в Республике Казахстан за 2015-2016 гг.

По результатам наших исследований было установлено, что на территории Республики Казахстан наиболее распространенными являются 16 и 18 типы ВПЧ. При этом 16 тип выявлен у 3801 пациентов, а 18 тип у 1383, что составило 40,6% и 14,8% соответственно, от общего числа положительных образцов. Остальные генотипы вошли в диапазон от 4,9% до 0,7% в порядке убывания: 31, 52, 51 , 39, 56, 58, 45, 35, 59, 33, 68, 66.

Таким образом, сделан вывод, что у каждого 11 пациента выявлялся 16 тип, а у 29 - 18 тип.

Отмечено, что пациентов женского пола, проходящих обследование на выявление ВПЧ, значительно больше мужского пола и составляет 93,4%. Выявляемость различных типов ВПЧ также выше у женщин и составляет 94,5% случаев.

Наиболее часто у женщин встречаются 16 и 18 типы и составляют 41% и 14,6% соответственно, от общего числа положительных женских образцов. Остальные генотипы вошли в диапазон от 5% до 0,6% в том же порядке убывания, как и в общей группе пациентов: 31, 52, 51 , 39, 56, 58, 45, 35, 59, 33, 68, 66. В результате, если считать от числа всех обследованных пациентов женского пола на наличие 16 и 18 генотипов, то примерно у каждой 10 женщины выявлялся 16 генотип, а у каждой 28- 18генотип.

У обследованных мужчин выявлены также наиболее часто встречающиеся генотипы 16 и 18, составляющие 34,7% и 18% соответственно, от общего числа положительных мужских образцов. Остальные генотипы вошли в диапазон от 7,6% до 1,6% в следующем порядке убывания: 52, 51 , 39, 31, 59, 66, 33, 35, 45, 56, 58, 68. В результате, если считать от числа всех обследованных пациентов мужского пола на наличие 16 и 18 генотипов, то примерно у каждого 15 мужчины выявлялся 16 генотип, а у 29 - 18 генотип.

Выводы. Таким образом, 16 генотип ВПЧ по встречаемости у обследованных пациентов занимает лидирующую позицию. На втором месте по частоте встречаемости находится 18 генотип и в разном проценте случаев встречаются все другие определяемые типы ВПЧ. Третье место в мужской и женской группы пациентов разделилось, в женской преимущественно определялся 31 генотип, а в мужской 52 тип. Согласно данным мировых исследований, наиболее доминирующими типами являются 16, 18, 31, 45. Наши данные по женской группе получились аналогичными, тогда как в мужской группе помимо 16 и 18 типов чаще других выявлялся 52 генотип. В связи с этим при диагностике ВПЧ высокого онкогенного риска рекомендуется не останавливаться только на выявлении наиболее часто встречающихся 16 и 18 типов, но и обследовать на другие генотипы, персистенция которых в организме не менее опасна.

Список использованной литературы:

1. Куевда Д., Сафонова А., Пиксасова О., Шипулина О. Результаты апробации ВПЧ-тестированияв программе цервикального скрининга в Москве //Молекулярная диагностика, 2007. Т. 3. С. 127–129.

2. Видяева И.Г., Уразова Л.Н., Писарева Л.Фи др. Частота выявления вируса папилломы человека высокого онкогенного риска у женщин репродуктивного возраста республики Тыва // Бюл. СО РАМН. – 2008. – № 3 (131) – С. 13–17.

3. Buys S.S., Partridge E., Black A., Johnson C.C., Lamerato L., Isaacs C. et al. Effect of screening on ovarian cancer mortality: the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Randomized Controlled Trial. // JAMA – 2011. - №305.- p. 2295–2303.

4. Jacobs I.J., Menon U., Ryan A., Gentry-Maharaj A., Burnell M., Kalsi J.K. et al. Ovarian cancer screening and mortality in the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS): a randomised controlled trial. //Lancet - 2016. - №387. – p.945–956.

5. Barrett J., Jenkins V., Farewell V., Menon U., Jacobs I., Kilkerr J. et al. Psychological morbidity associated with ovarian cancer screening: results from more than 23,000 women in the randomised trial of ovarian cancer screening (UKCTOCS) //BJOG. – 2014. - №121. – p.1071–1079.

ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ НАЛИЧИЯ ИНТЕГРАЦИИ ВПЧ 16 ПРИ ЦЕРВИКАЛЬНЫХ ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ НЕОПЛАЗИЯХ

Киселева В.И.[1], Мкртчян Л.С.[1], Любина Л.В.[1], Безяева Г.П.[1], Панарина Л.В.[1], Замулаева И.А.[1], Шипулина О.Ю.[2], Крикунова Л.И.[1]

[1] Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМРИЦ» Минздрава России, Обнинск, Россия

[2] ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение. В настоящее время считается общепризнанным, что обнаружение вируса папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска (ВКР) и анализ его маркеров дает существенное преимущество врачу при оценке риска возникновения предраковой патологии шейки матки – цервикальных интраэпителиальных неоплазий различной степени тяжести (CIN I-III). Однако основой вторичной профилактики рака шейки матки (РШМ) является не только ранняя диагностика предраковых заболеваний, но и адекватное их лечение. Особенно это актуально при начальных формах цервикальных интраэпителиальных неоплазий, так как могут предлагаться неравнозначные тактические подходы к ведению больных в зависимости от прогноза заболевания: при CIN I - наблюдение или лечение, а при CIN II - аблация или эксцизия.

Цель и задачи. В этой связи представляло интерес возможность использования такого критерия как наличие интеграции ДНК ВПЧ в клетку-хозяина у пациенток с уже состоявшимся CIN в качестве маркера для прогноза заболевания и выбора оптимальной тактики лечения больного.

Материал и методы. Исследуемую группу составили первичные больные с цервикальной интраэпителиальной неоплазией различной степени тяжести (CIN I-III) и инвазивным раком шейки матки (РШМ), проходившие обследование и/или лечение на базе отделения лучевых и комбинированных методов лечения гинекологических заболеваний МРНЦ им. А.Ф. Цыба. У всех пациенток диагноз был верифицирован морфологически.

У больных до начала лечения цитощеткой брали соскобы из цервикального канала и с наружной поверхности шейки матки. Полученный биологический материал исследовали на наличие и типовую принадлежность ДНК ВПЧ 12 генотипов высокого канцерогенного риска (ВКР) методом полимеразной реакции (ПЦР) в режиме реального времени на амплификаторе "Rotor Gene" ("Corbett Research"). В работе использовали комплекты реагентов «ДНК-сорб АМ», «АмплиСенс ВПЧ ВКР–скрин EPh» и «АмплиСенс ВПЧ ВКР-генотип FL» (ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора России). Для дальнейшего исследования были отобраны образцы, в которых обнаружен ВПЧ 16 типа (124 с CIN и 137 человек с инвазивным РШМ). В этих образцах определяли количественную нагрузку и физический статус вируса (эписомальная или частично/полностью интегрированная форма) с использованием набора реагентов для амплификации участков вирусных генов E2 и E7 и клеточного гена β-глобина методом мультиплекс-ПЦР в режиме реального времени.

Дизайн исследования был организован по принципу «case-control». Статистическую обработку результатов проводили в соответствии с критериями Фишера и χ^2 (пакет программ "Statistica-6"), величину и доверительный интервал OR (относительный шанс возникновения инвазивного РШМ у больных CIN) рассчитывали в соответствии с алгоритмом, приведенным в книге [Реброва О.Ю., 20061], AUC (интегральный показатель прогностической эффективности маркера), PPV и NPV (положительный и отрицательный предикторы маркера) – в соответствии с алгоритмами [Рубанович А.В., 2013].

Результаты. В предыдущих наших исследованиях [Киселева В.И. и др., 2014] при изучении физического статуса ВПЧ16 было показано, что доля интегрированной формы вируса (полностью или частично) несколько выше при РШМ по сравнению с CIN, однако из-за немногочисленности выборки различия оказались статистически незначимы (p=0,35). Накопленный к настоящему времени материал позволил продолжить исследование.

Вирус 16 типа выявлен у 124 больных с цервикальными интраэпителиальными неоплазиями различной степени тяжести и у 137 – с инвазивным РШМ. В связи с недостаточным количеством больных с CIN I (7 человек), эта группа была исключена из дальнейшего анализа. Частота встречаемости интегрированной формы ВПЧ16 среди всех пациенток с цервикальными неоплазиями различной степени тяжести в 2,2 раза ниже, чем при инвазивном РШМ с очень высоким уровнем значимости по критерию χ^2 (p=0,0000). Относительный шанс (OR) прогрессирования CIN в РШМ при наличии такого маркера возрастает почти в четыре раза. По мере возрастания тяжести заболевания у пациенток повышается и частота интегрированной формы вируса. При этом в группе с CIN II преобладает частичная интеграция вируса (менее 50%). По мере перехода к CIN III и далее к инвазивному РШМ увеличивается доля пациенток с полной интеграцией вирусной ДНК в клеточный геном, а при частичной интеграции - с долей интегрированной ДНК - более 50%.

Статистический анализ полученных данных свидетельствуют о том, что интеграция ВПЧ16 повышает относительный шанс (OR) возникновения инвазивного РШМ у больных с цервикальной интраэпителиальной неоплазией II степени в 5,7 раза (уровень значимости по двустороннему критерию Фишера очень высок) (таблица 1). При этом AUC - прогностическая эффективность этого вирусного маркера - интегральный показатель, объединяющий такие его характеристики как чувствительность и специфичность, соответствует 0,7. В целом все эти показатели, если не считать недостаточно высокой частоты маркера в группе с CIN II – менее 30%, характеризуют наличие интеграции при CIN II как маркер, очень близкий к статусу хорошего «маркера-классификатора». Величина положительного предиктора PPV – вероятность прогрессирования заболевания CIN II при наличии интегра-

ции вируса соответствует 92%. В то же время величина отрицательного предиктора NPV – низкая, чуть выше 33%. Т.е. отсутствие интеграции вируса не исключает неблагоприятного исхода CIN II. И ответственным за это могут быть, в частности, какие-либо другие вирусные показатели. При CIN III значение таких показателей, как OR и AUC уменьшается.

Выводы. Таким образом, в соответствии с полученными данными можно полагать, что интеграция ДНК ВПЧ16 в клеточный геном (полная или частичная) вносит определенный вклад в прогноз течения заболевания CIN II, и этот вирусный маркер может быть полезным для выбора индивидуальной тактики лечения. По мере прогрессирования заболевания вклад вирусного маркера - наличия интеграции - в прогноз дальнейшего развития процесса снижается. Определяющее значение в этом случае, скорее всего, имеет степень морфологического изменения клеток. Что касается CIN I, в этом случае требуется накопление дополнительного материала и проведения соответствующего анализа

В заключении считаем необходимым вновь подчеркнуть необходимость появления доступных коммерческих наборов для выявления интеграции вируса в клетку (полной или частичной), хотя бы для ВПЧ 16, 18 и 45 типа, персистенция которых чаще других приводит к гиперпролиферативным заболеваниям ШМ.

Таблица 1. Характеристика прогностической эффективности наличия интеграции ДНК ВПЧ16 в клеточный геном

Заболевание и кол-во больных	Относительный шанс возникновения РШМ OR	Доверительный интервал	Уровень значимости		AUC
			по 2х критерию Фишера	по критерию X^2	
Все CIN n = 124	3.83		-	0.0000	0.66
CIN II n = 35	5,7	2,6; 17,4	0,0000	-	0,70
CIN III n = 82	3,2	1,8; 5,7	-	0,0001	0,64

МНОГОФАКТОРНЫЙ РЕГРЕССИОННЫЙ АНАЛИЗ В ПРОГНОЗЕ РАЗВИТИЯ ЦЕРВИКАЛЬНЫХ ПОРАЖЕНИЙ ИНФЕКЦИОННОГО ГЕНЕЗА

Андосова Л.Д., Конторщикова Л.Д., Шахова К.А.

ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная медицинская академия», Нижний Новгород, Россия

В настоящее время имеется достаточно данных, подтверждающих причинную связь между папилломавирусной инфекцией (ПВИ) и предраковыми заболеваниями шейки матки, однако, механизмы, определяющие характер и течение патологического процесса, риск развития злокачественной трансформации цервикального эпителия, критерии прогрессии полностью не изучены. Плоскоклеточные интраэпителиальные ВПЧ обусловленные поражения высокой степени, рак шейки матки возникают на фоне взаимосвязанных процессов, в большинстве случаев протекающих в течение многих лет. При постоянном носительстве вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР) сначала возникают плоскоклеточные интраэпителиальные поражения низкой (LSIL), затем высокой (HSIL) степени и, наконец, рак шейки матки (РШМ). Данные об особенностях этиопатогенеза заболеваний шейки матки при ПВИ свидетельствуют о возможности предотвращения прогрессирования заболевания при условии своевременного обнаружения предраковых заболеваний. **Целью** исследования было выделить при помощи бинарной логистической регрессии молекулярно-биологические и иммунологические лабораторные показатели позволяющие определить риск прогрессии ВПЧ-ассоциированных цервикальных поражений. **Материалы и методы.** Согласно задаче исследования был применен статистический метод бинарной логистической регрессии. Бинарная логистическая регрессия – это разновидность множественной регрессии, общее назначение которой состоит в анализе связи между несколькими независимыми переменными (называемыми также регрессорами или предикторами) и зависимой переменной. С помощью логистической регрессии можно оценить вероятность того, что событие наступит для конкретного испытуемого (больной /здоровый, риск /отсутствие риска и др.). Для исследования в результате целенаправленного отбора под наблюдение были взяты женщины с патологическими, невоспалительными процессами шейки матки, обусловленными ПВИ, средний возраст которых составил 35,1±1,5 года. По результатам цитоморфологического исследования выборочная совокупность составила 290 женщин, которые представили основную группу обследуемых: латентная форма ПВИ – 32 пациентки, группа 1; факультативные заболевания шейки матки – 64 (эктопии), группа 2; плоскоклеточные интраэпителиальные поражения низкой степени (LSIL) – 62, группа 3; пло-

скоклеточные интраэпителиальные поражения высокой степени (HSIL) – 94 женщины, группа 4; рак шейки матки – 38 больных, группа 5. Всем женщинам были выполнены лабораторные анализы включающие исследования на ВПЧ ВКР с определением вирусной нагрузки, генотипирования и статуса вируса (эписомальная или интегративная формы ПВИ), изучение состояния микробиоценоза урогенитального тракта, показателей локального иммунитета (интерфероны, цитокины). Материалом для исследования были соскобы эпителиальных клеток из влагалища, цервикального канала шейки матки. Для выявления и количественного определения ДНК ВПЧ использовали наборы фирмы «Интерлабсервис», г.Москва (Россия) (тест-система «Ампли Сенс ВПЧ ВКР генотип-FI», «Ампли Сенс ВПЧ ВКР скринтитр-FI»). Для проведения ПЦР-анализа использовали следующие амплификаторы: детектирующий ДТ-96 ООО «НПО ДНК-Технология» (Россия), iQ5 Bio-RAD (США). Определение онкобелка Е7 ВПЧ 16 и 18 типов проводилось с применением набора реагентов для выявления – «Е7-ВПЧ-16/18-Диагност» производства ОАО «Биомед» им. И.И. Мечникова (Россия). Иммуноцитохимическое исследование выполнено при помощи наборов Cintec «Цитология» компании «Биолайн» эксклюзивного дистрибьютора компании MTM laboratories AG (Германия). Для оценки локальных иммунологических нарушений у женщин исследовалась цервикальная слизь, выполнено определение цитокинов: ИНФα, ИНФγ, ИЛ18, ИЛ10, ТФРβ. Количественное исследование цитокинов ИЛ18 и ИЛ10 проводилось иммуноферментным методом с использованием тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (Россия), определение трансформирующего фактора роста бета-1 (ТФРβ) с использованием набора компании DRG, DRGELISA-TGFβ1 (Германия). Количественное определение интерферонов проводилось с использованием иммуноферментных наборов Bender Med Systems (США). В наборах для измерения уровня цитокинов и интерферонов применялся твердофазный иммуноферментный метод и аппарат «Expert+» (Австрия). Исследование биоценоза влагалища проводили методом ПЦР с использованием реагентов Фемофлор ООО «НПО ДНК-Технология», (Россия). При помощи специализированного программного обеспечения рассчитывали количество общей бактериальной массы, лактобацилл и различных групп условно-патогенных микроорганизмов. Полученные результаты были обработаны общепринятыми методами вариационной статистики с использованием пакета статистических программ Statistica for Windows 6.0. **Результаты и обсуждение.** С помощью применения статистического метода бинарной логистической регрессии было показано, что высокой прогностической значимостью развития плоскоклеточных интраэпителиальных поражений низкой (LSIL) и высокой степени (HSIL) обладают лабораторные показатели p16 и E7. Набор этих тестов позволяет правильно предсказать 91,0% заключений плоскоклеточных интраэпителиальных поражений высокой степени (HSIL), РШМ, в среднем по плоскоклеточным интраэпителиальным поражениям 84,0% правильных предсказаний. Для данных переменных характерна высокая значимость влияния на зависимую переменную ($p < 0,0001$). При исключении из оценки признаков p16 и E7 высокую значимость приобретают следующие тесты: генотип вируса 16 типа, состояние вагинального микробиоценоза с учетом сохранности нормофлоры (лактобактерии). Набор из этих переменных позволяет правильно предсказать 89,4% заключений плоскоклеточных интраэпителиальных поражений высокой степени (HSIL), РШМ, в среднем по плоскоклеточным интраэпителиальным поражениям 78,4% правильных предсказаний. Для признака генотип ВПЧ 16 типа характерна высокая значимость влияния на зависимую переменную ($p < 0,0001$). Необходимо отметить высокую прогностическую значимость ТФР-β. Данный иммунологический признак позволяет правильно прогнозировать 91,4% заключений по плоскоклеточным интраэпителиальным поражениям низкой степени (LSIL) и 85,4% диагнозов плоскоклеточных интраэпителиальных поражений высокой степени (HSIL) и РШМ, в среднем 87,9% правильных предсказаний. При прогнозировании ВПЧ-обусловленных плоскоклеточных интраэпителиальных поражений значение имеют ИЛ-10, генотип вируса 51, вирусная нагрузка, условно-патогенные микроорганизмы (Atopobium vaginae), в среднем 78,0% правильных предсказаний. Значимое влияние на независимую переменную имеют ИЛ-10 ($p < 0,001$) и вирусная нагрузка ($p < 0,05$). Для остальных переменных влияние не значимо, они увеличивают процент правильных предсказаний. **Выводы.** Определены молекулярно-биологические и иммунологические лабораторные показатели: онкопротеины Е7, p16, дисбиоз вагинального биотопа, трансформирующий фактор роста β, интерлейкин 10, дающие возможность прогнозировать ВПЧ-обусловленные плоскоклеточные интраэпителиальные цервикальные поражения, что свидетельствует об актуальности клинико-лабораторных тестов в оценке ВПЧ-обусловленных заболеваний шейки матки и получении новых знаний о патогенетических аспектах папилломавирусной инфекции.

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ЦЕРВИКАЛЬНОГО СКРИНИНГА ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ЖЕНЩИН В МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ В 2016 ГОДУ

Подчуфарова Д.Е.[1], Лебедева Н.Н.[1], Оводова Ю.В.[1], Енаева М.В.[2], Серков И.Л.[1], Пронин А.Ю.[1]

[1] ГКУЗ МО «Московский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», Москва, Россия

[2] ГБУЗ МО «Московский областной перинатальный центр», Балашиха, Россия

Вирусы папилломы человека (ВПЧ) являются основной причиной развития рака шейки матки. Женщины, живущие с ВИЧ, подвергаются большему риску прогрессии папилломавирусной инфекции и развития интраэпителиальных неоплазий, а также рака шейки матки, чем неинфицированные.

Целью настоящей работы явился анализ результатов цервикального онкологического скрининга, проводимого среди ВИЧ-инфицированных пациенток ГКУЗ МО «Московский областной центр по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями» (далее – Центр СПИД) для выявления и предупреждения развития патологий шейки матки, вызванных инфицированием онкогенными типами вирусов папилломы человека. Исследование проводилось в клинико-диагностической лаборатории Центра СПИД и в лаборатории ГКУЗ МО «Московский областной перинатальный центр» (далее – Перинатальный центр).

Материалы и методы. Объектом исследования послужила группа ВИЧ-инфицированных женщин, наблюдающихся в Центре СПИД. Обследование включало выполнение цитологического исследования соскоба клеток шейки матки и ПЦР-теста для определения ДНК ВПЧ высокого онкогенного риска, позволяющего выявлять потенциально опасные случаи вирусной инфекции. Материал для исследования помещался в специальные контейнеры (виалы) со стабилизирующим раствором, который дает возможность проводить цитологическое исследование и ПЦР из одного флакона. Цитологическое исследование проводилось с помощью метода жидкостной цитологии образцов, окрашенных по Папаниколау по технологии BD SurePath™ (Becton, Dickinson and Company, США). Результаты жидкостной цитологии оценивались по системе Бетесда последнего пересмотра (2001 г). ПЦР анализ проводился с использованием тест-системы Abbott RealTime High-Risk HPV на платформе Abbott RealTime (Abbott Laboratories, США). Информирование пациенток Центра СПИД о возможности прохождения цервикального скрининга осуществлялось с помощью специально разработанных информационных постеров и брошюр карманного формата, где в доступной форме были изложены данные о раке шейки матки, необходимости прохождения регулярного обследования и преимуществах раннего выявления патологических изменений в шейке матки. Аналогичная информация была размещена на сайте центра (www.hivmo.ru).

Результаты и обсуждения. Было обследовано 618 ВИЧ-инфицированных женщин в возрасте от 19 до 62 лет, средний возраст участниц составил 33,2 года.

При проведении цитологического исследования у 178 (28,8%) из 617 пациенток были выявлены патологические изменения шейки матки разной степени выраженности, которые распределились следующим образом:

— У 67 (37,7%) пациенток выявлены атипичные клетки плоского эпителия неопределенного генеза (ASC-US). Найденные изменения трудно дифференцировать между реактивными изменениями эпителия и дисплазией, однако у 45 (67,2%) из них был обнаружен ВПЧ высокого онкогенного риска.

— У 12 (6,7%) пациенток выявлены клетки плоского эпителия неопределенного генеза, не позволяющие исключать плоскоклеточные интраэпителиальные поражения высокой степени (ASC-H). У 3-х из них обнаружен ВПЧ 16 типа, по одному случаю - 16 тип в комбинации с 18 и 16 тип в комбинации с другими типами ВПЧ, еще у 3 женщин были выявлены другие генотипы ВПЧ высокого онкогенного риска. В дальнейшем, этим женщинам рекомендовано проведение кольпоскопии и контрольное цитологическое и ПЦР-исследование через 6 месяцев. В оставшихся 4-х случаях ДНК ВПЧ обнаружено не было.

— У 81 (45,5%) женщины были диагностированы плоскоклеточные интраэпителиальные поражения низкой степени (L-SIL). 68 (84%) из них были инфицированы ВПЧ;

— У 15 (8,4%) женщин диагностированы плоскоклеточные интраэпителиальные поражения высокой степени (H-SIL). Все они оказались инфицированы ВПЧ высокого онкогенного риска: 8 из них – 16 типом, у 5 были обнаружены 16 или 18 в комбинации с другими типами ВПЧ, и 2 случая пришлось на другие типы вируса. В этих случаях показана кольпоскопия и прицельная биопсия, по результатам которой принимается решение о выборе метода лечения.

— У трех пациенток (1,7%) были обнаружены атипичные железистые клетки, похожие на неопластические (AGC), причем у одной из них ВПЧ отсутствовал.

Ни у одной женщины рак шейки матки выявлен не был.

24 женщинам провести скрининг не удалось по причине скудного клеточного состава пробы. Таким образом, доля неадекватных цитологических препаратов составила 3,7% от общего числа проведенных исследований. Тем не менее, у 2 из них была обнаружена ДНК ВПЧ 16 типа, у 4 – другие онкогенные типы, у остальных ДНК ВПЧ высокого онкогенного риска обнаружено не было. ПЦР анализ на ДНК ВПЧ не удалось провести 7 женщинам (1,1%), но для них были получены результаты цитологии – у всех пациенток внутриклеточные поражения отсутствовали (NILM).

Среди всех пациенток с цитологическим заключением NILM 93 (22,7%) женщины оказались инфицированы ВПЧ высокого онкогенного риска, причем большинство нормальных цитологических картин (71 случай) пришлось на 12 других типов ВПЧ, не 16 и не 18.

Суммарно ДНК ВПЧ высокого онкогенного риска были обнаружены у 237 (38,4%) пациенток. Генотипы распределились следующим образом: 16 тип обнаружен у 32 (13,5%) пациенток, 18 тип – у 10 (1,6%), 16, 18 и другие типы у 3 (0,5%) женщин. ВПЧ 16 типа в совокупности с другими типами обнаружили у 29 (4,7%) пациенток, а 18 типа и других – у 7 (1,1%) женщин. 156 (25,3%) пациенток инфицировано другими онкогенными типами ВПЧ (не 16 и не 18).

Выводы. Проведенное обследование позволило сформировать группу ВИЧ-инфицированных женщин с плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями шейки матки высокой степени, коинфицированных онкогенными типами ВПЧ и подверженных высокому риску развития рака шейки матки. Обследование также показало более высокую распространенность ВПЧ высокого онкогенного риска в популяции ВИЧ-инфицированных женщин по сравнению с общей популяцией. Совместное выполнение цитологического и молекулярного исследований позволило уточнить природу наблюдаемых морфологических изменений и определиться с тактикой дальнейшего ведения пациентки, особенно в случаях обнаружения атипичных клеток неясного значения или

легких изменений плоского эпителия. Пациентки направлены в кабинет патологии шейки матки на базе ГБУЗ МО «Московский областной перинатальный центр» для дальнейшего обследования в соответствии с диагностическим качества и принятия решения о назначении и выборе метода лечения.

ПЕЙЗАЖ ГЕНОТИПОВ ПАПИЛЛОМАВИРУСОВ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ СРЕДИ ЖЕНЩИН НИЖНЕГО НОВГОРОДА

Бруснигина Н.Ф., Махова М.А., Орлова К.А., Колесникова Е.А., Черневская О.М., Барышева Н.Н., Скобло Л.Е.

ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия

Введение. Вирусы папилломы человека *(ВПЧ)* вызывают большой интерес у специалистов, так как их роль в патогенезе цервикальных неоплазий и рака шейки матки является доказанной и общепризнанной. По данным ВОЗ ежегодно в мире диагностируется около 2,5 – 3 миллионов случаев папилломавирусной инфекции (ПВИ). Число инфицированных *ВПЧ* за последнее десятилетие увеличилось более, чем в десять раз. Развитию папилломавирусной инфекции способствует множество факторов: неблагополучный социально-экономический статус, молодой возраст, иммуногормональные дисфункции, иммунодефицитные состояния, сопутствующие инфекции урогенитального тракта.

ВПЧ являются широко распространенной и гетерогенной группой вирусов. Геном представлен кольцевой замкнутой двухцепочечной ДНК размером порядка 8 тыс.п.о., содержит ранние (E) и поздние (L) гены. Поздние гены контролируют образование капсида. Ранние гены ответственны за репликацию, регуляцию транскрипции вирусного генома и трансформацию клеток. Классификация генотипов *ВПЧ* основана на различиях в последовательности генов E6 и L1. ВПЧ относятся к семейству Papoviridae. Филогенетически ВПЧ делятся на роды, виды и типы. Эпидемиологически выделяют «кожные», тропные к ороговевающему эпителию (в основном роды β и γ), и слизистые или аногенитальные (род α). По степени канцерогенного потенциала ВПЧ подразделяются на генотипы высокого канцерогенного риска (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 и 82) и генотипы низкого риска (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72 , 81). Наибольшим онкогенным потенциалом характеризуются *ВПЧ-16* и *ВПЧ-18* (примерно 70% всех случаев рака шейки матки).

Лабораторная диагностика ПВИ основана на использовании молекулярно-генетических методов (ПЦР, ПЦР в реальном времени) обнаружения специфических фрагментов генома *ВПЧ* непосредственно в цервикальных соскобах или биоптатах ткани. Современные зарегистрированные отечественные ПЦР тест-системы, обладающие высокой аналитической и диагностической чувствительностью и специфичностью, позволяют не только обнаруживать, но и определять в исследуемом материале вирусную нагрузку *ВПЧ* и проводить генотипирование основных клинически значимых генотипов (14 генотипов), ответственных за 94 % случаев тяжелых цервикальных дисплазий и рака шейки матки. Работы по изучению генетического разнообразия *ВПЧ* открывают новые перспективы в области эпидемиологического надзора за папилломавирусной инфекцией.

Целью работы являлся анализ распространенности различных генотипов *папилломавирусов* высокого канцерогенного риска *(ВПЧ ВКР)*, циркулирующих среди женщин г. Нижнего Новгорода.

Материалы и методы. В 2016 году обследовано 576 женщин в возрасте от 17 до 45 лет, обратившихся с профилактической целью и с признаками урогенитальных инфекций в женские консультации г. Нижнего Новгорода, а также 630 женщин с дисплазией эпителия шейки матки различной степени выраженности и 64 пациентки Нижегородского Областного клинического онкологического диспансера (ГБУЗ НО НОКОД) с первично выявленным раком шейки матки, не проходивших лечение. Материалом для исследования служили соскобы эпителия слизистых вагины, уретры, цервикального канала и/или зоны трансформации, отобранные с использованием одноразовых цервикальных щеток в транспортную среду «Ампли-Сенс» производства ЦНИИЭ (г. Москва). Экстракцию ДНК из клинического материала проводили с использованием реагентов «ДНК-сорб-А» (ЦНИИЭ, Москва). Выявление и дифференциацию 12-14 генотипов папилломавирусов проводили методом ПЦР с использованием тест систем «АмплиСенс *ВПЧ ВКР*-генотип –FL», «АмплиСенс *ВПЧ ВКР*-скрин-титр –FL» производства ЦНИИЭ, в формате «мультиплекс» и детекцией результатов ПЦР в режиме реального времени. *ВПЧ*-тесты производства ЦНИИЭ Роспотребнадзора целесообразно использовать в диагностических алгоритмах, т.к они удовлетворяют всем предъявляемым требованиям и являются клинически валидированными, обладают высокой чувствительностью и специфичностью, позволяя выявлять предраковые состояния в 95 % случаев. Количественное определение содержания широкого спектра генотипов *ВПЧ ВКР* обеспечивает возможность дифференцированной интепретации лабораторных данных с учетом показателя вирусной нагрузки (lg количества копий ДНК вируса в 10^5 клеток). Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью методов вариационной статистики, методов оценки достоверности (критерий Стьюдента t).

Результаты. Выявлено широкое распространение ВПЧ ВКР как в группе относительно «здоровых» женщин (26,2%), так и в группе женщин с урогенитальными инфекциями (32,8%) и с эрозивно-диспластическими изменениями шейки матки (59,2%), в группе женщин с раком шейки матки (CIN2, CIN3) (53%). Уровень общей инфицированности женщин папилломавирусами высокого канцерогенного риска составил 41,8%. Пейзаж *ВПЧ ВКР* был представлен 11 генотипами: 16, 18, 31, 33, 39, 45, 51, 52,

56, 58, 68. Среди генотипов доминирующими являлись 16 (41,7%), 56 (32,5%), 18 (17,8%), 33 (15,2%). Частота обнаружения других генотипов варьировала от 2,2% (66 генотип) до 7,6 % (58 генотип). Следует отметить, что в группе женщин с первичным раком шейки матки наиболее часто выявлялись генотипы 16 (38,1%), 33 (23,8%), 68 (14,2%) в подавляющем большинстве (61,9%) в моноинфекции. В структуре общей инфицированности женщин *ВПЧ ВКР* преобладает инфицирование вирусом одного генотипа (69%). Смешанное инфицирование, обусловленное вирусами двух генотипов, обнаружено у 24% женщин, трех генотипов – у 6,1%. У 0,9% было выявлено 4 генотипа. Отмечены единичные случаи одновременного выявления пяти и восьми генотипов. Наиболее распространенными вариантами смешанного инфицирования *ВПЧ ВКР* были следующие: 16 и 31 (21,5%), 16 и 33 (12,2%), 31 и 45 (6,6%), 16, 35, 45 (6,6%). Анализ вирусной нагрузки у *ВПЧ*-положительных лиц показал, что в группе здоровых *ВПЧ ВКР* в клинически значимых концентрациях выявлялись в 21 %, в группе с фоновыми патологиями шейки матки – в 28,2% случаев, в группе с дисплазиями шейки матки - 58,4%, в группе с раком шейки матки (CIN2, CIN3) – 95,8%.

Выводы. В условиях крупного промышленного мегаполиса на большой выборке обследуемых установлена частота обнаружения ВПЧ ВКР у «здоровых» женщин, в группах женщин с урогенитальными инфекциями, с эрозивно-диспластическими изменениями шейки матки, с раком шейки матки (CIN2, CIN3), которая составила 26,2%, 32,8%, 59,2% и 53% соответственно. Показана выраженная гетерогенность нижегородской популяции *ВПЧ ВКР*, представленная 11 генотипами. Среди генотипов доминирующими являлись 16 (41,7%), 56 (32,5%), 18 (17,8%), 33 (15,2%). В структуре общей инфицированности женщин *ВПЧ ВКР* преобладает инфицирование вирусом одного генотипа (69%). Полученные данные о распространенности различных геновариантов *ВПЧ ВКР*, циркулирующих на территории Нижнего Новгорода, позволили расширить информационную и методическую базу для совершенствования эпидемиологического надзора за папилломавирусной инфекцией.

РЕЗУЛЬТАТЫ ВПЧ-ГЕНОТИПИРОВАНИЯ В СКРИНИНГЕ

Гончаревская З.Л.[1], Роговская С.И.[2], Теребнева Л.А.[2], Шипулина О.Ю.[3]

[1]ГБОУ ВПО «Российский университет дружбы народов», г. Москва, кафедра акушерства и гинекологии с курсом перинатологии

[2]ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования», кафедра акушерства и гинекологии, г. Москва

[3]ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, г. Москва, Россия

Актуальность. ВПЧ высокого онкогенного риска индуцируют предраковые заболевания и рак шейки матки. Важно проанализировать значимость ВПЧ-теста с генотипированием у пациенток с неоднозначными результатами цитологического исследования и оценить прогностическую значимость теста.

Цель исследования. Проанализировать результаты ДНК-генотипирования у пациенток, принявших участие в ВПЧ-скрининге.

Материал и методы. Изучаемую группу составили 110 ВПЧ-позитивных женщин по данным скринингового исследования, проводимого в двух женских консультациях Юго-Западного административного округа г.Москвы совместно с ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, в возрасте от 18 до 70 лет. Пациентки были разделены на 3 группы: с латентным течением (42 женщины), с субклиническим течением (39 женщин), третью группу составили женщины с цервикальной интраэпителиальной неоплазией (29 женщин). ВПЧ-скрининг выполнялся в соответствии с международными стандартами и проводился в два этапа. На первом этапе - выполняли количественное исследование на 12 типов ВПЧ группы высокого риска (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) и отдельно на 16 и 18 типы. При положительном результате проводилось определение генотипа вируса. Результат исследования - информация о количестве ДНК вируса и о присутствующих в пробе генотипах ВПЧ. Материалом для исследования служили образцы эпителия шейки матки.

Результаты. Анализ частоты выявления различных генотипов ВПЧ показал, что во всех группах исследования чаще других встречаются генотипы филогенетических групп А7 (18,39,45,59) и А9 (16, 31, 33,58-й типы), а также группы А5 (56-й тип). Частота встречаемости отдельных генотипов в группах была определена в процентах к общему количеству ВПЧ-позитивных образцов. В группе пациенток с латентной формой папилломавирусной инфекции (ПВИ) наиболее часто встречались: ВПЧ 58-го типа – 21,4%, 16-го типа – 16,6%, 56-го типа – 14,3%; 31-го – 11,9%, 33-й тип составил 4,8%, остальные типы составили от 2 до 3%. В группе пациенток с субклиническим течением ПВИ 16-й тип выявлялся в 30,7%, 31-й тип -15,3%, 56-й тип – 12,8%, 33-й тип – 10,2%, 39-й тип -7,6% и 58-й тип – 5,1%, остальные типы составили от 2 до 3%. В группе женщин с цервикальной интраэпителиальной неоплазией доминировали 16-й тип - 31,1%, 18-й тип-27,%, 33-й тип-13,8%, 51-й тип-10,3%, 31-й тип-6,9%. Остальные типы были выявлены в 2-3% случаев.

Выводы. ВПЧ 16-го типа (генотип высокого канцерогенного риска) занимает первое место по распространённости среди определяемых генотипов у женщин с цервикальной интраэпителиальной неоплазией, на втором месте 18-й тип, на третьем 33-й тип. У женщин с латентной формой ПВИ преобладают 16-й, 56-й и 58-й типы. При субклиническом течении ПВИ чаще выявляются 16-й, 31-й, 56-й и 33-й типы. Выявленное широкое распространение ВПЧ высокого канцерогенного риска свидетельствует о необходимости проведения ДНК-генотипирования у пациенток с ВПЧ-ассоциированными заболеваниями шейки матки. Это в свою очередь даёт возможность определять группы повышенного риска по онкозаболеваниям урогенитального тракта у женщин.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДОСТОВЕРНОГО ПОРОГА НАЛИЧИЯ ИНТЕГРАЦИИ НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ ВПЧ ВКР СКРИН-ТИТР 14 С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА СРАВНЕНИЯ DROPLET DIGITAL PCR

Кулешова О.Б., Романюк Т.Н., Куевда Д.А., Шипулина О.Ю., Шипулин Г.А., Лебедева Ю.А.

Введение. Вирус папилломы человека (ВПЧ) является доказанной причиной развития рака шейки матки (РШМ). Сложность диагностики заключается в своевременном выявлении случаев предрака и начальных стадий рака на фоне сильно превосходящих по частоте случаев неопасной инфекции. Часто малигнизация происходит благодаря воздействию на репликативный аппарат клетки вирусных белков E6/E7, которые начинают вырабатываться особенно активно в тех случаях, когда кольцевая ДНК вируса разрывается в области контролирующего гена E2 для встраивания в линейный геном клетки. Данное событие называют интеграцией. С интеграцией, как правило, связывают неблагоприятные прогнозы – высокую вероятность развития РШМ. Наличие интеграции показано как минимум для трех наиболее опасных генотипов ВПЧ, для них же определена частота выявления интегрированных форм в инвазивных раках: ВПЧ 18 (100%-92%), ВПЧ 45(80%), ВПЧ 16(55-80%). В клинической практике возможность выявлять интеграцию вируса в геном клетки позволила бы вычленять пациентов с повышенным риском развития рака для более тщательного и тщательного обследования и своевременного применения лечебных мероприятий. При этом прямое лабораторное определение интеграции вируса в геном человека является сложной задачей даже для научной лаборатории, поэтому часто под термином «определение интеграции» в клинической практике понимают определение наличия области E6/E7 генома ВПЧ и отсутствия области E2 как основного фактора, влияющего на процессы озлокачествления клетки. Набор реагентов ВПЧ ВКР Скрин-титр 14, разработанный в ЦНИИ Эпидемиологии, позволяет определять наличие 14 генотипов высокого канцерогенного риска, кроме того, позволяет определять полную интеграцию ВПЧ 18 и ВПЧ 45, основанную на описанном выше принципе - наличия области E6/E7 и отсутствии области E2. Количественная оценка участков указанных генов позволяет также определять частичную интеграцию ВПЧ 18 и ВПЧ 45 при отсутствии преобладающих концентраций ВПЧ других генотипов. Проверить достоверность различия концентраций указанных генов и выбрать четкий порог наличия интеграции можно при использовании иного метода оценки концентрации, нежели Real Time PCR. Одним из самых современных высокочувствительных методов точной количественной оценки является droplet digital PCR (ddPCR), который и был использован для достижения цели данной работы.

Целью данной работы явилось определение порога достоверности различий в концентрациях генов E6/E7 и E2 ВПЧ 18 и ВПЧ 45 при тестировании набором ВПЧ ВКР Скрин-титр 14. Для осуществления данной цели были поставлены следующие **задачи.**

1. Разработка и адаптация методики выявления и количественного определения участков E6/E7 и E2, для метода ddPCR для генотипов 18 и 45.

2. Сравнение результатов для трех методов – ddPCR, инхаус методики определения концентраций E6/E7 и E2 и набора ВПЧ ВКР Скрин-титр 14 для тех же генотипов.

3. Расчет порога достоверности различий концентраций генов E6/E7 и гена E2 при частичной интеграции на основании полученных данных.

Материалы и методы. Для разработки методики определения E6/E7, E2 и участка β-глобинового гена человека в качестве внутреннего контроля было использовано оборудование QX200™ Bio-Rad и прилагающий ddPCR supermix, содержащий необходимые компоненты, кроме специфических олигонуклеотидов. В качестве образцов сравнения использовались контрольные образцы, содержащие участки E6/E7 и E2 в одинаковом количестве, культура клеток HeLa, Образцы соскобов с шейки матки от пациенток, ранее протестированные на наличие ВПЧ 18 и ВПЧ 45, в ряде из которых была выявлена интеграция инхаус методикой, описанной ранее. Для экстракции ДНК использовался набор Амплисенс ДНК-сорб-АМ (ФБУН ЦНИИЭ).

Результаты. Разработанные для проведения данной работы наборы для ddPCR являются мультипрайм наборами, содержащими олигонуклеотиды для одновременной детекции участков E6/E7 и E2 по двум различным каналам детекции. Подобные наборы были разработаны как для генотипа ВПЧ 18, так и для ВПЧ 45. Результаты тестирования наборов на модельных образцах соответствовали ожидаемым. Количественные результаты соответствовали значениям, рассчитанным при разведении модельных образцов. В образцах ДНК, экстрагированных из культуры клеток HeLa, определялись участки E6/E7 и полностью отсутствовало определение участков E2, что объясняется данными о полной интеграции вируса в клетках данной культуры. Для сравнения результатов набора ВПЧ ВКР Скрин-титр 14 с методом абсолютной оценки концентрации ddPCR было протестировано 34 образца от пациенток, содержащих ВПЧ 18, часть из которых были ранее определены инхаус методикой, как имеющие полную или частичную интеграцию ВПЧ 18. В 28 образцах было обнаружено полное отсутствие гена E2, при наличии значимых концентраций гена E6/E7 по результатам 3х методов исследования, что расценивалось как полная интеграция вируса в геном человека. В 6 образцах набором ВПЧ ВКР Скрин-титр 14 были обнаружены разные концентрации ВПЧ E6/E7 и ВПЧ E2. На основании знаний об ошибке метода ПЦР в 0,5 lg были определены математические границы для набора ВПЧ ВКР Скрин-титр 14 , равные ±0,5 lg от линии отношений, представляющей совпадение концентраций E6/E7 и E2 (далее линия отношений1=ЛО1). Те же границы, были применены и для двух методов сравнения. Т.О. в результате для 4-х образцов из шести двумя методами сравнения были определены концентрации, попадающие в диапазон ±0,5 lg от ЛО1, что относит эти образцы к зоне отсутствия интеграции. Два оставшихся образца определены всеми тремя методами за пределами границы +0,5 lg от ЛО1, что позволяет предполагать в них наличие интеграции. Таким образом, в результате обработки всех

полученных данных набором ВПЧ ВКР Скрин-титр 14 и сопоставления результатов с тестами сравнения получена эмпирическая граница наличия интеграции в образцах при измерении указанным набором, равная 1,5 lg от ЛО1. Данная граница обозначает, что в случае, если концентрация ВПЧ Е6/Е7 превышает в 31.6 раз (1,5 lg) и более концентрацию ВПЧ Е2, то можно говорить о наличии частичной интеграции вируса в геном человека. Аналогичные тестирования, расчеты и сравнения были проведены для образцов, ранее охарактеризованных, как содержащие ВПЧ 45. В результате тестирования 47 образцов в 18 образцах была определена полная интеграция по результатам трех методов. 1 образец относился к зоне + 0,5 lg от ЛО1 по результатам всех трех методов, 21 образец по результатам методов сравнения, относился к области недостоверной интеграции (в пределах 0,5 lg от ЛО1). 7 образцов по результатам, полученным для методов сравнения показывают отличие в концентрациях Е6/Е7и Е2 более 0,5lg, что относит их к зоне частичной интеграции. Таким образом, при сопоставлении результатов испытуемого теста и тестов сравнения, полученная эмпирическая граница наличия интеграции для ВПЧ 45 совпала с таковой для ВПЧ 18 и составила 1,5 lg разницы количества генов Е6/Е7 и Е2.

Выводы. В результате проведенного исследования разработана методика сравнения для количественного выявления двух участков генома ВПЧ для двух генотипов методом ddPCR, проведено сравнение количественных показателей для трех методик, проведен расчет порога достоверного различия концентраций этих генов для набора ВПЧ ВКР Скрин-титр 14. Благодаря проведенному исследованию расширяется возможность для применения данного набора как в клинической лабораторной диагностике, так и в научных исследованиях.

ВЫЯВЛЕНИЕ ПАТОЛОГИИ ШЕЙКИ МАТКИ В ТРАДИЦИОННОЙ И ЖИДКОСТНОЙ ЦИТОЛОГИИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ СОВМЕСТНОГО ВПЧ-ПАП-ТЕСТА

Шипулина О.Ю., Романюк Т.Н., Лешкина Г.В.

ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение. Заболеваемость раком шейки матки в РФ растет с каждым годом, несмотря на то, что в настоящее время существуют эффективные средства первичной и вторичной профилактики – вакцинация и скрининг, направленный на выявление групп риска развития предраковых заболеваний. Эффективность скрининга зависит от охвата целевой группы и чувствительности метода скрининга. Традиционный метод скрининга, цитологическое исследование мазков окрашенных по Папаниколау, обладает низкой чувствительностью по сравнению с новыми методами. Отмечается, что до 90% ложноотрицательных результатов связаны с ошибками на преаналитическом этапе. Новые методы, жидкостная цитология, ВПЧ-тестирование, выявление клеточных маркеров дисплазии, разрабатывались и активно внедрялись в скрининг последние 15-20 лет. На сегодняшний день в развитых странах автоматизированная жидкостная цитология практически полностью заменила традиционную, а ВПЧ-тест все больше используется на первом этапе скрининга вместо ПАП-теста. В России оба новых метода не регламентированы приказами и не введены в ОМС. Согласно приказу М3 РФ от 3.02.2015 №36ан «Об утверждении порядка проведения диспансеризации определенных групп взрослого населения», женщинам от 21 до 69 лет каждые три года должен проводиться осмотр, включая взятие соскоба с поверхности шейки матки и цервикального канала на цитологическое исследование (окрашивание по Папаниколау).

Цель и задачи. Сравнить частоту выявления онкологической патологии шейки матки у ВПЧ-позитивных женщин при использовании традиционной и жидкостной цитологии.

Материалы и методы. В рамках ежегодной диспансеризации сотрудниц института в возрасте с 21 до 69 лет обследовали с помощью совместного ВПЧ-ПАП-теста. В 2014 и 2016 году выполняли ВПЧ-ПАП-тест жидкостный, в 2015 году – традиционный. Биоматериал – соскобное отделяемое из цервикального канала и влагалищной зоны шейки матки - забирали комбинированной цервикальной цитощеткой. Для традиционного ВПЧ-ПАП-теста материал сначала наносили на предметное стекло и фиксировали этанолом - для проведения цитологического исследования, затем цитощетку с остатками биоматериала помещали в пробирку с транспортной средой «ТСМ» - для исследования на ВПЧ. Для жидкостного ВПЧ-ПАП-теста цитощетку с биоматериалом помещали в контейнер с транспортной средой SurePath® (BD, USA). Для традиционного цитологического исследования стекло-препараты окрашивали по Папаниколау, а для жидкостного - тонкослойные препараты готовили и окрашивали с помощью автоматизированной станции BD (Prep Mate, Prep Stain processor). Для проведения ВПЧ-теста использовали наборы реагентов «АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL» и «АмплиСенс ВПЧ 16/18-FL», с помощью которых определяли концентрацию ДНК ВПЧ 12 генотипов высокого канцерогенного риска, а 16 и 18 типы определяли отдельно. Для экстракции ДНК из остаточного клеточного материала использовали наборы «ДНК-сорб-АМ» (для «ТСМ») и «ДНК-сорб-Д» (для SurePath®). Положительным результатом ВПЧ-теста считали выявление ДНК ВПЧ в концентрации ≥ 1000 копий ДНК ВПЧ на 10^5 геномов человека (3 lg/10^5 клеток). Результаты ПАП-теста интерпретировали в соответствии с терминологической системой Бетесда (TBS, 2001), согласно которой NILM – отсутствие атипичных клеток, ASC-US – атипичные плоские клетки неясного значения, ASC-H – атипичные плоские клетки, нельзя исключить тяжелые поражения, L-SIL – легкие поражения плоского эпителия, H-SIL – тяжелые поражения плоского эпителия. Положительным результатом ПАП-теста считали ASC-US. В случае получения двойного положительного результата в ВПЧ-ПАП-тесте в 2016 году проводили дополнительное исследование на наличие двойной экспрессии клеточных онкобелков p16/Ki67 методом иммуноцитохи-

мии с помощью набора реагентов «CINtec® PLUS Cytology Kit» (Roshe Diagnostics, Germany), маркер тяжелых поражений.

Основные результаты. С помощью ВПЧ-ПАП-теста было обследовано 406 женщин - в 2014 году, 408 – в 2015 и 452 – в 2016. Результаты исследования представлены в таблице. Частота выявления ВПЧ достоверно не отличалась по годам. Однако частота обнаружения атипичных клеток или поражений плоского эпителия различной степени тяжести достоверно отличалась в ПАП-тесте и зависела от метода взятия биоматериала и подготовки стекло-препарата для исследования. В традиционном ПАП-тесте частота выявления атипичных клеток или поражений плоского эпителия (≥ASC-US) была достоверно ниже, чем в жидкостном ПАП-тесте. Поражения легкой и тяжелой степени в традиционном ПАП-тесте не были выявлены вовсе, в то время как в жидкостном частота выявления H-SIL (CIN2) в 2014 и 2016 годах составила 4,3% и 3,9%, соответственно (по 2 случая). Доля неудовлетворительных или недостаточно удовлетворительных мазков достоверно выше при традиционном способе взятия материала на стекло.

У двух женщин в 2016 году выявили H-SIL (CIN2), у обоих выявили ВПЧ в количестве более 6 lg/10^5 клеток, у первой – 33 тип, у второй – 16 и 35 типы, у обоих обнаружили двойную экспрессию клеточных онкобелков p16/Ki67. Обе пациентки были обследованы и в 2015 году, однако при высокой концентрации ВПЧ - более 6 lg/10^5 клеток, лишь у первой в ПАП-тесте выявили ASC-H, а у второй – NILM, при этом цитологом было отмечено плохое качество традиционного препарата, большое количество слизи и лейкоцитов.

Выводы. Традиционный ПАП-тест обладает низкой чувствительностью выявления онкологической патологии шейки матки по сравнению с жидкостным и пропускает случаи тяжелых поражений. Для повышения эффективности цервикального скрининга необходимо введение новых более чувствительных методов в систему ОМС.

Параметры	(N=406)	(N=408)	(N=452)
Год	2014	2015	2016
средний возраст (диапазон)	40 (21 - 66)	40 (22 - 65)	40 (22 - 68)
ПАП-тест (метод)	жидкостный	традиционный	жидкостный
мазок неудовлетворительный	0,0%	1,2%	0,2%
недостаточно удовлетворительный	0,2%	12,5%	0,2%
	Частота выявления		
ВПЧ ≥ 3 lg/10^5 клеток	11,6%	12,7%	11,3%
≥ ASC-US среди ВПЧ-позитивных	36,2%	7,7%	31,4%
L-SIL (CIN1) среди ВПЧ-позитивных	6,4%	0,0%	19,6%
H-SIL (CIN2) среди ВПЧ-позитивных	4,3%	0,0%	3,9%
H-SIL (CIN2) среди всех обследованных	0,5%	0,0%	0,4%

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ЦЕРВИКАЛЬНОГО СКРИНИНГА И ОПЫТ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Шипулина О.Ю., Лешкина Г.В., Романюк Т.Н., Дмитрюкова М.Ю.

ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение. Эффективность цервикального скрининга, который является важным средством вторичной профилактики рака шейки матки, зависит от охвата целевой группы женщин программами скрининга и чувствительности метода скрининга. Традиционный метод скрининга, цитологическое исследование мазка с окраской по Папаниколау, как было многократно показано, обладает низкой чувствительностью. Поэтому внедрение новых более чувствительных методов – ВПЧ-тестирование, жидкостная цитология (ПАП-тест жидкостный), совместный ВПЧ-ПАП-тест, а также дополнительные тесты, предназначенные для сортировки ВПЧ-позитивных образцов (например, двойная экспрессия белков p16 и Ki67) – имеет важное значение для повышения эффективности скрининга. В странах Северной Европы (Нидерланды, Дания, Англия) в программах скрининга уже в более 90% используются жидкостные автоматизированные технологии (BD, «SurePath» и Hologic «ThinPrep»). ВПЧ-тест на основе самостоятельного мазка применяется для сортировки результата ПАП-теста (ASC-US, L-SIL) и вводится на первом этапе скрининга для женщин, которые не участвуют в скрининге.

Цель и задачи. Оценить эффективность современных алгоритмов цервикального скрининга на основе комплекса новых методов (ВПЧ-тестирование, жидкостная

цитология, выявление онкобелков p16/Ki67) и сравнить частоту выявления патологий шейки матки в ПАП-тесте жидкостном и совместном ВПЧ-ПАП-тесте традиционном и жидкостном.

Материалы и методы. С января 2015 г по декабрь 2016 г 47560 женщин в возрасте от 16 до 79 лет (ср. возр. 36 лет) обследовали с помощью ВПЧ-ПАП-теста традиционного (N=3699; 7,8%, средний возраст 33 года), ПАП-теста жидкостного (N=13379; 28,1%, средний возраст 38 лет), ВПЧ-теста жидкостного (N=2335; 4,9%) и ВПЧ-ПАП-теста жидкостного (N=28147; 59,2%, средний возраст 36 лет). При выявлении патологии (ASC-US и выше) в ПАП-тесте жидкостном образец тестировали в ВПЧ-тесте. Соскобное отделяемое из цервикального канала и влагалищной зоны шейки матки - забирали комбинированной цервикальной цитощеткой. Для традиционного ВПЧ-ПАП-теста материал сначала наносили на предметное стекло и фиксировали этанолом - для проведения цитологического исследования, затем цитощетку с остатками биоматериала помещали в пробирку с транспортной средой «ТСМ» - для исследования на ВПЧ. Для жидкостного ВПЧ-ПАП-теста цитощетку с биоматериалом помещали в контейнер с транспортной средой SurePath® (BD, USA). Для традиционного цитологического исследования стекло-препараты окрашивали по Папаниколау, а для жидкостного - тонкослойные препараты готовили и окрашивали с помощью автоматизированной станции BD (Prep Mate, Prep Stain processor). Для проведения ВПЧ-теста использовали наборы реагентов «АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL» и «АмплиСенс ВПЧ генотип-FL», с помощью которых определяли концентрацию ДНК и тип ВПЧ. Положительным результатом ВПЧ-теста считали выявление ДНК ВПЧ в концентрации ≥ 1000 копий ДНК ВПЧ на 10^5 геномов человека (3 lg/10^5 клеток). Результаты ПАП-теста интерпретировали в соответствие с терминологической системой Бетесда (TBS, 2001): NILM – отсутствие атипичных клеток, ASC-US – атипичные плоские клетки неясного значения, ASC-H – атипичные плоские клетки, нельзя исключить тяжелые поражения, L-SIL – легкие поражения плоского эпителия, H-SIL – тяжелые поражения плоского эпителия, AGC – атипичные клетки железистого эпителия. В 508 случаях (1,2%) проводили дополнительное исследование на наличие двойной экспрессии клеточных белков p16/Ki67 методом иммуноцитохимии с помощью набора реагентов «CINtec® PLUS Cytology Kit» (Roshe Diagnostics, Germany). В случаях H-SIL и AGC при отсутствии ВПЧ использовали набор реагентов *HPV*-квант-21 (ДНК-технология), который позволяет количественно выявлять другие типы ВПЧ, не включенные в группу высокого канцерогенного риска, но филогенетически близкие к ним - *26, 82* (А5*)* и 53 (А6).

Основные результаты. Доля неадекватных и недостаточно адекватных образцов в традиционном ПАП-тесте составила 4,6% и 10,5%, соответственно, в том числе в 8,0% случаев отмечено нарушение или отсутствие суправитальной фиксации. В ПАП-тесте жидкостном – 0,2% и 1,5%, соответственно, в ВПЧ-ПАП-тесте жидкостном – 0,3% и 1,2%. ВПЧ-позитивных образцов было выявлено в традиционном ВПЧ-ПАП-тесте и ВПЧ-ПАП-тесте жидкостном 26,2% и 24,6%. Частота выявления атипичных клеток (ASC-US и выше) и тяжелых поражений (H-SIL) представлена в таблице.

тест	всего	≥ASC-US	ASC-H	H-SIL, AGC	ASC-US, L-SIL ВПЧ-негативные	H-SIL, AGC ВПЧ-негативные
ВПЧ-ПАП-тест	3699	5,3%	0,5%	0,7%	6,6%	0,0%
ПАП-тест жидкостный	13379	4,9%	0,2%	1,2%	29,5%	1,2%*
ВПЧ-ПАП-тест жидкостный	28147	8,4%	0,6%	1,9%	4,0%	0,2%**

* - в двух образцах была выявлена H-SIL, но ни один из 12 типов ВПЧ не был обнаружен, тест на p16/Ki67 был позитивным, при дополнительном тестировании в обоих случаях выявили 82 тип ВПЧ (более 6 lg на образец).

** - в одном образце при AGC в ПАП-тесте, ВПЧ-тест был негативный (52 тип, 2,3 lg), а тест на p16/Ki67 – позитивным, другие типы ВПЧ также не были выявлены.

В ПАП-тесте жидкостном атипичные клетки и поражения различной степени тяжести выявляются реже, чем в совместном ВПЧ-ПАП-тесте жидкостном, а доля ВПЧ-негативных ASC-US и L-SIL значительно выше. В ВПЧ-ПАП-тесте традиционном частота выявления патологии низка вследствие большого количества ошибок на пре-аналитическом этапе. Из 508 жидкостных образцов, протестированных на p16/Ki67 в 191 (37,6%) выявили NILM в ПАП-тесте, из них p16/Ki67 позитивными были 12% образцов, из которых в 83% обнаружены 16, 18, 31, 33 и 45 типы. В 102 (20,1%) выявили ASC-US, L-SIL, p16/Ki67 были позитивными в 47%, а ВПЧ 16, 18, 31, 33, 45 обнаружены в 83% из них. В 215 (42%) выявили ASC-H, H-SIL и AGC, p16/Ki67 были позитивны в 96,7%, а ВПЧ 16, 18, 31, 33, 45 обнаружены в 88,5% из них. В 7 (3,3%) случаев p16/Ki67 были негативными, в 6 случаях обнаружены ВПЧ в количестве более 4 lg/10^5 клеток – 16 тип (4), 31 тип (1) и 45 тип (1). В одном случае обнаружен ВПЧ 51 типа (более 6 lg/10^5 клеток). По результатам коэкспрессии цитологический диагноз был изменен в 68 (13,4% случаев).

Выводы. Частота выявления атипичных клеток и поражений различной степени тяжести выше в совместном ВПЧ-ПАП-тесте, чем в первичном ПАП-тесте с последующей сортировкой с помощью ВПЧ-теста. Доля ВПЧ-негативных ASC-US и L-SIL в ПАП-тесте значительно выше, чем в совместном ВПЧ-ПАП-тесте (29,5% против 4%), это приводит к необходимости большого количества дополнительных исследований для первичного ПАП-теста. Дополнительное тестирование образцов на коэкспрессию p16/Ki67 методом иммуноцитохимии позволяет уточнить цитологический диагноз, отсортировать образцы с повышенным риском предраковых патологий и снизить долю пациенток, направленных на кольпоскопию. В традиционном ВПЧ-ПАП-тесте доля выявления тяжелых патологий значительно ниже, чем в жидкостном, что связано с большим количеством ошибок на преаналитическом этапе. Кроме того, отсутствует возможность протестировать образцы на коэкспрессию p16/Ki67. Таким образом, наиболее чувствительным и эффективным методом скрининга является совместный ВПЧ-ПАП-тест жидкостный с последующей сортировкой образцов с помощью теста на двойную экспрессию p16/Ki67.

ПЦР-ДИАГНОСТИКА ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ВНУТРЕННЕМ ЭНДОМЕТРИОЗЕ

Орадова А.Ш., Сапаргалиева А.Д., Шумкова Э.Н., Джардемалиева Н.Ж.

Казахский национальный медицинский университет имени С.Д. Асфендиярова, Алматы, Республика Казахстан

Актуальность. Эндометриоз является одной из наиболее актуальных проблем современной гинекологии. Несмотря на более чем столетний период с момента появления первых сообщений об эндометриозе, некоторые аспекты этиологии, патогенеза, клинических, морфофункциональных, иммунологических, биохимических, генетических вариантов этого заболевания продолжают оставаться предметом научных исследований. И хотя многие вопросы решены, актуальность изучения проблемы эндометриоза не снижается [1,2].

Цель работы: выявление ДНК Вируса папилломы человека 16 и 18 типа в слизистой эндометрия у 98 больных женщин репродуктивного возраста.

Материалы и методы исследования. Исследованы образцы из биоптатов внутреннего слоя матки у 98 женщин репродуктивного возраста г. Алматы, выделили ДНК с помощью ПЦР в режиме реального времени. ПЦР - анализ проводили с использованием тест-системы АО «ДНК-Технология», Москва, в термоциклере «ДТ-322». Режим амплификации после внесения минерального масла составлял: денатурация - 94^0 С, 35 сек; отжиг - 60^0 С, 25 сек; синтез - 72^0 С, 35 сек (всего - 45 циклов).

Результаты исследования. В скрининге участвовали 98 женщин репродуктивного возраста г. Алматы в рамках принятой Программы развития онкологической помощи на 2012–2016 гг. В результате проведенных исследований биоптатов внутреннего слоя матки 98 пациентов с заболеванием внутреннего энлометриоза, было обнаружено, что в образцах, в 7% случаев, регистрировались ДНК Вируса папилломы человека 16 типа.

Выводы. Таким образом, установлено что, особенностью внутреннего эндометриоза, помимо малосимптомности и высокой частоты осложнений, относится часто встречающаяся ассоциация с другими возбудителями урогенитальных инфекций. В 6 случаях в возрастной группе был установлен рак эндометрия, а в 7 случаях выявлена ДНК Вируса папилломы человека 16 типа, что указывает на высокий риск злокачественной трансформации**.**

Список литературы

1. A. Sapargaliyeva, E. Shumkova, Zh. Imanbayeva, N. Dzhardemaliyeva, A. Oradova. – Morphological features of glandular changes in cases of adenomyosis// 19th International Meeting of the European Society of Gynaecological Oncology (ESGO 2015), - Nice, France, October 24-27, 2015. Vol. - 467, supplement 2, - P.1238.

2. Шумкова Э.Н. с соавт. - Лейомиома матки и аденомиоз у женщин климактерического периода// Медицина, - Алматы, 2015, №4/ 154, 2015, С. 51- 5

Раздел 3. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА В ОНКОЛОГИИ

СИНДРОМ МЭН 2А: КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ПРИ ЦИСТЕИНОВЫХ МУТАЦИЯХ В 10 И 11 ЭКЗОНАХ ГЕНА *RET*

Северская Н.В., Ильин А.А., Исаев П.А., Шинкаркина А.П., Дербугов Д.Н., Семин Д.Ю., Желонкина Н.В., Чеботарева И.В.

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, Обнинск, Россия

Синдром множественных эндокринных неоплазий 2А типа (МЭН2А) включающий медуллярный рак щитовидной железы (МРЩЖ), феохромоцитому и гиперпаратиреоз, развивается в результате герминальной мутации в гене *RET*. Наиболее частой локализацией мутаций при синдроме МЭН2А являются цистеиновые кодоны в 10 и 11 экзонах. Клинические проявления синдрома МЭН2А, в том числе агрессивность МРЩЖ, пенетрантность феохромоцитомы и гиперпаратиреоза, зависят от локализации *RET* мутации.

Цель. Сравнить клинические проявления синдрома МЭН2А у больных с мутациями, затрагивающими цистеиновые кодоны в 10 и 11 экзонах гена *RET*.

Пациенты и методы. В анализ включено 40 пациентов с герминальными мутациями (цистеиновыми) в 10 и 11 экзонах гена *RET*. Из них 29 пациентов, члены 14 семей, с мутацией в 11 экзоне и 11 пациентов, члены 8 семей, с мутациями в 10 экзоне гена *RET*. Все мутации в 11 экзоне затрагивали цистеиновый кодон 634 (C634R - у 13, C634Y – 10 , C634S – 3, C634G – 2, комплексная мутация del634-636+E632V+L633R – у одного). Мутации в 10 экзоне локализованы в цистеиновых кодонах 609, 611 и 620 (C609R – у 1, C609Y – 1, C611W – 1, C611Y – 1, C620R – 4, C620Y – 3). Мутации определены прямым секвенированием соответствующих экзонов гена *RET*. Оценивали возраст выявления МРЩЖ, частоту регионарного и отдаленного метастазирования МРЩЖ у лиц до 20 лет и в старшей группе, частоту встречаемости феохромоцитомы и гиперпаратиреоза, возраст выявления феохромоцитомы. Сравнение проводили между группами больных с мутацией в 10 и 11 экзонах, с помощью критерия Фишера и t-критерия.

Результаты. Средний возраст выявления МРЩЖ у больных с мутацией в 10 экзоне составил 30 лет (12-55 лет), при мутации в 11 экзоне – 23 года (4 – 47 лет); p=0,17. % соотношение мужчин при мутации в 10 и 11 экзонах составил соответственно 9% и 31% (p=0,23). Частота метастатического поражения лимфоузлов шеи у оперированных до 20 лет составила соответственно 50% (1/2) и 36% (4/11), p=1,0. Частота поражения лимфоузлов шеи у оперированных после 20 лет составила 78% (7/9) и 63% (10/16), p=0,66. Отдаленные метастазы выявлены у больных с мутациями в 10 и 11 экзонах старше 20 лет у 1/9 (11%) и 2/16 (13%) соответственно, p=1,0. Минимальный возраст выявления регионарных метастазов МРЩЖ при мутации в 10 экзоне – 13 лет (C620R), в 11 экзоне – 15 лет (C634R). Минимальный возраст диагностики отдаленных метастазов в кости составил 29 лет (C611Y) и 30 лет (C634R), в легкие и печень – 36 лет (C634R).

Феохромоцитома диагностирована у 33% (3/9) пациентов старше 20 лет с мутацией в 10 экзоне и 69% (11/16) – в 11 экзоне, p=0,11. Медиана возраста выявления феохромоцитомы при мутации в 10 экзоне составила 48 лет (45 – 56 лет), в 11 экзоне – 32 года (21 – 57 лет), p=0,02. Гиперпаратиреоз морфологически подтвержден у 1/11 (9%) и 6/29 (21%) пациентов с мутациями в 10 и 11 экзонах, p=0,65.

Заключение. В исследуемой группе больных с синдромом МЭН2А, обусловленным герминальной мутацией в цистеиновых кодонах 10 и 11 экзонов гена *RET* выявлено, что развитие феохромоцитомы при мутации в 11 экзоне (634 кодон) происходит в среднем на 16 лет раньше, чем при мутациях в 10 экзоне. Получена также тенденция более раннего развития МРЩЖ (в среднем на 7 лет) и более высокой пенетрантности феохромоцитомы (в 3 раза чаще) и гиперпаратиреоза (в 2,3 раза чаще) при мутации в 11 экзоне по сравнению с 10 экзоном, однако различия не достигли статистической значимости, возможно из-за малого количества пациентов. Несмотря на более позднее проявление МРЩЖ при мутации в 10 экзоне, частота регионарного и отдаленного метастазирования была идентичной таковой при мутации в 11 экзоне гена *RET*.

ДЕРЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *RARG* И *RXRA* ПРИ ОПУХОЛИ КЛАТСКИНА

Снежкина А.В.[1], Федорова М.С.[1], Калинин Д.В.[2], Пудова Е.А.[1], Краснов Г.С.[1], Кудрявцева А.В.[1,3]

[1] Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия
[2] Институт хирургии имени А.В. Вишневского Минздрава России, Москва, Россия
[3] Национальный медицинский исследовательский радиологический центр Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Введение. Опухоль Клатскина представляет собой злокачественное новообразование внепеченочных протоков или эпителия желчных путей в промежутке от места впадения в общий печеночный проток пузырного протока до начала сегментарных печеночных протоков второго порядка. Ряд авторов считают опухоль Клатскина самостоятельным заболеванием, другие - разновидностью холангиокарциномы.

Развитие этого заболевания долгое время может протекать бессимптомно, большинство пациентов обращаются в медицинские учреждения на поздних стадиях, когда опухоль является неоперабельной. Радио- и химиотерапия опухоли не приносит значимого положительного результата. Данных о молекулярно-генетических характеристиках опухоли Клатскина довольно мало. Между тем изучение молекулярных механизмов образования и прогрессии опухоли Клатскина могут способствовать развитию молекулярных методов диагностики и лечения данного заболевания, что значительно повысит шансы больных на благоприятный исход лечения.

Целью исследования является идентификация онко-ассоциированных изменений экспрессии генов, кодирующих ядерные рецепторы ретиноидов (транскрипционные факторы), при опухоли Клатскина.

Материалы и методы. С помощью метода количественной ПЦР (кПЦР) проведена оценка уровня мРНК генов, кодирующих ядерные рецепторы ретиноевой кислоты (*RARA*, *RARB*, *RARG*) и рецепторы Х ретиноидов (*RXRA*, *RXRB*, *RXRG*) на выборке из 20 парных образцов опухоли Клатскина. Реакцию кПЦР проводили с использованием наборов праймеров и проб TaqMan Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific, США) на приборе 7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, США). Данные кПЦР анализировали в режиме относительных измерений (ddCt-метод) с использованием двух контрольных генов (*GUSB* и *RPN1*) с помощью программы АТГ («Анализ Транскрипции Генов»), разработанной в ИМБ РАН (*Krasnov et al., 2011; Melnikova et al., 2016*). Проводили математическую обработку данных, включая расчет эффективности реакций. Для оценки достоверности изменений уровня мРНК целевого гена по сравнению с контрольными использовали критерий Уилкоксона.

Результаты. В большинстве образцов (80%, 16/20) опухоли Клатскина наблюдалось повышение экспрессии гена *RARG* от 2,5 до 18 раз. Среднее значение повышения уровня мРНК составило 5.9. Для генов того же семейства *RARA* и *RARB* изменение экспрессии при опухоли Клатскина не наблюдалось. Во всех исследуемых образцах (20/20) опухоли Клатскина показано значительное снижение уровня мРНК гена *RXRA* от 3 до 15 раз. Среднее значение понижения уровня мРНК составило 5,1. Для гена *RXRB* изменения экспрессии при опухоли Клатскина не выявлено. Уровень мРНК гена *RXRG* оказался слишком низким и чувствительность метода кПЦР не позволила его детектировать.

Заключение. Впервые проведена количественная оценка уровня мРНК генов, кодирующих ядерные рецепторы ретиноидов, при опухоли Клатскина. Показано значительно повышение экспрессии гена *RARG* и снижение уровня мРНК гена *RXRA* в большинстве исследуемых образцов. Ген *RARG* кодируют рецептор ретиноевой кислоты RAR-гамма, связывающий полностью-*транс*-ретиноевую кислоту, ген *RXRA* - рецептор Х ретиноидов RXR-альфа, связывающий 9-*цис*-ретиноевую кислоту (*Pemrick et al., 1994; Dawson et al., 2012*). Ранее уже была показана вовлеченность *RARG* и *RXRA* в онкогенез. Наблюдалось снижение экспрессии гена *RARG* при немелкоклеточном раке легкого, раке пищевода и повышение экспрессии при гепатоцеллюлярной карциноме и раке почки (*Pasquali et al., 1997; Picard et al., 1999; Lord et al., 2001*). При раке гортани и молочной железы выявлено повышение экспрессии гена *RARA (Friedrich et al., 2002; Kourelis et al., 2008; Ditsch et al., 2012)*. Снижение уровня мРНК гена *RARA* показано при немелкоклеточном раке легкого, раке желудка и щитовидной железы (*Brabender et al., 2002; Tang et al., 20*03). Полученные нами данные согласуются с данными литературы, описанными для других типов рака. Известно, что ретиноевая кислота может влиять на пролиферацию и дифференцировку клеток, посредством регуляции транскрипции многих генов, через ядерные рецепторы ретиноидов. Таким образом, нарушение экспрессии генов, кодирующих ядерные рецепторы ретиноидов, при опухоли Клатскина может быть связано с развитием и прогрессией данного заболевания.

Работа проведена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации МК-8047.2016.4. Работа выполнена на оборудовании ЦКП «Геном» ИМБ РАН (http://www.eimb.ru/rus/ckp/ccu_genome_c.php).

Список используемой литературы

Brabender J., Danenberg K.D., Metzger R., et al. The role of retinoid X receptor messenger RNA expression in curatively resected non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res. - 2002. - V. 8. - № 2. - P. 438-443.

Dawson M.I. Syntetic retinoids and their nuclear receptors. Curr Med Chem Anticancer Agents. - 2004. - V. 4. - P. 1990-230.

Ditsch N., Vrekoussis T., Lenhard M., et al. Retinoid X receptor alpha (RXRα) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARγ) expression in breast cancer: an immunohistochemical study. In Vivo. - 2012. - V. 26. - № 1. - P. 87-92.

Friedrich M., Axt-Fliedner R., Villena-Heinsen C., et al. Analysis of vitamin D-receptor (VDR) and retinoid X-receptor alpha in breast cancer. Histochem J. - 2002. - V. 34. - № 1-2. - P. 35-40.

Kourelis K., Papadas T., Vandoros G., et al. Glottic versus supraglottic tumors: differential molecular profile. Eur Arch Otorhinolaryngol. - 2008. - V. 265. - № 1. - P. 79-84.

Krasnov G.S., Oparina N.Y., Dmitriev A.A., et al. RPN1, a new reference gene for quantitative data normalization in lung and kidney cancer. Molecular Biology. – 2011. – V. 45. – P. 211-220.

Lord R.V., Tsai P.I., Danenberg K.D., et al. Retinoic acid receptor-alpha messenger RNA expression is increased and retinoic acid receptor-gamma expression is decreased in Barrett's intestinal metaplasia, dysplasia, adenocarcinoma sequence. Surgery. - 2001. - V. 129. - № 3. - P. 267-276.

Melnikova N.V., Dmitriev A.A., Belenikin M.S., et al. Identification, Expression Analysis, and Target Prediction of Flax Genotroph MicroRNAs Under Normal and Nutrient Stress Conditions. Front Plant Sci. – 2016. – V. 7. – P. 1-12.

Pasquali D., Bellastella A., Valente A., et al. Retinoic acid receptors alpha, beta and gamma, and cellular retinol binding protein-I expression in breast fibrocystic disease and cancer. Eur J Endocrinol. - 1997. - V. 137. - № 4. - P. 410-414.

Pemrick S.M., Lucas D.A., Grippo J.F. The retinoid receptors. Leucemia (Baltimore). - 1994. - V. 8. - P. 1-10.

Picard E., Seguin C., Monhoven N., et al. Expression of retinoid receptor genes and proteins in non-small-cell lung cancer. J Natl Cancer Inst. - 1999. - V. 91. - № 12. - P. 1059-66.

Tang W., Nakamura Y., Zuo H., et al. Differentiation, proliferation and retinoid receptor status of papillary carcinoma of the thyroid. Pathol Int. - 2003. - V. 53. - № 4. - P. 204-213.

ВЛИЯНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ДРАЙВЕРНЫХ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ *SDHx* НА ТРАНСКРИПТОМНЫЙ ПРОФИЛЬ ПРИ КАРОТИДНЫХ ХЕМОДЕКТОМАХ

Кудрявцева А.В.[1,2], Снежкина А.В.[1], Краснов Г.С.[1], Федорова М.С.[1], Степанов О.А.[1], Жевелюк Е.А.[1,3], Головюк А.В.[4], Покровский А.В.[4], Калинин Д.В.[4], Зарецкий А.Р.[5]

[1] Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия
[2] Национальный медицинский исследовательский радиологический центр Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия
[3] Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
[4] Институт хирургии имени А.В. Вишневского Минздрава России, Москва, Россия
[5] Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

Введение. Каротидная хемодектома (параганглиома) образуется из ткани каротидного гломуса, располагающегося в области бифуркации сонной артерии и является, главным образом, доброкачественной, медленно растущей опухолью. Однако в ряде случаев наблюдаются инфильтративный рост, метастазирование каротидных хемодектом, а также рецидивирование после хирургического лечения. В качестве основного критерия малигнизации рассматривают особенности симптоматики и морфологическую структуру клеток, однако данные системы оценки злокачественности не были полностью подтверждены. В настоящее время достигнуты большие успехи в понимании молекулярного патогенеза этой группы поражений. Обнаружено около тридцати генов (*PHD2, SDHx, IDH1, IDH2, HIF2A, Mdh 2, FH, RET, NF1, KIF1Bβ, MAX, TMEM127, GDNF, H-RAS, K-RAS, Gnas, CDKN2A (p16), p53, BAP1, BRCA1, BRCA2, ATRX*, *KMT2D* и др.) предположительно связанных с образованием и прогрессией каротидных хемодектом, но их роль в этом процессе, в частности, связь с агрессивностью течения заболевания, не до конца определена.

Целью данного исследования является изучение молекулярных и генетических эффектов различных драйверных мутаций в генах семейства *SDHx*, ассоциированных с патогенезом каротидных хемодектом.

Материалы и методы. На базе Института хирургии имени А.В. Вишневского Минздрава России сформирована коллекция из 30 образцов каротидных хемодектом. Проведено выделение ДНК из опухолевых тканей, заключенных в парафиновые блоки (FFPE), с помощью набора High Pure FFPET DNA Isolation Kit (Roche, Швейцария) с модификацией, включающей замещение первой стадии лизиса на более длительную инкубацию в FFPE Buffer Extract DNA (Евроген, Россия). Концентрацию ДНК определяли при помощи спектрофотометра ND 1000 (NanoDrop Technologies, США), качество ДНК - на приборе Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, США), а также методом количественной ПЦР (кПЦР) при помощи набора КвантумДНК-90 (Евроген, Россия). Подготовку библиотек для высокопроизводительного секвенирования экзома проводили с использованием набора Nextera Rapid Capture Exome Kit (Illumina, США). Секвенирование осуществляли на приборе NextSeq 500 System (Illumina, США) на базе ЦКП «Геном» ИМБ РАН в режиме PE 75+75 (парноконцевые прочтения по 75 циклов с каждой стороны анализируемого фрагмента библиотеки).

Результаты. Анализ данных высокопроизводительного секвенирования экзома каротидных хемодектом позволил выявить ряд потенциальных драйверных мутаций в трех генах *SDHB, SDHC* и *SDHD*. Кроме того, проведен анализ дифференциальной экспрессии генов (по данным выполненного нами ранее секвенирования транскриптома каротидных хемодектом) в зависимости от наличия выявленных мутаций в генах семейства *SDHx*. В результате получены данные, свидетельствующие в пользу того, что для образцов с мутациями в генах *SDHx* характерно: изменение механизмов регуляции клеточной миграции, организации внеклеточного матрикса, активации ангиогенеза; повышение экспрессии генов *Myc, Jun, Fos, MMPx, EGFR, DUSP6, PROM1, iNOS, Notch*; повышение экспрессии генов, кодирующих интегрины бета3, бета5, бета4, альфа10, альфа11, альфа7; тенденция к снижению активности процесса репарации ДНК; нарушения пути TGF-beta.

Заключение. Определено влияние ряда потенциальных драйверных мутаций в генах *SDHx* на транскриптомный профиль при каротидных хемодектомах. Более детальное понимание патогенеза каротидных хемодектом может помочь определить их злокачественный потенциал и идентифицировать новые молекулярные мишени для терапии этой группы опухолей.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (Проект № 16-04-01521 А) и гранта ICGEB (CRP/RUS15-01). Часть работ (выделение ДНК, высокопроизводительное секвенирование, биоинформационный анализ данных секвенирования) выполнена на оборудовании ЦКП «Геном» ИМБ РАН (http://www.eimb.ru/rus/ckp/ccu_genome_c.php).

ОВЕРЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *HK2* КОРРЕЛИРУЕТ С ПОНИЖЕННОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ микроРНК LET-7G И LET-7C ПРИ ОПУХОЛИ КЛАТСКИНА

Снежкина А.В.[1], Федорова М.С.[1], Калинин Д.В.[2], Краснов Г.С.[1], Кудрявцева А.В.[1,3]

[1]Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия
[2] Институт хирургии имени А.В. Вишневского Минздрава России, Москва, Россия
[3] Национальный медицинский исследовательский радиологический центр Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Введение. Опухоль Клатскина - это злокачественное новообразование, происходящее из эпителия внепеченочных желчных протоков в области их бифуркации. Опухоль Клатскина характеризуется бессимптомным течением на ранних стадиях, плохим прогнозом и практически не поддается лечению. Исследование молекулярно-генетических механизмов образования опухолей Клатскина является важным для развития методов ранней диагностики и таргетной терапии данного заболевания.

Целью исследования является выявление молекулярно-генетических нарушений энергетического обмена в опухолях Клатскина, в частности оценка уровня экспрессии одного из ключевых ферментов гликолиза – гексокиназы 2 и поиск потенциальных микроРНК регулирующих его экспрессию.

Материалы и методы. С помощью технологии DEPArray (Silicon Biosystems, Италия) из тканей, заключенных в парафиновые блоки (FFPE), сформирована коллекция парных образцов опухолей Клатскина. Методом количественной ПЦР (кПЦР) проведен анализ уровня мРНК гена *HK2* в 20 парных образцах опухолей Клатскина. Поиск микроРНК, для которых мишенью является мРНК гена *HK2*, проводился с использованием приложения CrossHub (https://sourceforge.net/projects/crosshub/) по пяти базам данных TargetScan, DIANA microT, mirSVR (miRanda), PicTar, и miRTarBase. Выбор потенциальных регуляторных микроРНК проводился на основе числа алгоритмов, по которым предсказан сайт посадки, а также исходя из скоринг-фактора, который отражает степень достоверности предсказания по каждому алгоритму. С целью предварительного скрининга уровня экспрессии микроРНК по сравнению с уровнем экспрессии *HK2* выполнен корреляционный анализ данных секвенирования, полученных для холангиокарционом и нормальных тканей желчных протоков на платформе Illumina, интернет-ресурса The Cancer Genome Atlas (TCGA, http://cancergenome.nih.gov/). Выбрано несколько микроРНК, демонстрирующих отрицательную корреляцию уровня экспрессии с геном *HK2* и содержащих сайт связывания с мРНК *HK2*. Для выбранных микроРНК проведено валидирование методом кПЦР на выборке из 10 парных образцов опухоли Клатскина.

Результаты. Методом кПЦР показано значительное повышение уровня мРНК гена *HK2* в 60% исследуемых образцов опухолей Клатскина. В результате биоинформатического анализа баз данных по микроРНК и интернет-ресурса TCGA выбрано несколько потенциальных микроРНК (miR-362, let-7g, miR-192, miR-23b, miR-125b-1, let-7c, miR-505), участвующих в регуляции экспрессии гена *HK2* в опухолях Клатскина. С помощью метода количественной ПЦР для двух микроРНК (let-7g и let-7c) подтверждено ожидаемое снижение экспрессии в половине исследуемых образцов. Коэффициент корреляции Спирмена между экспрессией гена *HK2* и микроРНК let-7g составил r_s = -0,18, между экспрессией *HK2* и микроРНК let-7c - r_s = - 0,29.

Заключение. Выявлено значительное повышение экспрессии гена *HK2* в опухолях Клатскина. Полученные результаты согласуются с данными литературы, описанными для других типов рака и свидетельствуют о нарушении энергетического обмена и повышении интенсивности гликолиза в опухолях Клатскина. Обнаружены две потенциальные микроРНК (let-7g и let-7c), которые могут участвовать в регуляции экспрессии гена *HK2* в опухолях Клатскина.

Работа проведена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации МК-8047.2016.4. Работа выполнена на оборудовании ЦКП «Геном» ИМБ РАН (http://www.eimb.ru/rus/ckp/ccu_genome_c.php).

DETECTION OF MOLECULAR CYTOGENETIC ABERRATIONS IN BONE MARROW CELLS IN RELAPSE OF MULTIPLE MYELOMA

Korets K.V.[1], Andreieva S.V.[2], Ruzhinskay E.E.[1]

[1] Government Institution "The scientific-practical children's cardiac center", Melnykova str. 24, Kiev, 04050, Ukraine
[2] State Institution "Institute of hematology and transfusiology NAMS Ukraine", M.Berlinskogo str. 12, Kiev, 04060, Ukraine

Introductions

Multiple myeloma (MM) is a plasma cell malignancy with acquired genetic abnormalities to play important role for prognosis of the disease. Translocation (4;14) and del(17p) correlated with adverse cytogenetic prognosis and shorter survival. However, specific chromosomal rearrangements in relapse of MM have not been investigated.

Aims and tasks

Determine the features of molecular cytogenetic rearrangements in the formation of abnormal clones of cells in the bone marrow relapse MM.

Materials and methods

The i-FISH analysis in bone marrow (BM) cells of 53 patients (aged 38-74 years) in relapse of MM were carried out. Translocations for 51 patients by kits t(4;14)(p16;q32) (IGH/

FGFR3), t(6;14)(p21;q32) (IGH/CCND3), t(11;14)(q13;q32) (IGH/CCND1), t(14;16)(q32;q23) (IGH/MAF/WWOX) and for 52 patients by kit del(17)(p13.1) (TP53) were established.

Main results

In BM cells molecular cytogenetic aberrations in y 26/53 (48,2 %) were registered. Del(17)(p13) were detected in 10/52 (19,2 %) cases. We found only one case with t(14;16) (1/51) and one case with variant t(4;14) with the presence of one fusion signal(1/51). In addition, for t(11;14) was registered atypical distribution of signals: triple - the chromosomal region 11q13 (CCND1) in 2/51samples and loss - the chromosomal region 14q32 (IgH) in 1/51. In one case decrease intensity (dmin) signal in the chromosome region 14aq32 (IGH) was found in the simultaneous presence of two or four normal signals 4p16, 6p21, 11q13, 16q23. In 16/51 samples, except normal distribution signals, doubling (four) signals t(4;14), t(6;14) t(11;14), t(14;16) were recorded that may indicate the evolution of the initial clone.

Conclusions

In 26/53 (49,0 %) cases balanced and unbalanced chromosomal rearrangements were found by i-FISH method. A low frequency of translocations compared with another investigations were registered. Atypical distribution of signals confirm the genetic heterogeneity of the disease and indicate the different ways of forming abnormal clones.

АКТИВАЦИЯ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ – НОВЫЙ ТИП БИОМАРКЕРОВ ДЛЯ НАЗНАЧЕНИЯ ТАРГЕТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ ОНКОЗАБОЛЕВАНИЯХ

Буздин А.А.[1], Сорокин М.И.[1], Глускер А.А.[1], Гаража А.В.[2], Поддубская Е.В.[3], Широкорад В.И.[4], Насхлеташвили Д.Р.[5], Баранова М.П.[3], Кашинцев К.Ю.[4], Соков Д.Г.[6], Сунцова М.В.[1], Румянцев С.А.[7], Гайфуллин Н.М.[8], Ткачев В.С.[1], Борисов Н.М.[1]

[1] Первый онкологический научно-консультационный центр, Москва, Россия
[2] Центр биогеронтологии и регенеративной медицины, Москва, Россия
[3] Клиника «Витамед», Москва, Россия
[4] Московская городская онкологическая больница № 62, Москва, Россия
[5] Клиника онкоиммунологии, Москва, Россия
[6] Онкологический клинический диспансер № 1 города Москвы, Москва, Россия
[7] Российский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия
[8] Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Введение. Таргетные противоопухолевые препараты являются новым поколением лекарств, вышедшим на авансцену в 21 веке. По сравнению со «стандартной» химиотерапией, они обладают сниженными побочными эффектами и часто – повышенной эффективностью, но также и гораздо более высокой ценой. Рынок таргетных онкопрепаратов растет и составляет десятки миллиардов долларов в год. Они специфично связывают и блокируют молекулярные мишени, играющие важную роль в развитии онкозаболеваний. Например, препарат лапатиниб блокирует белки - рецепторы эпидермального фактора роста, афлиберцепт ингибирует факторы роста эндотелия, а сорафениб подавляет многочисленные белки-тирозинкиназы с онкогенным потенциалом. Практически все белки-мишени таргетной терапии являются участниками внутриклеточных сигнальных путей. На настоящий момент, более 150 таргетных препаратов получили одобрение на клиническое применение в различных странах. При этом перед врачом стоит непростая задача выбора среди них оптимального терапевтического средства для индивидуального больного. При стандартном, неперсонализированном, подходе к назначению такой терапии для больных 3 и 4 стадий вероятность ответа в среднем не превышает 25-30%. Эффект от применяемой терапии выявляется обычно через 2-3 месяца, поэтому для 70-75% «неответчиков» теряются не только деньги, но и время, а также из-за побочных эффектов и прогрессирования опухоли ухудшаются состояние здоровья и качество жизни пациентов. Персонализированное назначение практикуется лишь для 9 таргетных препаратов при строго определенных нозологиях, как правило - при наличии определенных мутаций в опухоли. Вместе взятые, такие случаи составляют менее 5% от общего числа онкобольных продвинутых стадий. Поэтому проблема персонализации назначения таргетной терапии остается по большей части нерешенной. Мы предложили подход, названный OncoFinder, основанный на анализе активации внутриклеточных сигнальных путей как маркеров при назначении таргетной терапии. Подход был опробован в серии ретроспективных и проспективных исследований и показал эффективность ответа назначаемой таргетной терапии свыше 60% для солидных опухолей 3 и 4 стадий.

Цель и задачи. Была поставлена цель создать новое поколение онкомаркеров, основанных на уровне активации сигнальных путей, и применить их для предсказания успешности таргетной терапии онкозаболеваний.

Материалы и методы. Для разработки метода анализа активации сигнальных путей, использованы созданные нами алгоритмы скрининга тотальных профилей генной экспрессии. Алгоритмы были интегрированы с базами данных по специфичностям таргетных препаратов, а также по молекулярному составу внутриклеточных сигнальных путей, включая функциональную роль каждого генного продукта в пути. В рамках последней задачи, в составе единой системы OncoFinder были скомпилированы все сигнальные пути, содержащиеся в открытых базах данных KEGG, Reactome, SABioscences и других, всего отобрано более 1700 сигнальных путей. Система OncoFinder позволяет определять изменения в уровне активации путей у исследуемого образца по сравнению с контрольной

группой и предсказывать эффективность препаратов на основе знания их молекулярных мишеней. Система испытывалась на четырех уровнях. Для этого, использовались как литературные, так и собственные экспериментальные данные по генной экспрессии, с использованием платформ глубокого секвенирования (Illumina HiSeq, MySeq, Ion Torrent/Proton) и микрочипирования (Illumina HT-12v4, Affymetrix HG-U133_Plus_2 и CustomArray). На первом уровне, использовались данные клинических испытаний и данные по транскриптомному профилированию соответствующих видов опухолей в популяции онкобольных. На втором уровне – систему тестировали на доступной литературной информации по транскриптомам онкобольных с разным статусом ответа на таргетную терапию. На третьем уровне – система исследовалась в ходе ретроспективных испытаний на фиксированных образцах патологической ткани (парафиновые блоки) пациентов с раком почки с известным статусом ответа на таргетную терапию. Наконец, на четвертом уровне, технология OncoFinder тестировалась в ходе проспективных исследований, где она использовалась в качестве «системы второго мнения» при принятии решений по назначению терапии.

Основные результаты. Нам удалось создать оригинальную биоматематическую систему для анализа активации внутриклеточных сигнальных путей (Ozerov et al., Nature Communications 2016; Buzdin et al, Front.Genet. 2014). Мы показали, что активация сигнальных путей является существенно более качественным онкомаркером, чем уровни экспрессии отдельных генов (Borisov et al, Oncotarget 2014). На основе глубокого анализа баз данных, мы сформулировали подходы к использованию активации сигнальных путей как маркеров ответа на таргетную терапию (Venkova et al, Oncotarget 2014; Artemov et al., Oncotarget 2015). Мы применили эти подходы для поиска маркеров ответа на препарат *цетуксимаб* (Zhu et al, Human Genome Variation 2015), при моделировании комбинированной таргетной терапии для острого миелобластного лейкоза (Spirin et al., Leukemia 2014) и комбинированной *анти-VEGF/BRAF* терапии при меланоме (Comunanza et al, EMBO Molecular Medicine 2016). По опубликованным результатам клинических испытаний для 5 различных таргетных препаратов и 7 нозологий, нам удалось коррелировать активацию сигнальных путей – маркеров с клиническим ответом на терапию с коэффициентом корреляции 0.77, p=0.023 (Artemov et al., Oncotarget 2015). По двум наборам данных по препарату *бевацизумаб* при раке толстой кишки, при помощи системы OncoFinder, мы смогли разделить ответчиков и неответчиков на терапию с критериями статистической значимости p=0.01 и p=0.004 (по Вилкоксону). При слепых ретроспективных исследованиях, удалось разделить больных раком почки, ответивших и неответивших на терапию препаратом *сорафениб*, с критерием p=0.02. Наконец, в ходе проспективных исследований, где OncoFinder использовался в качестве системы «второго мнения» при назначении препаратов больным с солидными опухолями на продвинутых стадиях (n=23), успешность назначенной терапии составила 61% (полный+частичный ответ, RECIST), или 79% (полный+частичный ответ+стабилизация, RECIST).

Заключение. Разработанный нами подход позволяет создавать новые, более ценные прогностические и диагностические маркеры онкозаболеваний. Технология OncoFinder также применима для оценки эффективности таргетных противоопухолевых препаратов для индивидуальных пациентов. Опыт применения в качестве системы «второго мнения» показывает достаточно высокую эффективность данного подхода: 61% (полный+частичный ответ), или 79% (полный+частичный ответ+стабилизация). Адрес проекта в Интернете: www.ponkc.com

КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ BRCA-АССОЦИИРОВАННОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ПАЦИЕНТОК САМАРСКОГО ОНКОДИСПАНСЕРА

Торопова Н.Е., Закамова Е.В.

ГБУЗ «Самарский областной клинический онкологический диспансер», Самара, Россия

Хорошо известно, что герминальные мутации генов BRCA I и BRCA II увеличивают риск развития рака молочной железы (РМЖ) и рака яичника (РЯ) с высокой степенью пенетрантности. Риск развития наследственного РМЖ у женщин 70 лет достигает 80%. Характерными особенностями BRCA I-ассоциированного РМЖ являются: молодой возраст больных; билатерный РМЖ или РМЖ и рак яичника; высокая частота первично-множественного рака (ПМР); отсутствие гормональных рецепторов и HER2 в опухолевых клетках, т.е. триплетнегативный рак молочной железы (ТНРМЖ); высокая степень злокачественности. У больных раком желудка, поджелудочной железы, раком предстательной железы обнаруживаются эти герминальные мутации с частотой от 4 до 7%. BRCA – ассоциированный ТНРМЖ – крайне агрессивная форма опухоли с высоким уровнем метастазирования, среди отдаленных метастазов наиболее вероятно метастазирование в головной мозг и легкие, менее вероятно - в кости и печень. Изучается чувствительность к платино-содержащей химиотерапии при BRCA-ассоциированных метастатических опухолях. Соединения платины вызывают двунитевые разрывы ДНК и в клетках с нарушенной репарацией ДНК – это направление к ее гибели. Ингибиторы PARP (поли (АДФ-рибоза) полимераза) блокируют путь репарации однонитевого разрыва ДНК и приводят к апоптозу в BRCA - дефицитных опухолевых клетках, которые уже имеют дефицит в гомологичной репарации. Поэтому исследование герминальных мутаций у больных РМЖ является важным с точки зрения оценки степени агрессивности опухоли, прогноза заболевания, а также выбора наиболее эффективного способа лечения.

Цель исследования – провести анализ частоты встречаемости герминальных мутаций у больных РМЖ и определить клинико-морфологические характеристики

рака молочной железы у пациенток – носителей наследственных мутаций BRCA I/II.

Материалы и методы. Исследовали герминальные мутации у 438 больных РМЖ методом ПЦР в режиме реального времени с помощью наборов реагентов для выявления мутаций в генах BRCA1 и BRCA2 производства ООО «БиоЛинк» г. Новосибирск с использованием термоциклера iCycler iQ5 (Bio-Rad). В качестве образцов для исследования использовали периферическую кровь, взятую в микроветы Microvette Sarstedt (Германия) с антикоагулянтом калий3-ЭДТА. ДНК выделяли сорбционным методом при помощи набора реагентов «АмплиПрайм ДНК-сорб-В» производства ООО «НекстБио». Определяли 5 наиболее часто встречаемых в славянской и европейской популяции герминальных мутаций: 5382insC (BRCA1); T300G (BRCA1); 185delAG (BRCA1); 4153delA (BRCA1); 6174delT (BRCA2).

Результаты. Проведенные нами исследования показали, что герминальные мутации BRCA I обнаруживаются у 4,3% (19 из 438 человек) больных РМЖ, пролеченных в диспансере. Согласно данным литературы частота мутаций у больных РМЖ и яичников, не дифференцированных по признаку наследственности, составляет 1-7% для BRCA1, 1-3% для BRCA2. Средний возраст больных BRCA-ассоциированным РМЖ составил 41 год, при этом 80% женщин были моложе 40 лет, 89,5% больных с мутацией BRCA (17 из 19) – имели ТНРМЖ. Среди обследованных пациенток мутации в гене BRCA2 не обнаружены.

Подавляющая часть обнаруженных нами мутаций BRCA - это инсерции 5382insC, которая встречается у 90% больных наследственным РМЖ. По данным многочисленных работ отечественных и зарубежных авторов данный вид мутации встречается у 74,6% больных наследственным РМЖ. Мутация с заменой цистеина на глицин в 61 кодоне - 300T>G (C61G) часто встречается во многих странах со славянским населением (7%). Мы обнаружили эту мутацию у 10,5% больных. Делецию – 4153delA, распространенную в РФ и странах восточной Европы, мы пока не обнаружили. Делеция185 delAG, типичная для евреев Ашкенази, у обследованных пациенток не выявлена.

8 из 19 (42,1%) больных BRCA-ассоциированным РМЖ имели первично-множественный рак, включая контралатеральный РМЖ и синхронный билатеральный с мультифокальным ростом. Все пациентки с метахронным и синхронным РМЖ имели триплетнегативный тип, 16 из 17 больных (84%) ТНМЖ имели инсерцию 5382.

В клинических рекомендациях ESMO по диагностике, лечению и наблюдению больных раком молочной железы с наличием BRCA-мутаций отмечено, что отсутствие мутации BRCA1/2 считается прогностическим фактором химиочувствительности опухоли. В настоящее время изучается чувствительность BRCA ассоциированных метастатических опухолей к платино-содержащей химиотерапии по сравнению с таксан-содержащими режимами. Ингибиторы PARP используются как единственные терапевтические агенты для пациентов с BRCA-ассоциированным раком молочной железы и яичников.

В настоящее время нет четких рекомендаций по лечению больных наследственным РМЖ с экспрессией рецепторов гормонов и факторов роста II типа. Большинство авторов используют те же лечебные подходы к BRCA-ассоциированным ракам, что и к спорадическим.

Выводы

1. Частота мутаций BRCAI у больных РМЖ, пролеченных в Самарском онкодиспансере, не дифференцированных по признаку наследственности, составляет 4,3%, что согласуется с данными отечественных и зарубежных авторов.

2. 80% больных BRCA-ассоциированным РМЖ были моложе 40 лет и имели триплетнегативный РМЖ. 42% больных с BRCA-ассоциированным РМЖ имели первично-множественный рак, включая контрлатеральный РМЖ и синхронный билатеральный с мультифокальным ростом.

3. Инсерция 5382insC - наиболее часто обнаруживаемая у больных РМЖ мутация BRCA.

ОПЫТ ГЛУБОКОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ ДНК КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО

Иванов М.В.[1,2,3], Лактионов К.К.[4], Бредер В.В.[4], Черненко П.А.[4], Баранова А.В.[2,5,6], Стрельников В.В.[5], Милейко В.А.[2,3]

[1] ФГАУ ВО «Московский физико-технический институт» (ГУ)
[2] Биомедицинский холдинг «АТЛАС»
[3] ФГБУ «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» СО РАН
[4] ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина»
[5] ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»
[6] School of systems biology, George Mason University
e-mail: maksim.v.ivanov@phystech.edu

Введение

Циркулирующая ДНК (цДНК), которая попадает из опухоли в кровоток, является перспективным источником диагностического материала. Однако при глубоком исследовании генетических маркеров цДНК возникает целый ряд методических сложностей и проблем в клинической интерпретации.

Цель и задачи

Оценить возможности метода глубокого таргетного секвенирования (NGS) для определения молекулярного профиля опухоли, используя цДНК в качестве биологического материала. Оценить возможность повышения аналитической и диагностической чувствительности за счет использования коротких ампликонов для обогащения по целевой ДНК.

Материалы и методы

Циркулирующая ДНК была выделена из образцов плазмы 12 пациентов с диагнозом аденокарцинома легкого и подтвержденным статусом носительства мутации L858R или делеции 19 экзона EGFR (Therascreen EGFR RGQ PCR Kit; Qiagen, Milan, Italy). Высокопроизводительное секвенирование выполнено с помощью таргетной панели AmpliSeq Cancer Hotspot (CHP2) на платформе Ion Torrent PGM а также двух специализированных панелях AODCP и AODLP также использующих технологию ампликонного обогащения по целевой ДНК. Медиана длины ампликона вместе с праймерными последовательностями составила 156, 137 и 136 н.п. для панелей CHP2, AODCP и AODLP соответственно. Средняя глубина покрытия составила не менее 1000X.

Основные результаты

У 10 из 12 пациентов (83%) при анализе цДНК удалось обнаружить мутации EGFR, выявленные в операционном материале. При этом у одного пациента была подтверждена двойная мутация (в 19 и 21 экзонах), обнаруженная также и при анализе опухоли, а у одного пациента в дополнение к мутации в 21 экзоне при анализе цДНК была дополнительно обнаружена делеция 19 экзона, что может быть причиной как внутри-, так и межопухолевой гетерогенности. Сопутствующие мутации были выявлены в генах KIT, PIK3CA, TP53, ALK и др., многие из которых в литературе описаны как значимые для оценки прогноза и эффективности как ИТК EGFR, так и прочих препаратов. Было установлено, что диагностическая чувствительность сильно зависит от общей концентрацией циркулирующей ДНК в плазме. Так все два образца для которых не удалось обнаружить мутации EGFR при анализе цДНК имели наименьшую концентрацию ДНК (менее 15 нг/мл). Частота мутантной аллели мутаций EGFR на фоне аллели дикого типа варьировалась в диапазоне от 0,4% до 91%. У образца с частотой мутантной аллели 91% была обнаружена амплификация EGFR как при анализе опухоли (методом NGS), так и при анализе цДНК (методом NGS), что свидетельствует о возможности детектирования амплификаций. Корреляции концентрации ДНК в плазме с аналитической чувствительностью обнаружено не было для всех трех панелей. С целью оценки влияния длины ампликона на диагностические и аналитические характеристики были попарно сравнены результаты секвенирования с использованием панелей CHP2 и AODCP, а также CHP2 и AODLP. Качественные результаты детектирования мутаций при сравнении не отличались, что свидетельствует об одинаковой диагностической чувствительности и специфичности. Корреляции частоты мутантной аллели на фоне аллели дикого типа одних и тех же вариаций, наблюдаемая разными панелями составила 0.99 для полиморфизмов, 0.88 для точечных соматических замен и 0.82 для делеций 19 экзона EGFR (для 90% мутаций длина делеции превышала 15 н.п.). При попарном сравнении мутантной аллели делеций EGFR статистически значимого повышения аналитической чувствительности обнаружено не было (среднее геометрическое отношения составило 1.16; 95% ДИ, 0.72-1.88 с трендом в сторону повышения аналитической чувствительности при использовании большей длины ампликона).

Заключение/выводы

Полученные результаты свидетельствуют о перспективах внедрения технологии NGS для исследования циркулирующей ДНК. Недостаточная чувствительность потенциально может быть преодолена за счет получения большего объема плазмы крови, или путем дополнительной амплификации цДНК. Удалось реализовать важное преимущество NGS - были выявлены некоторые известные клинически значимые мутации. В то же время, остается нерешенным вопрос о корректной интерпретации таких находок. Самостоятельной проблемой является анализ данных секвенирования, так как не существует специализированных решений для эффективной детекции делеций средней длины и SNV при ультра-низких уровнях относительного содержания. В целом, результаты указывают на перспективность использования NGS в анализе цДНК для получения информации о труднодоступных очагах и мониторинга динамики молекулярных изменений в ходе лечения.

FISH-МЕТОД В ОНКОЦИТОЛОГИИ

Славнова Е.Н.

ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена», Минздрава РФ, Москва, Россия

Введение. Метод флюоресцентной in situ гибридизации (FISH- метод) успешно применяется в онкологии для установления типа лимфом, гистогенеза сарком, в диагностике рака мочевого пузыря, меланом, определении амплификации гена HER2, гена EGFR. Наше отделение располагает уникальным материалом по определению амплификации гена HER2 для назначения таргетной терапии герцептином.

Цель исследования – определить возможности проведения флюоресцентной in situ гибридизации для определения амплификации гена HER2 на предоперационных тонкоигольных аспирационных биоптатах рака молочной железы, а также для диагностики сарком, лимфом и перестройки гена *ALK* при аденокарциномах легких.

Материалы и методы. Цитологическим, иммуноцитохимическим и FISH-методом исследовали аспирационные тонкоигольные биоптаты 145 больных инвазивным протоковым раком молочной железы, 8 сарком, 10 лимфом, проходивших лечение в МНИОИ им.П.А.Герцена. Клеточный материал пунктата помещали в специальную питательную среду накопления и центрифугировали в режиме 1000 об./мин в течение 5 мин для получения жидкостных препаратов. При наличии в мазках достаточного количества исследуемого клеточного материала (не менее 300 клеток), проводили ИЦХ реакцию и FISH-реакцию с моноклональными антителами (DAKO) к рецепторам эстрогенов (РЭ), прогестерона (РП), онкопротеину HER2/neu (C-erbB-2). Для FISH-реакции использовали коммерческий набор HER2FISH («Dako»).

Результаты. В 22 наблюдениях иммуноцитохимически определялась гиперэкспрессия антител HER-2/neu (+++), в 46 – реакция расценена как умеренно выраженная (++), в 27 – ИЦХ реакция была слабой интенсивности (+) и в 50 – экспрессия отсутствовала (0). При проведении FISH-реакции во всех наблюдениях гиперэкспрессии HER-2/neu (+++) обнаружена амплификация гена HER-2/neu, при отрицательной и слабо положительной экспрессией антител амплификация не выявлена. В группе умеренно выраженной экспрессиии (++) амлификация обнаружена в 21 из 46 опухолей.

Заключение. Таким образом, исследование показало возможность выполнения FISH-метода для определения амплификации гена HER-2/neu на цитологических препаратах до начала какого-либо лечения и необходимость ее проведения при умеренно выраженной (++) иммуноцитохимической экспрессии HER-2/neu.

NEXAPROOF: ВОСЬМИГЕННАЯ ЭКСПРЕССИОННАЯ «ПОДПИСЬ» ПРЕДСКАЗЫВАЕТ ОТВЕТ НА СОРАФЕНИБ У ПАЦИЕНТОВ С РАКОМ ПОЧКИ

Сунцова М.В.[1], Сорокин М.И.[2], Анисенко А.Н.[1], Широкорад В.И.[3], Кашинцев К.Ю.[3], Соков Д.Г.[4], Румянцев С.А.[5], Ткачев В.С.[1], Борисов Н.М.[1], Буздин А.А.[2], Гаража А.В.[1]

[1] Центр биогеронтологии и регенеративной медицины, Москва, Россия
[2] Первый онкологический научно-консультационный центр, Москва, Россия
[3] Московская городская онкологическая больница № 62, Москва, Россия
[4] Онкологический клинический диспансер № 1 города Москвы, Москва, Россия
[5] Российский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

Введение. Таргетный противоопухолевый препарат *сорафениб* (*нексавар*) подавляет молекулярные мишени - тирозинкиназные белки с высоким онкогенным потенциалом, такие, как FGFR1, KDR, RET и другие. Препарат стандартно применяется при опухолях почки, печени, щитовидной железы, а также при многих других нозологиях используется как экспериментальная терапия. Глобальный рынок препарата растет и составляет более миллиарда долларов в год. Препарат является дорогостоящим и обладает серьезными побочными эффектами. На сегодня, не существует способов персонализации назначения сорафениба пациентам. Более чем в половине случаев, это приводит к неэффективному назначению препарата, что конвертируется в потерю времени, денег и развитие побочных эффектов без выраженного противоопухолевого действия. Поэтому решение проблемы персонализации назначения сорафениба является чрезвычайно важным с медицинской, социальной и экономической точек зрения. Для решения этой проблемы, мы предложили подход, основанный на анализе активации внутриклеточных сигнальных путей как маркеров при назначении сорафениба. На основании одного из маркерных сигнальных путей, была создана характеристическая восьмигенная «подпись», с высокой достоверностью предсказывающая ответ больного раком почки на таргетную терапию сорафенибом.

Цель и задачи. Для предсказания успешности таргетной терапии онкозаболеваний препаратом сорафениб, была поставлена цель создать молекулярно-диагностическую панель, основанную на анализе активации сигнальных путей.

Материалы и методы. Для разработки метода анализа активации сигнальных путей, использованы созданные нами алгоритмы скрининга тотальных профилей генной экспрессии. Алгоритмы были интегрированы с базами данных по молекулярному составу внутриклеточных сигнальных путей, включая функциональную роль каждого генного продукта в пути.

Сигнальные пути регулируют все основные процессы, связанные с клеточным ростом, делением и дифференцировкой, а также с программируемой клеточной гибелью. Каждый сигнальный путь образован десятками или сотнями взаимодействующих друг с другом генных продуктов. В ходе таких взаимодействий, происходит усиление и проведение сигнала, например – от поверхности клетки в ядро. Эффектами активации сигнальных путей могут быть активация транскрипционных факторов и изменение генной экспрессии, изменение структуры цитоскелета и формы клеток, подготовка клетки к делению или к смерти. Все онкозаболевания связаны с неконтролируемым ростом опухолевых клеток, что обусловлено патологически измененной регуляцией десятков сигнальных путей. Каждый такой измененный сигнальный путь выполняет определенную функцию в опухолевой клетке. Например, усиленный путь фактора гипоксии HIF1 инициирует прорастание сосудов и смену метаболических программ опухолевых клеток. Путь рецептора эпидермального фактора роста EGFR отвечает за активизацию роста и клеточного деления. Путь, связанный с протеинкиназами AKT, блокирует апоптоз, увеличивает синтез белка в клетке и усиливает захват глюкозы из кровотока. Каждый путь образован многими взаимодействующими генными продуктами, и если и не каждый такой генный продукт, то многие из них, взятые по отдельности, способны приводить к усилению всего пути. При этом, повышение активности одних компонентов пути может компенсироваться снижением активности других, а понимание уровня активации всего пути требует появления новых аналитических подходов. Мы использовали математический аппарат системы OncoFinder, которая позволяет определять изменения в уровне активации путей по сравнению с контрольной группой. Для проведения исследований, для группы пациентов с раком почки, ответивших (n=10) и не ответивших (n=13) на терапию, было проведено широкомасштабное профилирование генной экспрессии с использованием микрочипирования на

платформах Illumina HT-12v4 и CustomArray. В качестве источника биоматериала, брали фиксированные образцы патологической ткани (парафиновые блоки) пациентов с раком почки, верифицированные гистологическим исследованием.

Основные результаты. Мы создали оригинальную биоматематическую систему для анализа активации внутриклеточных сигнальных путей (Ozerov et al., Nature Communications 2016; Buzdin et al, Front.Genet. 2014). Мы показали, что активация сигнальных путей является более качественным онкомаркером, чем уровни экспрессии отдельных генов (Borisov et al, Oncotarget 2014). На основании полнотранскриптомных профилей опухолевой ткани почек ответчиков и неответчиков на терапию, мы обнаружили ряд маркерных сигнальных путей. Для пути, являющегося наиболее качественным маркером (AUC=0.92), нами были выбраны восемь входящих в него наиболее информативных маркерных генных продуктов. Они были объединены в восьмигенную «подпись», для которой, аналогично сигнальным путям, определяли уровень активации. Мы показали, что созданная «подпись» смогла разделить группы ответчиков и неответчиков на терапию сорафенибом с критерием статистической значимости p=0.011 (по Вилкоксону). При этом ни один из входящих в подпись генных продуктов сам по себе не мог статистически значимо ($p<0.05$) разделять группы ответчиков и неответчиков на терапию. На основе этих данных, нами была создана диагностическая панель, названная NexaProof. Панель включает в себя набор праймеров и реагентов для определения уровней экспрессии генов, формирующих восьмигенную подпись, методом ОТ-ПЦР в реальном времени. В качестве источника биоматериала используются парафиновые блоки патологической ткани. Панель снабжена программным обеспечением и возможностью удаленного обслуживания в Интернете для загрузки данных, получения и анализа результата исследования. Исследование обладает высокой чувствительностью (0.89), специфичностью (0.96), сравнительно невысокой стоимостью и занимает не более 5 рабочих дней. Кроме того, наши предварительные исследования свидетельствуют о том, что панель NexaProof может быть применима и для других нозологий (рак печени, рак головы и шеи и др.)

Заключение. Была разработана диагностическая панель NexaProof, позволяющая быстро и эффективно предсказывать успешность применения терапии препаратом сорафениб (нексавар) для больных раком почки. В будущем, в ходе дополнительных исследований, список клинических показаний диагностической панели может быть расширен.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ SNP rs 662 ПАРАОКСОНАЗЫ 1 *(PON1)* НА ПОКАЗАТЕЛИ МЕТАБОЛИЗМА ЖЕЛЕЗА И ЛИПИДОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЖЕНЩИН С ДИАГНОЗОМ «ЭНДОМЕТРИОИДНАЯ АДЕНОКАРЦИНОМА»

Иванова Т.И., Полуэктова М.В., Хорохорина В.А., Чиркова Т.В., Мкртчян Л.С., Сыченкова Н.И., Рябченко Н.И., Крикунова Л.И.

МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава РФ, Обнинск, Россия

Введение. Актуальность проводимых исследований обусловлена ростом онкологических заболеваний органов женской репродуктивной системы, прирост которых в 2015 г. по сравнению с 2005 г. составил 56% (Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В., 2017). Среди эндогенных факторов в развитии злокачественных заболеваний большое значение имеет генетическая предрасположенность, поэтому важно определить аллельные варианты генов, лежащие в основе этих заболеваний. Известно, что риск возникновения рака эндометрия возрастает в 2-3 раза в условиях метаболического синдрома, что диктует необходимость изучения молекулярно-генетических механизмов заболеваний эндометрия на фоне метаболического синдрома (Rosato V., et al., 2011, Александровский Я.А., 2002). Имеются данные о том, что риск эстрогенозависимых раков сопряжён с определенными аллелями генов, участвующих в метаболизме железа и липидов (Gannon et al., 2011; Marques et al., 2014). Однако, в литературе до сих пор отсутствовали данные о роли SNP rs 662 параоксоназы 1 (*PON1*) в патогенезе злокачественных заболеваний матки, его влиянии на метаболизм железа и липидов при данной патологии. Известно, что параоксоназа 1 обладает антиоксидантной активностью, препятствуя окислению липидов и липопротеидов низкой плотности, ассоциирована с липопротеидами высокой плотности (GeneCards). Эндометриоидная аденокарцинома сопровождается повышенным уровнем эстрогенов в сочетании с низким содержанием прогестеронов, ассоциирована с ожирением, оксидативным стрессом и неоплазиями, стимулированными повышенной экспрессией эстрогенов, ей часто предшествует гиперплазия эндометрия (Abal M., et al., 2006). Ранее нами была показана ассоциация изоформ Е2 аполипопротеина Е и rs 662 *PON1* с эндометриоидной аденокарциномой (Иванова Т.И., с соав., 2014; Ivanova T.I., et al., 2015). Установлено, что метаболический синдром обостряется у больных носительниц аллели Е2, у которых наблюдаются повышенные показатели ИМТ и сывороточного железа (Иванова Т.И., с соав., 2014).

Целью данной работы была оценка значимости SNP rs 662 *PON1* для процессов метаболизма железа и липидов, протекающих у больных раком тела матки на фоне/без гиперплазии эндометрия.

Материал и методы. Объектом исследования была периферическая кровь больных с морфологически верифицированной эндометриоидной аденокарциномой тела матки I стадии (T1NoMo), развившейся на фоне гиперплазии эндометрия (РЭ+ГЭ, 42 человека в возрасте от 28 до 76 лет) и без неё (РЭ, 78 человек в возрасте от 37 до 75 лет), а также здоровых женщин (46 человек в возрасте от 40 до 78 лет). Биохимические исследования сыворотки крови проводились в группе клинической биохимии

отделения лабораторной диагностики МРНЦ им. А.Ф.Цыба на автоматическом анализаторе «OLYMPUS AU - 400». Биохимический спектр крови включал определение рутинных показателей метаболизма железа и липидов: ферритин, железо сыворотки, общая железосвязывающая способность (ОЖСС), процент насыщения трансферрина железом, трансферрин, холестерин, триглицериды, липопротеины высокой плотности (ЛПВП), липопротеины низкой плотности (ЛПНП), липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП), коэффициент атерогенности. Для генотипирования аллели Q192R *PON1* (rs 662) использовали методику полимеразной цепной реакции с последующим рестрикционным анализом. Статистический анализ проводили с помощью пакета программ «GraphPad Prism7» и MedCalc 12.2.1.0.

Результаты. При изучении корреляций SNP rs 662 *PON1* с биохимическими показателями сыворотки показано, что уровень ЛПВП у носительниц минорной аллели (G) значимо понижен по сравнению с мажорной аллелью (A) – соответственно 1,36±0,7 и 1,57±0,6 (p=0,03), а индекс массы тела значимо повышен в группе здоровых женщин: соответственно 28,9±1,1 и 24,8±0,62 (p=0,002) (Таблица 1). У больных РЭ+ГЭ носительниц минорной аллели по сравнению с генотипом A/A наблюдается значимое повышение ИМТ: 33,79±0,98 и 28,10±1,12 (p=0,02); и тенденция к понижению ЛПВП: 1,32±0,08 и 1,46±0,08 (p=0,06). Показатели метаболизма железа указывают на выраженную железодефицитную анемию у больных раком эндометрия без сопутствующей гиперплазии носительниц генотипов (A/G+G/G) *PON 1,* у которых уровень железа значимо понижен по сравнению с носительницами мажорного генотипа A/A: 12,23±0,86 и 16,03±0,99 соответственно (p=0,007). Обнаруженная закономерность представляет большой интерес, так как рак эндометрия ассоциирован с ожирением, анемией и окислительным стрессом.

Таблица 1. Влияние rs 662 *PON1* на сывороточное железо, ЛПВП, ИМТ больных и здоровых женщин (n – число обследованных, p – уровень значимости)

Генотипы *PON1* (rs 662)	Здоровые A/A(n =24) A/G+G/G (n =22)		РЭ+ГЭ (Т1) A/A (n =23) A/G+G/G (n =19)		РЭ (Т1) A/A (n =45) A/G+G/G (n = 33)	
	среднее±SE	p	среднее±SE	p	среднее±SE	p
ИМТ						
A/A	24,8±0,62	0,002	28,10±1,12	0,016	34,3±1,02	0,76
A/G+G/G	28,9±1,1		33,79±0,98		33,4±1,18	
Сывороточное железо, мкмоль/л						
A/A	17,65±1,45	0,26	15,97±1,68	0,61	16,03±0,99	0,007
A/G+G/G	15,48±1,19		17,51±2,6		12,23±0,86	
ЛПВП, ммоль/л						
A/A	1,57±0,6	0,03	1,46±0,08	0,06	1,38±0,5	0,65
A/G+G/G	1,36±0,7		1,32±0,08		1,35±0,5	

Выводы. Минорная аллель rs 662 PON1 сопряжена с повышенным ИМТ при РЭ+ГЭ (p=0,02) и у здоровых женщин (p=0,002), а также с пониженными показателями сывороточного железа у больных РЭ (p=0,007) и ЛПВП у здоровых женщин (p=0,03), что может являться генетическим фактором, предрасполагающим к развитию рака тела матки. Представленная работа вносит определённый вклад в понимание этиологических факторов рака эндометрия и позволяет выявлять группу высокого канцерогенного риска среди больных гиперпролиферативными процессами эндометрия.

ИНФОРМАТИВНОСТЬ ВЫЯВЛЕНИЯ МОЛЕКУЛ MICA В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Абакушина Е.В.[1], Абакушин Д.Н.[2]

[1] МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, Обнинск, Россия
[2] ООО «Клиника № 1», Обнинск, Россия

Введение. На сегодняшний день в клинической практике используется достаточно большой спектр молекул, которые выявляют при онкологических заболеваниях. В конце 90-х годов группой американских исследователей были обнаружены стресс-индуцированные молекулы MICA (MHC class I polypeptide-related chain A) родственные молекулам MHC класса I. Они появляются на поверхности опухолевых клеток при трансформации и служат одним из главных «маркеров опасности». В результате распознавания данных молекул цитотоксическими лимфоцитами через активирующий рецептор NKG2D опухолевые клетки уничтожаются. Избегая распознавания и элиминации злокачественные клетки сбрасывают со своей поверхности эти молекулы в результате чего, они могут появляться в сыворотке крови онкологических больных, что приводит к ослаблению иммунного ответа и росту опухоли. Таким образом, оценка уровня данных молекул может

служить одним из диагностических тестов при опухолеобразовании.

В диагностике различных заболеваний для характеристики информативности методов исследования служат объективные параметры, которые называются операционными характеристиками исследования или теста. К одним из важнейших операционных характеристик метода диагностики относятся: чувствительность и специфичность. Целью данного исследования было определение информативности теста по выявлению сывороточных молекул MICA у онкологических больных.

Материалы и методы. С помощью ИФА проанализирован уровень молекул MICA в сыворотке крови 240 онкологических больных, из которых 155 человек с солидными опухолями и 85 человек с лимфопролиферативными заболеваниями (ЛПЗ). Группу здоровых доноров составили 60 человек.

Результаты. В результате проведенного исследования показано, что количество стресс-индуцированных молекул MICA многократно возрастает в сыворотке крови у онкологических больных как с солидными опухолями, так и с лимфопролиферативными заболеваниями. У контрольной группы данный показатель был минимальным и не превышал 100 пг/мл в большинстве случаев. Среди онкологических больных выявлены больные с различным уровнем стресс-индуцированных молекул MICA. У пациентов с высоким сывороточным содержанием молекул MICA обнаружено подавление функциональной активности цитотоксических лимфоцитов NK-клеток и CD8+лимфоцитов за счет снижения экспрессии активирующего рецептора NKG2D, что может способствовать усугублению течения онкологического заболевания.

При оценке информативности данного диагностического теста показано, что среди 155 больных с солидными опухолями, у которых средний уровень MICA достоверно отличается от контрольной группы, чувствительность метода составила 41,3%. Среди больных с ЛПЗ чувствительность была выше и составила 64,6%. У больных на поздних стадиях заболевания чувствительность теста выше, чем у больных с минимальными признаками заболеваниями. В данном исследовании показано, что более 40% больных с солидными опухолями и более 60% больных ЛПЗ можно выявить только при помощи оценки концентрации MICA. В то же время, если высокочувствительный тест оказывается отрицательным, то наличие заболевания маловероятно. Поэтому его следует применять для исключения заболеваний. Однако, следует отметить, что высокочувствительный тест дает много «ложных тревог», что требует дополнительных исследований и дальнейших обследований для подтверждения диагноза.

Специфичность – это способность диагностического метода не давать при отсутствии заболевания ложноположительных результатов, то есть это доля тех пациентов, у которых тест отрицателен, среди всех обследованных, не имеющих болезни. Также это является мерой вероятности правильного выявления людей, не имеющих болезни, с помощью данного теста. В клинике тест с высокой специфичностью важен для включения диагноза в число возможных в случае положительного результата. Определив специфичность, можно априори предполагать, какова доля здоровых лиц, у которых данное исследование даст отрицательный результат. Чем выше специфичность метода, тем надежнее с его помощью подтверждается заболевание, и тем, следовательно, он более эффективен. В работе показано, что среди всех онкологических больных по сравнению с группой здоровых добровольцев специфичность метода была достаточно высокой и составила 96,7%. Высокоспецифичные методы называются в диагностике дискриминаторами. Показано, что данное диагностическое исследование эффективно на втором этапе диагностики, когда сужен круг предполагаемых больных и необходимо с большой уверенностью доказать наличие злокачественного новообразования.

Чувствительность и специфичность диагностического метода не являются постоянными величинами для разных категорий пациентов. В данном случает определение sMICA, лигандов NKG2D, может в большей степени служить для подтверждения диагноза, а не для ранней диагностики заболевания.

Прогностичность теста как в скрининге, так и в диагностике – это вероятность того, что пациент с положительным результатом обследования действительно болен, а прогностичность отрицательного результата обследования – это вероятность того, что пациент с отрицательным результатом не имеет данного заболевания. В работе показано, что среди больных с солидными опухолями и лимфопролиферативными заболеваниями прогностичность положительного результата была высокой и составила 97,0% и 96,5%, соответственно.

Заключение. Таким образом, в результате работы показано, что выявление молекул MICA в сыворотке крови пациентов является высокоспецифичным метом диагностики и характеризуется высокой прогностичностью положительного результата. При положительных результатах исследования велика вероятность наличия болезни как при солидных опухолях, так и при лимфопролиферативных.

ИЗМЕНЕНИЕ КОПИЙНОСТИ ГЕНОВ ПРИ АДЕНОКАРЦИНОМЕ ЖЕЛУДКА

Тимошкина Н.Н., Водолажский Д.И., Маслов А.А., Татимов М.З., Колесников Е.Н.

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия

Введение. Рак желудка (РЖ) – гетерогенное заболевание, занимающее пятое место по распространенности и третье место по смертности среди злокачественных новообразований [1]. Изменение копийности генов (copy number variation - CNV) - один из ключевых механизмов онкогенеза, так как результатом этого генетического полиморфизма может стать снижение или повышение экспрессии онко-ассоциированных генов. Накопленные данные последних лет свидетельствуют о широком распространении CNV в неопластических образованиях желудка

[2]. Идентификация CNV в хромосомной и/или митохондриальной ДНК может помочь в диагностике, прогнозе и целевой терапии РЖ.

Цель настоящего исследования заключалась в изучении относительной копийности (RCQ) 16-ти ядерных генов - участников ключевых сигнальных путей, регулирующих рост клетки, выживание, метастазирование и устойчивость к химиотерапии (*APC, AURKA, CCND1, C-MYC, GKN1, GSTP1, HER2, IRX1, MDM2, MET, NFKB, OCT1, P53, PIK3CA, POU5F1B* и *S6K2*), и некодирующего локуса *HV2* мтДНК, потеря копийности которого является наиболее распространенным событием при неоплазиях различной локализации.

Материалы и методы. Исследовали образцы опухолевой и условно нормальной ткани желудка 47-ми пациентов (33 мужчины и 14 женщин, медиана возраста - 67 лет) с гистологически подтвержденным диагнозом рак желудка - G2-3 аденокарцинома, из которых 18 образцов классифицированы как $T_{3-4}N_0M_0$, 29 случаев - с регионарными метастазами $T_{3-4}N_{1-2}M_0$. Относительную копийность генетических локусов определяли методом ПЦР-РВ в присутствии локус-специфичных праймеров собственного дизайна как было описано ранее [3]. Дозу исследованного локуса считали увеличенной или уменьшенной, если отношение $RCQ_{опухоль}/RCQ_{норма}$ было $\geq 1,5$ или $\leq 0,5$, соответственно.

Результаты. В исследованной выборке выявлено аберрантное изменение RCQ 15-ти генов (кроме *APC*): потеря копийности зафиксирована для двух генов-онкосупрессоров (*IRX1* и *P53*), амплификация – для 13-ти онкогенов. Отметим, что в группе $T_{3-4}N_{1-2}M_0$ статистически достоверно коррелировала амплификация генов C-MYC и *POU5F1B* ($p<0,05$), локализованных рядом на 8q24 хромосоме.

Наиболее частыми CNV изменениями стала потеря копийности локуса мтДНК *HV2* в 9 (26%) случаях, и в одном случае *HV2* был амплифицирован. В образцах РЖ-опухолей первичной распространенности отмечена тенденция повышения уровня копийности как по отдельным амплифицированным локусам (например, для гена *C-MYC* Me (RCQ) составила 1,53 в группе $T_{3-4}N_0M_0$ против 4,57 в группе $T_{3-4}N_{1-2}M_0$), так и по всем локусам (Me (RCQ) = 1,62 и 2,26 в группах без поражения и с поражением регионарных лимфоузлов, соответственно). В целом, 35 образцов неоплазий желудка (74%) продемонстрировали амплификацию и/или потерю хотя бы по одному ядерному гену.

Заключение. Полученные данные о снижении RCQ генов опухолевых супрессоров (в том числе локоса митохондриальной ДНК) и, напротив, повышении RCQ онкогенов свидетельствуют о прогностической роли 15-ти исследованных генов в процессе онкотрансформации тканей желудка и прогрессирования рака желудка.

Список литературы

1. Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M. et al. Cancerincidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 // Int J Cancer. 2015. V.136. E359–E386.

2. Liang L., Fang J-Y., XuJ. Gastric cancer and gene copy number variation: emerging cancer drivers for targeted therapy // Oncogene. 2016. V.35. P. 1475-1482. doi:10.1038/onc.2015.209.

3. Кит О.И., Водолажский Д.И., Кутилин Д.С., Гудуева Е.Н. Изменение копийности генетических локусов при раке желудка // Молекулярная биология. 2015. Т.49, № 4. С. 658-666.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА *UGT1A1* У ПАЦИЕНТОВ С КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ

Тимошкина Н.Н., Водолажский Д.И., Миташок И.С., Кабанов С.Н., Калабанова Е.А., Жужеленко И.А., Снежко Т.А., Попова И.Л., Владимирова Л.Ю.

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия

Введение. Исследование полиморфизмов гена *UGT1A1*, кодирующего изоформу I фермента уридиндифосфат глюкуронозилтрансферазы, необходимо для оптимального использования иринотекана в химиотерапии онкологических заболеваний, в частности колоректального рака (КРР). Согласно обширным данным, аллели *UGT1A1*28* и *UGT1A1*6* имеют наибольшее клиническое значение, лимитируя использование иринотекана [1, 2].

Целью настоящей работы являлось исследование распространения полиморфизмов *UGT1A1*28* и *UGT1A1*6* у пациентов с диагностированным КРР, проживающих на юге России (SR).

Материалы и методы. Полиморфизмы *UGT1A1*28* и *UGT1A1*6* определяли у 53 пациентов европеоидного типа (27 мужчин, 26 женщин, медиана возраста - 60 лет) с диагнозом КРР, проходивших лечение в ФГБУ «РНИОИ». Для исследования использовали ДНК, выделенную из лейкоцитов периферической крови. Генотипирование проводили методом пиросеквенирования (UGT1A1-Pyro kit, Qiagen) с использованием прибора PyroMark Q24.

Результаты. В указанной выборке частота аллелей *UGT1A1**28 и *UGT1A1**6, составила 0,34 и 0,01, соответственно. В распределении генотипов с аллелью *UGT1A1**28 доминировали wild type *TA6/TA*6 – 0.415 и гетерозиготный TA6/TA7 - 0,472. Большинство генотипов с аллелью *UGT1A1**6 было определено как wild type (0,981), единственный пациент обладал гетерозиготным мутантым генотипом G/A. Сравнительный анализ распределений аллельных частот и генотипов с азиатскими и европейскими популяциями выявило достоверные различия между когортой SR и популяциями Китая и Японии (p<0,001) и отсутствие различий между SR и пациентами Европы.

Заключение. При сравнительном анализе полученных нами данных с результатами других исследователей [3, 4, 5] подтверждена связь распределения частот аллелей гена *UGT1A1,* ассоциированных с метаболизмом иринотe-

кана, с этнической принадлежностью пациентов. Когорта пациентов SR различается по частоте полиморфизмов *UGT1A1**28 и *UGT1A1**6 от азиатских популяций и не отличается по этим показателям от европейского населения.

Список литературы

1. Fujita K., Sparreboom A. Pharmacogenetics of irinotecan disposition and toxicity: a review. Curr Clin Pharmacol. 2010. 5(3). P. 209-217.

2. Berg A. O., Armstrong K., Botkin J., Calonge N., Haddow J., Hayes M., Kaye C., Phillips K. A., Piper M., Richards C. S., Scott J. A., Strickland O. L., Teutsch S. Recommendations from the EGAPP Working Group: Can UGT1A1 genotyping reduce morbidity and mortality in patients with metastatic colorectal cancer treated with irinotecan? Genet Med. 2009. V.11(1). P. 15-20.

3. Li M., Wang Z., Guo J., Liu J., Li C., Liu L., Shi H., Liu L., Li H., Xie C., Zhang X., Sun W., Fang S., Bi X. Clinical significance of UGT1A1 gene polymorphisms on irinotecan-based regimens as the treatment in metastatic colorectal cancer // OncoTargets and Therapy. 2014. V.7. P.1653–1661

4. Kweekel D.M., Gelderblom H., Van der Straaten T., Antonini N. F., Punt C. J. A., Guchelaar H.-J. UGT1A1*28 genotype and irinotecan dosage in patients with metastatic colorectal cancer: a Dutch Colorectal Cancer Group study // British Journal of Cancer. 2008. V.99. P.275 – 282

5. Toffoli G., Cecchin E., Corona G.e, Russo A., Buonadonna A., D'Andrea M., Pasetto L. M., Pessa S., Errante D., De Pangher V., Giusto M., Medici M., Gaion F., Sandri P., Galligioni E., Bonura S., Boccalon M., Biason P., Frustaci S. The Role of UGT1A1*28 Polymorphism in the Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of Irinotecan in Patients with Metastatic Colorectal Cancer // J. Clin. Oncol. 2006. 24. V.19. P. 3061-3068.

ОЦЕНКА ВКЛАДА ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ СЕМЕЙСТВ МЕТИЛТРАНСФЕРАЗ *(DNMT)* И МЕТИЛДИОКСИГЕНАЗ *(TET)* В ВОЗРАСТАНИЕ РИСКА РАЗВИТИЯ СПОРАДИЧЕСКИХ ФОРМ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Снытков Е.В.[1], Кипень В.Н.[2], Мельнов С.Б.[3]

[1] УО «Международный государственный экологический институт им. А.Д. Сахарова» БГУ, Минск, Республика Беларусь

[2] ГУ «Научно-практический центр Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь», Минск, Республика Беларусь

[3] РУП БелНИЦ «Экология», Минск, Республика Беларусь

Введение. Метилирование цитозина в составе CpG островков является необходимым инструментом регулирования активности генов, импринтинга, инактивации Х-хромосомы, поддержания целостности генома и его защиты от встраивания ретровирусов и транспозонов. В клетках млекопитающих важную роль в этом процессе играют ДНК-метилтрансферазы (DNMT) и метилдиоксигеназы (TET). Аберрантное метилирование регуляторных областей генов-онкосупрессоров показано для подавляющего большинства известных спорадических онкопатологий и происходит на самых ранних стадиях заболевания до проявления клинических признаков профиля метилирования в дочерней цепи во время репликации ДНК. Кроме того, показано, что набор метилированных CpG-островков (профиль метилирования ряда генов-онкосупрессоров) может специфически характеризовать определенный тип опухоли и различается для разных онкопатологий [1-3].

Цель и задачи. Определить частоту распространенности полиморфных вариантов g.10168778G>A (*DNMT1*, rs2162560), p.H97R (*DNMT1*, rs16999593), g.25512438T>G (*DNMT3A*, rs12999687) и g.70391172G>T (*TET1*, rs7907322) среди пациентов со спорадическим раком молочной железы (РМЖ) из Республики Беларусь, а также в группе сравнения. Оценить вклад каждого полиморфного варианта в модификацию риска развития спорадического РМЖ.

Материалы и методы. В исследование были включены 169 пациентов со спорадической формой РМЖ. Критериями отбора пациентов для исследования были: 1) отсутствие основных патогенетически значимых мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *CHEK2* и *NBS1*; 2) отсутствие в личном анамнезе случаев билатеральных (как синхронных, так и метахронных) форм РМЖ; 3) отсутствие ранней манифестации. В группу сравнения вошли 185 условно здоровых пациентов без онкологической патологии в анамнезе на момент забора крови [4]. Группа сравнения соответствовала по возрасту и этническому составу выборке больных РМЖ. Образцы ДНК были выделены с помощью метода водно-метанольной экстракции (methanol fixation method). Анализ полиморфизма производили с помощью метода ПЦР-ПДРФ. Статистическая обработка проводилась с применением ПО «SPSS v.20.0».

Результаты. При сравнении основной группы и группы сравнения для однокуклеотидного полиморфизма (ОНП) g.10168778G>A (*DNMT1*, rs2162560) были найдены статистически значимые различия ($p<0,05$): генотип GG чаще встречался среди пациентов со спорадическим РМЖ. Основываясь на результатах сравнения частот распространенности генотипов по ОНП g.10168778G>A в основной группе и группе сравнения, для генотипов/аллелей были рассчитаны значения отношения шансов (ОШ) –патогенетическим генотипом (увеличивающим риск развития заболевания) является GG (ОШ=4,53 при 95% ДИ=[1,76–11,64], p=0,004). Также при наличии аллели G риск развития РМЖ возрастал в 1,67 раза (ДИ=[1,08–2,58], p=0,02).

Для полиморфных вариантов p.H97R (*DNMT1*, rs16999593), g.25512438T>G (*DNMT3A*, rs12999687) и g.70391172G>T (*TET1*, rs7907322) статистически значимых различий выявлено не было – данные ОНП не связаны с увеличением риска развития спорадического РМЖ.

Выводы. Наличие генотипа GG по ОНП g.10168778G>A (rs2162560) в гене *DNMT1* способно статистически значимо – более чем 4 раза (p=0,004), – увеличить риск развития спорадического РМЖ. Полиморфные варианты вариантов p.H97R (*DNMT1*, rs16999593), g.25512438T>G (*DNMT3A*, rs12999687) и g.70391172G>T (*TET1*, rs7907322) не ассоциированы с РМЖ.

Список литературы

1. Haggarty, P. Human intelligence and polymorphisms in the DNA methyltransferase genes involved in epigenetic marking / Haggarty P., Hoad G., Harris SE [et al.] // PLoS One. 2010 Jun 25;5(6):e11329. doi:10.1371/journal.pone.0011329;

2. Kvaratskhelia, E. Expression pattern of DNA-methyltransferases and its health implication (short review) / Kvaratskhelia E., Tkemaladze T., Abzianidze E. // Georgian Med News. 2014 Mar; (228): 76-81;

3. Poke, FS Reversing aberrant methylation patterns in cancer / Poke FS, Qadi A., Holloway AF // Curr Med Chem. 2010;17(13):1246-54;

4. Кипень, В.Н. Роль генов XRCC1, XRCC3и PALB2в генезе спорадических форм рака молочной железы / Кипень В.Н., Мельнов С.Б., Смолякова Р.М. // Экологическая генетика, Т. XIII, № 4, 2015, с.76-83.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОПУХОЛЕЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ – ВКЛАД ГЕНОВ *DNMT1, DNMT3A* И *TET1*

Снытков Е.В.[1], Кипень В.Н.[2], Мельнов С.Б.[3]

[1] УО «Международный государственный экологический институт им. А.Д. Сахарова» БГУ, Минск, Республика Беларусь

[2] ГУ «Научно-практический центр Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь», Минск, Республика Беларусь

[3] РУП БелНИЦ «Экология», Минск, Республика Беларусь

Введение. Рак молочной железы (РМЖ) представляет собой сложное полигенное мультифакторное заболевание и является одним из наиболее распространенных онкозаболеваний во всем мире. По состоянию на 2016 г. в структуре онкологической заболеваемости женщин в Республике Беларусь РМЖ занимает первое место – грубый интенсивный показатель заболеваемости РМЖ в 2014 году составил 80,1 на 100 тыс. женского населения (стандартизированный СП World – 47,4) [1].

Одним из приоритетных направлений исследования патогенеза РМЖ является выявление предрасполагающих к раннему развитию данной онкопатологии генотипов и их ассоциаций. В то же время, генотипирование по ключевым генам систем поддержания стабильности генома (в частности, систем метилирования и реметилирования ДНК) позволит адекватно выбирать курсы лучевой и адъювантной химиотерапии в рамках персонифицированного подхода в медицине [2].

Цель и задачи. Нами была предпринята попытка проанализировать связь данных генотипирования для полиморфных вариантов g.10168778G>A (*DNMT1*, rs2162560), p.H97R (*DNMT1*, rs16999593), g.25512438T>G (*DNMT3A*, rs12999687) и g.70391172G>T (*TET1*, rs7907322) с возрастом постановки диагноза РМЖ, оценить возможный вклад молекулярных маркеров РМЖ (рецепторы эстрогена и прогестерона, Her-2/neu) в контексте гистологического типа опухоли, а также дать оценку их вклада в формирование молекулярных подтипов.

Материалы и методы. В исследование были включены 169 пациентов со спорадической формой РМЖ. Критериями отбора пациентов для исследования были: 1) отсутствие основных патогенетически значимых мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *CHEK2* и *NBS1*; 2) отсутствие в личном анамнезе случаев билатеральных (как синхронных, так и метахронных) форм РМЖ; 3) отсутствие ранней манифестации. В группу сравнения вошли 185 условно здоровых пациентов без онкологической патологии в анамнезе на момент забора крови [3]. Группа сравнения соответствовала по возрасту и этническому составу выборке больных РМЖ. Статистическая обработка проводилась с применением ПО «SPSS v.20.0».

Результаты. Группа пациентов с РМЖ была нами разделена на четыре подгруппы в зависимости от возраста постановки диагноза. В качестве пограничных значений использовали возраст в 30, 35, 40 и 45 лет.

Проведенный анализ показал, что в отношении ряда полиморфных вариантов имеется связь с повышенным риском развития заболевания в определенном возрастном диапазоне. Так, наличие статистически значимых ассоциаций было показано для полиморфного варианта g.10168778G>A (*DNMT1*, rs2162560).

Так, при исследовании связи данных генотипирования с возрастом постановки диагноза в группе пациентов с РМЖ была обнаружена статистически значимая связь (p=0,018) между полиморфным вариантом g.10168778G>A и возрастной группой «до/после 35 лет»: генотип A/A встречался почти в 3 раза чаще среди пациентов в возрасте до 35 лет (50,0% против 17,3%).

В то же время, при сравнении распределения частоты встречаемости генотипов в контексте всех выявленных генотипов в пределах каждой их групп («до/после 35 лет») наблюдается следующая тенденция: для 89,4% (42/47 случаев) и 89,3% (25/28) случаев пациентов с диагнозом РМЖ в возрасте старше 35 лет был выявлен аллель G. Т.е. соотношение в пределах групп «до/после 35 лет» для генотипов AG/GG составило 1:9. В то время как для генотипа AA соотношение было лишь 1:2. Таким образом, наличие патогенетически значимой аллели G может быть ассоциировано с риском возникновения РМЖ в возрасте старше 35 лет.

Для полиморфных вариантов p.H97R (*DNMT1*, rs16999593), g.25512438T>G (*DNMT3A*, rs12999687) и

g.70391172G>T (*TET1*, rs7907322) статистически значимых ассоциаций с возрастом возникновения РМЖ выявлено не было.

В исследуемой нами группе пациентов с РМЖ диагноз инфильтрирующая протоковая карцинома на основании гистологического исследования был верифицирован приблизительно в половине всех случаев (50,97%), дольковая карцинома – почти в 26% случаев, на оставшиеся 23 % приходятся остальные, менее распространенные, формы РМЖ, такие как фибросаркома БДУ, тубулярная аденокарцинома, солидная карцинома, медуллярная карцинома и др [2]. Проведенный статистический анализ не выявил какие-либо зависимости между результатами генотипирования и гистологическим типом опухоли.

В выборке пациентов с РМЖ распределение по молекулярным подтипам оказалось следующим: 46% случаев составил трижды-негативный тип, 27,0% – люминальный А тип, около 16,9 – люминальный Б тип (что в сумме с типом А составило 43,9%), 10,1% – HER2 тип [3]. Следует отметить, что определить молекулярный подтип опухоли представлялось возможным лишь в приблизительно 60% всех случаев ввиду отсутствия данных ИГХ-анализа в анамнезе. Предпринятая нами попытка сравнения частот распределения исследуемых генов систем метилирования и реметилирования ДНК в зависимости от молекулярного подтипа РМЖ также не выявила статистически значимых различий: генотипы распределены с равной вероятностью.

Выводы. Полиморфный вариант g.10168778G>A (*DNMT1*, rs2162560) ассоциирован с возрастом возникновения РМЖ (p=0,018).

Полиморфные варианты g.10168778G>A (*DNMT1*, rs2162560), p.H97R (*DNMT1*, rs16999593), g.25512438T>G (*DNMT3A*, rs12999687) и g.70391172G>T (*TET1*, rs7907322) не ассоциированы с молекулярными маркерами РМЖ в контексте гистологического типа опухоли, а также не связаны с формированием молекулярных подтипов РМЖ.

Список литературы

1. Статистика онкологических заболеваний в Республике Беларусь (2004-2013) / под ред. О.Г.Суконко. – РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова, 2014. – 382 с.;

2. Кипень, В.Н. Молекулярно-гистологическая характеристика опухолей молочной железы – вклад генов XRCC1, XRCC3 и PALB2 / Кипень В.Н., Мельнов С.Б. // Сборник научных трудов X научной конференции «Генетика человека и патология. Проблемы эволюционной медицины», Томск, 2014, с.120-127;

3. Кипень, В.Н. Роль генов XRCC1, XRCC3 и PALB2 в генезе спорадических форм рака молочной железы / Кипень В.Н., Мельнов С.Б., Смолякова Р.М. // Экологическая генетика, Т. XIII, № 4, 2015, с.76-83.

РОЛЬ МЕЖГЕННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ФОРМИРОВАНИИ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К СПОРАДИЧЕСКОМУ РАКУ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (НА ПРИМЕРЕ ГЕНОВ *DNMT1, DNMT3A* И *TET1)*

Снытков Е.В.[1], Кипень В.Н., Мельнов С.Б.

[1] УО «Международный государственный экологический институт им. А.Д. Сахарова» БГУ, Минск, Республика Беларусь

[2] ГУ «Научно-практический центр Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь», Минск, Республика Беларусь

[3] РУП БелНИЦ «Экология», Минск, Республика Беларусь

Введение. В основе наследственной предрасположенности к раковым заболеваниям лежит специфическая комбинация аллелей нескольких генов, которые оказывают влияние на развитие либо на модификацию клинических симптомов болезни. Установление взаимосвязей между полиморфными генами и фенотипическими проявлениями рака молочной железы (РМЖ) является важнейшим условием для установления ключевых звеньев патогенеза, затрагивающих определенные физиологические функции, посредством которых формируется клиническая картина заболевания [1].

В структуре всех злокачественных новообразований (ЗНО) женского населения Республики Беларусь частота ЗНО молочной железы в 2013 г. составила около 18,0%. Так, по данным Белорусского канцер-регистра раковых заболеваний, интенсивные показатели заболеваемости (на 100 тыс. женского населения) демонстрируют ежегодное увеличение частоты выявления новых случаев заболевания. За период 2008-2013 годы отмечено увеличение первичной заболеваемости с 70,7 до 76,4 [2].

В настоящее время одними из наиболее эффективных алгоритмов для анализа межгенных взаимодействий являются биоинформатический метод сокращения многофакторной размерности Multifactor Dimensionality Reduction (MDR) [3]. Важное преимущество метода MDR заключается в возможности его использования в выборках относительно небольших объемов. Кроме того, MDR позволяет проводить статистическую оценку валидности или воспроизводимости тестируемых моделей (cross-validation consistency, CVC), а также расчет ошибки предсказания модели (prediction error, Pre.).

Цель и задачи. С помощью метода Multifactor Dimensionality Reduction выявить особенности взаимодействия полиморфных вариантов ключевых генов, задействованных в процессах метилирования и реметилирования ДНК: g.10168778G>A (*DNMT1*, rs2162560), p.H97R (*DNMT1*, rs16999593), g.25512438T>G (*DNMT3A*, rs12999687) и g.70391172G>T (*TET1*, rs7907322), – отвечающих за повышенный риск развития спорадического РМЖ.

Материалы и методы. В исследование были включены 169 пациентов со спорадической формой РМЖ. В группу сравнения вошли 185 условно здоровых пациентов без онкологической патологии в анамнезе на момент забора крови [4]. Группа сравнения соответствовала по

возрасту и этническому составу выборке больных РМЖ. Анализ межгенных взаимодействий проводили с помощью программы MDR v.3.0.2. Математической базой данной программы является непараметрический кластерный анализ, который служит альтернативой логистической регрессии для обнаружения и описания нелинейного типа взаимодействия между дискретными генетическими предикторами [3].

Результаты. В проведенном исследовании были проанализированы все возможные комбинации полиморфных вариантов для ключевых генов систем метилирования и реметилирования ДНК: *DNMT1* (DNA methyltransferase 1, GeneID 1786), *DNMT3A* (DNA methyltransferase 3 alpha, GeneID 1788) и *TET1* (tet methylcytosine dioxygenase 1, GeneID 80312), – у пациентов со спорадической формой РМЖ и в группе сравнения. В процессе моделирования нами были использованы высоко консервативные настройки поиска конфигурации модели, которые позволили однозначно дифференцировать наличие/отсутствие статистически значимых эффектов: количество атрибутов (attribute count range) – от 1 до n (где n – количество переменных в модели); воспроизводимость модели (cross-validation count) – 10; анализ топ-моделей (track top models) – 1000; поиск конфигурации модели (search method configuration) – exhaustive; метод сравнения (ambiguous cell analysis) – fisher's exact test; классификация ячеек (ambiguous cell assignment) – unclassified [1].

В результате анализа межгенных взаимодействий полиморфных вариантов генов системы метилирования ДНК в развитии спорадического РМЖ были установлены четыре модели: 1) однолокусная модель «*DNMT1* (rs2162560)»; 2) двухлокусная модель «*DNMT1* (rs2162560) / *DNMT3A* (rs12999687)»; 3) трехлокусная модель «*DNMT1* (rs2162560) / *DNMT1* (rs16999593) / *DNMT3A* (rs12999687)»; 4) четырехлокусная модель «*DNMT1* (rs2162560) / *DNMT1* (rs16999593) / *DNMT3A* (rs12999687) / *TET1* (rs7907322)». Однако ни одна модель не обладала удовлетворительными показателями воспроизводимости, чувствительности и специфичности.

Только для одного полиморфного варианта – g.10168778G>A (*DNMT1*, rs2162560), – была показано статистически значимое возрастание риска развития РМЖ (ОШ=4,53 при 95% ДИ=[1,76–11,64], p=0,004). Для остальных полиморфных вариантов различий выявлено не было. Данный факт подтверждает полученные нами результаты моделирования. В то же время, ввиду широко распространения эффекта взаимодействия неаллельных генов для данных полиморфных вариантов возможно наличие модифицирующего эффекта: т.е. значительное возрастание риска развития РМЖ при наличии сопутствующих патогенетически значимых полиморфных вариантов других систем, например репарации, контроля клеточного цикла, биотрансформации ксенобиотиков и др. Данные эффекты предстоит выявить в последующих экспериментах.

Выводы. В результате анализа межгенных взаимодействий полиморфных вариантов генов системы метилирования ДНК в развитии спорадического РМЖ с использованием метода Multifactor Dimensionality Reduction не было найдено значимых ассоциаций в формировании «патогенетического профиля», приводящего к значительному возрастанию риска возникновения данной патологии.

Список литературы

1. Кипень, В.Н. Роль межгенных взаимодействий в формировании предрасположенности к спорадическому раку молочной железы (на примере генов XRCC1, XRCC3 и PALB2) / В.Н. Кипень // Труды Белорусского государственного университета. Серия «Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем», 2015, Т. 10 , ч. 1. с.146–152;

2. Статистика онкологических заболеваний в Республике Беларусь (2004-2013) / под ред. О.Г.Суконко. – РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова, 2014. – 382 с.;

3. Moore, JH A flexible computational framework for detecting, characterizing, and interpreting statistical patterns of epistasis in genetic studies of human disease susceptibility // J Theor Biol. 2006. P. 252-61.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НЕАЛЛЕЛЬНЫХ ГЕНОВ В ФОРМИРОВАНИИ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К СПОРАДИЧЕСКОМУ РАКУ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (НА ПРИМЕРЕ ГЕНОВ СЕМЕЙСТВА ЦИТОХРОМА Р450 – *CYP1B1, CYP2D6, CYP1A1)*

Смольник Н.С.[1], Кипень В.Н.[2], Мельнов С.Б.[3]

[1] УО «Международный государственный экологический институт им. А.Д. Сахарова» БГУ, Минск, Республика Беларусь

[2] ГУ «Научно-практический центр Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь», Минск, Республика Беларусь

[3] РУП БелНИЦ «Экология», Минск, Республика Беларусь

Введение. В структуре всех злокачественных новообразований женского населения Республики Беларусь рак молочной железы (РМЖ) в 2012 г. составил 17,7%. За период 2003-2012 годы отмечен рост первичной заболеваемости с 61,7‰ до 76,6 ‰ [1].

Все чаще исследователи прибегают к одновременному анализу большого количества полиморфных вариантов при поиске статистически значимых ассоциаций с РМЖ. Исследования в подобном ключе требуют специальных статистических пакетов, способных корректно рассчитывать уровень статистической значимости при множественных сравнениях.

Одним из наиболее эффективных алгоритмов для анализа межгенных взаимодействий на данный момент

является биоинформатический метод сокращения многофакторной размерности Multifactor Dimensionality Reduction (MDR) [2]. В программе MDR мультилокусные генотипы суммируются в группы повышенного и пониженного риска развития заболевания, что уменьшает размерность числа рассчитываемых параметров. С помощью многократного перекрестного пересчета вводимых первичных данных выбирается оптимальная модель межгенного взаимодействия, позволяющая с наиболее высокой точностью и, соответственно, с наименьшей ошибкой, предсказать респонденту наличие или отсутствие предрасположенности к определенным болезням.

Цель и задачи. С помощью метода Multifactor Dimensionality Reduction оценить особенности взаимодействия полиморфных p.L342V (*CYP1B1*, rs1056836), p.P34S (*CYP2D6*, rs1065852) и c.6235T>C (*CYP1A1*, MspI) в увеличении риска развития спорадического РМЖ.

Материалы и методы. В исследование были включены 169 пациентов со спорадической формой РМЖ. В группу сравнения вошли 185 условно здоровых пациентов без онкологической патологии в анамнезе на момент забора крови [3]. Группа сравнения соответствовала по возрасту и этническому составу выборке больных РМЖ. Анализ межгенных взаимодействий проводили с помощью программы MDR v.3.0.2. [2].

Результаты. В проведенном исследовании были проанализированы все возможные комбинации полиморфных вариантов – p.L342V (*CYP1B1*, rs1056836), p.P34S (*CYP2D6*, rs1065852) и c.6235T>C (*CYP1A1*, MspI), – у пациентов со спорадической формой РМЖ и в группе сравнения. В процессе моделирования использовались следующие настройки поиска конфигурации модели: количество атрибутов – от 1 до n (где n – количество переменных в модели); воспроизводимость модели – 10; анализ топ-моделей – 1000; поиск конфигурации модели – exhaustive; метод сравнения – fisher's exact test; классификация ячеек – unclassified [3].

Были смоделированы три статистически значимые модели: 1) однолокусная модель «*CYP1A1* c.6235T>C» – воспроизводимость – 8/10, точность предсказания – 60,82% (p=0,0031); 2) двухлокусная модель «*CYP1A1* c.6235T>C» / «*CYP2D6* rs1065852» – воспроизводимость – 4/10, точность предсказания – 69,39% (p=0,0013); 3) трехлокусная модель «*CYP1A1* c.6235T>C» / «*CYP2D6* rs1065852» / «*CYP1B1* rs1056836» – воспроизводимость – 9/10, точность предсказания – 72,82% (p=0,0001).

В результате анализа межгенных взаимодействий в трехлокусной модели «*CYP1A1* c.6235T>C» / «*CYP2D6* rs1065852» / «*CYP1B1* rs1056836» были обнаружены три сочетанных генотипа повышенного риска и два – пониженного риска развития РМЖ. У пациентов со спорадическими формами злокачественных новообразований молочных желез рисковыми являются сочетания генотипов: CT/TT (*CYP2D6,* rs1065852) / TT (*CYP1A1,* c.6235T>C) / CG/GG (*CYP1B1,* rs1056836). Наибольшее рассчитанное значение отношение шансов (ОШ) 6,74 [95% ДИ=3,14-12,69] было показано при одновременном наличии генотипов T/T (*CYP2D6,* rs1065852) и T/T (*CYP1A1,* c.6235T>C), p<0,01.

Выводы. В результате анализа межгенных взаимодействий полиморфных вариантов генов системы биотрансформации ксенобиотиков в развитии спорадического РМЖ с использованием метода Multifactor Dimensionality Reduction были найдены значимые ассоциации, приводящие к значительному возрастанию риска возникновения данной патологии – при одновременном наличии патогенетически значимых генотипов для *CYP2D6* и *CYP1A1* рассчитанные значения риска возникновения РМЖ значительно превышают общепопуляционный.

Список литературы

1. Статистика онкологических заболеваний в Республике Беларусь (2004-2013) / под ред. О.Г.Суконко. – РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова, 2014. – 382 с.;

2. Moore, JH A flexible computational framework for detecting, characterizing, and interpreting statistical patterns of epistasis in genetic studies of human disease susceptibility // J Theor Biol. 2006. P. 252-61;

3. Кипень, В.Н. Роль межгенных взаимодействий в формировании предрасположенности к спорадическому раку молочной железы (на примере генов XRCC1, XRCC3 и PALB2) / В.Н. Кипень // Труды Белорусского государственного университета. Серия «Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем», 2015, Т. 10 , ч. 1. с.146–152.

ЧАСТОТА РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ПОЛИМОРФНОГО ВАРИАНТА p.P34S (rs1065852) ГЕНА *CYP2D6* СРЕДИ ПАЦИЕНТОВ СО СПОРАДИЧЕСКИМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ИЗ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Смольник Н.С.[1], Кипень В.Н.[2], Мельнов С.Б.[3]

[1]УО «Международный государственный экологический институт им. А.Д. Сахарова» БГУ, Минск, Республика Беларусь

[2]ГУ «Научно-практический центр Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь», Минск, Республика Беларусь

[3]РУП БелНИЦ «Экология», Минск, Республика Беларусь

Введение. Цитохром 2D6 (CYP2D6) является одним из ферментов системы детоксикации ксенобиотиков, участвует в метаболизме примерно 20% лекарственных препаратов, в том числе адреноблокаторов (метопролол, пропранолол и тимолол). Фермент также деактивирует канцерогены табачных продуктов. Существует не менее 40 генетических вариантов *CYP2D6*, приводящих к пониженной метаболической активности фермента. Одним из наиболее распространенных вариантов является p.P34S (rs1065852). Вариант 34Ser также известен как CYP2D6*4.

Данный полиморфизм используется в качестве фармакогенетического и онкологического маркера [1,2].

Цель и задачи. Определить частоту распространенности полиморфного варианта p.P34S (rs1065852) гена *CYP2D6* среди пациентов со спорадическим раком молочной железы (РМЖ) из Республики Беларусь, а также в группе сравнения. Оценить вклад данного полиморфного варианта в увеличение риска развития спорадического РМЖ.

Материалы и методы. В исследование были включены 169 пациентов со спорадической формой РМЖ [3]. Критериями отбора пациентов для исследования были: 1) отсутствие основных патогенетически значимых мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *CHEK2* и *NBS1*; 2) отсутствие в личном анамнезе случаев билатеральных (как синхронных, так и метахронных) форм РМЖ; 3) отсутствие ранней манифестации. В группу сравнения вошли 185 условно здоровых пациентов без онкологической патологии в анамнезе на момент забора крови. Группа сравнения соответствовала по возрасту и этническому составу выборке больных РМЖ. Все участники исследования подписали информированное согласие на проведение молекулярно-генетических исследований. Все образцы ДНК были выделены с помощью метода водно-метанольной экстракции (methanol fixation method) по протоколу Johanson H. с модификациями [4]. Анализ полиморфизма производили с помощью ПДРФ-метода (эндонуклеаза рестрикции BstNI, NEB, USA). При сравнении результатов анализа генетического полиморфизма в группах использовали критерий Фишера или χ^2. Анализ ассоциации генотипов с риском развития заболевания проводился с использованием базового аллельного теста и расчета показателя отношения шансов (ОШ) для минорной аллели каждого анализируемого локуса (с расчетом 95% доверительного интервала) с применением ПО «SPSS v.20.0».

Основные результаты. Так, при сравнении основной группы и группы сравнения для однокуклеотидного полиморфизма (ОНП) p.P34S (rs1065852) были найдены статистически значимые различия (p<0,0001): как генотипы CT/CC, так и аллель C чаще встречались среди пациентов из группы сравнения, в то время как для пациентов с РМЖ основным оказался генотип TT. Основываясь на результатах сравнения частот распространенности генотипов по ОНП p.P34S в основной группе и группе сравнения, для генотипов/аллелей были рассчитаны значения ОШ. Так, протективной аллелью (снижающей риск развития заболевания) являлась C (ОШ=0,46 при 95% ДИ=[0,31–0,67], p=0,0001), патогенетической (соответственно, увеличивающей риск развития заболевания) – T (ОШ=2,18 при 95% ДИ=[1,50–3,18], p<0,0001). Также при наличии генотипа TT риск развития РМЖ возрастал более чем в 4 раза – ОШ=4,76 (ДИ=[2,08–10,88], p=0,0002).

Выводы. Таким образом, наличие генотипа TT по ОНП p.P34S (rs1065852) в гене *CYP2D6* способно статистически значимо (p<0,0001) увеличить риск развития спорадического РМЖ – более, чем в 4 раза. Учитывая также тот факт, что данный фермент – CYP2D6, – участвует в метаболизме химиотерапевтических препаратов, анализ потенциальных ОНП, способных изменять его функциональную активность, предполагается продолжить в дальнейших исследованиях.

Список литературы

1. Sirachainan, E. CYP2D6 polymorphisms influence the efficacy of adjuvant tamoxifen in Thai breast cancer patients / Sirachainan E., Jaruhathai S., Trachu N. [et al.] // Pharmgenomics Pers Med. 2012;5:149-53. doi: 10.2147/PGPM.S32160. Epub 2012 Oct 17;

2. Chamnanphon, M. Association of CYP2D6 and CYP2C19 polymorphisms and disease-free survival of Thai post-menopausal breast cancer patients who received adjuvant tamoxifen / Chamnanphon M., Pechatanan K., Sirachainan E. // Pharmgenomics Pers Med. 2013 May 24;6:37-48. doi: 10.2147/PGPM.S42330. Print 2013;

3. Кипень, В.Н. Роль генов XRCC1, XRCC3и PALB2в генезе спорадических форм рака молочной железы / Кипень В.Н., Мельнов С.Б., Смолякова Р.М. // Экологическая генетика, Т. XIII, № 4, 2015, с.76-83;

4. Johanson, HC DNA elution from buccal cells stored on Whatman FTA Classic Cards using a modified methanol fixation method / Johanson HC, Hyland V., Wicking C. [et al.] // Biotechniques, 2009 Apr;46(4):309-11. doi: 10.2144/000113077.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ И ПРОГНОСТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ МУТАЦИОННЫХ ТЕСТОВ ПРИ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ОПУХОЛЯХ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Зарецкий А.Р.[1,2,3], Качко В.А.[2], Платонова Н.М.[4], Ванушко В.Э.[4]

[1]ООО «Новые Молекулярные Технологии», Москва

[2]ООО «Евроген Лаб», Москва

[3] ФГБУН «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Москва

[4]ФГБУЗ «Эндокринологический научный центр» Минздрава РФ, Москва

Цель. Оценить диагностическую и прогностическую ценность комплексного молекулярного тестирования при микрокарциномах щитовидной железы.

Материалы и методы. В исследование было включено 157 пациентов, в том числе 89 пациентов с папиллярными микрокарциномами щитовидной железы, 52 пациента с изначальным диагнозом «фолликулярная неоплазия» и 16 пациентов с узловым коллоидным зобом. Пациенты с папиллярной микрокарциномой рандомизировались в группы 4 стратегий лечения: тиреоидэктомия, тиреоидэктомия+лимфодиссекция, тиреоидэктомия+-терапия I-131 и тиреоидэктомия+лимфодиссекция+терапия I-131. Проводилось молекулярное исследование операционного материала, предоперационного цитоло-

гического материала, а также плазмы крови, забранной до операции и спустя 4-6 дней после нее. Поиск мутаций в релевантных регионов основных протоонкогенов (в кодирующей области генов R*ET, KRAS, NRAS, HRAS, ARAF, BRAF, RAF1, PIK3CA, AKT1, MAP2K1, MAP2K2, MAPK1, RAC1, GNAS, TSHR* и *EIF1AX* и в промоторной области гена *TERT*) и транслокаций с участием генов *RET, PPARG, NTRK1, NTRK3, BRAF, RAF1* и *ALK* осуществляли с помощью секвенирования нового поколения (NGS) по оригинальной методике. Параллельно осуществляли тестирование тех же молекулярных нарушений классическими методами - с помощью мутационно-обогащенной ПЦР-РВ, ПЦР с последующим секвенированием по Сэнгеру, сравнительной кОТ-ПЦР-оценки экспрессии экзонов и FISH.

Результаты. Результаты NGS-тестирования мутаций и транслокаций в операционном материале показали более высокую конкордантность с высокочувствительными методами (мутационно-обогащенная ПЦР-РВ и сравнительная кОТ-ПЦР-оценка экспрессии экзонов; расхождения выявлены в 0,5% случаев), нежели с «классическими» методами (ПЦР с последующим секвенированием по Сэнгеру, FISH; расхождения выявлены в 6,8% случаев; $p < 0,005$, двусторонний точный тест Фишера). При медиане наблюдения 28 месяцев медиана безрецидивной выживаемости пациентов с микрокарциномой не достигнута ни в одной из 4 групп; рецидивы ($n = 8$) были зафиксированы только в группах, не получавших I-131. В образцах пациентов с микрокарциномой мутационный статус 2 генов из 25 имел существенную прогностическую значимость: наличие мутации *BRAF* V600E было ассоциировано с инвазией капсулы и наличием метастазов в лимфоузлах, но не с размером опухоли и риском рецидива, а наличие мутации в промоторной области гена *TERT* - с инвазией капсулы, размером опухоли и риском рецидива, но не с наличием метастазов в лимфоузлах. Тестирование на мутации и транслокации показало 100% конкордантность между гистологическим и цитологическим материалом при использовании NGS, но не других методов; однако лишь 81% из цитологических образцов оказался пригоден для анализа транслокаций всеми тремя методами. Диагностическую значимость при тестировании цитологического материала показали мутации в генах *BRAF, GNAS, PIK3CA, CTNNB1* и *TERT*, а также транслокации с участием всех 5 исследованных на этот предмет генов. У пациентов с опухолями, содержавшими активирующие мутации хотя бы в одном из исследуемых генов, ДНК опухолевого происхождения в плазме крови не была обнаружена ни разу.

Выводы. NGS-анализ операционного и цитологического материала, полученного из опухолей и псевдоопухолевых образований щитовидной железы, отличается высокой достоверностью и превосходит остальные методики по удобству применения, что позволяет рекомендовать его, в частности, в качестве рефлекс-теста при неопределенных результатах цитологического исследования (группы III и IV по классификации Бетесды) и в качестве прогностического теста после операции по поводу злокачественных опухолей ЩЖ для определения стратегии послеоперационного мониторинга и адъювантной терапии. Мутации в генах *BRAF* и *TERT* являются факторами плохого прогноза, однако для их интеграции в клинические алгоритмы необходимы дальнейшие проспективные исследования. У пациентов с микрокарциномами щитовидной железы циркулирующая ДНК опухолевого происхождения не обнаруживается в плазме крови, что может быть связано с низкой степенью сосудистой инвазии опухоли; этот факт не позволяет использовать «жидкую биопсию» в рутинной практике ведения данной группы пациентов.

ОСОБЕННОСТИ ПОЛИМОРФИЗМА A2455G ГЕНА CYP 1A1 У БОЛЬНЫХ ХМЛ

Каримов Х.Я., Абдурахманова Н.Н., Бобоев К.Т.

Научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Министерства здравоохранения Республики Узбекистан, г. Ташкент

Хронический миелолейкоз (ХМЛ) – наиболее частое миелопролиферативное заболевание, характеризующееся реципрокной транслокацией t(9;22), (q34;q11), приводящей к образованию химерного онкогена BCR-ABL на 22q-хромосоме.

Известно, что белковые продукты генов цитохромов обеспечивают гомеостаз на клеточном и тканевом уровнях, осуществляя метаболизм токсичных соединений, способных повредить геном клеток. Установлено прогностическое значение определенных генотипических вариантов этих генов в формировании ряда опухолевых заболеваний, в том числе гемобластозов. Ген CYP1A1, кодирует фермент арилуглеводородкарбоксилазу. У лиц с функционально ослабленными генотипами полиморфизма A2455G гена CYP 1A1 экспрессия данного фермента и, соответственно, инактивация ксенобиотиков должна происходить очень медленно создавая, таким образом, условия для неблагоприятного действия вредных метаболитов на геном клеток. В настоящее время в научной литературе обсуждается роль неблагоприятной аллели полиморфизма A2455G гена CYP 1A1 в развитии гемобластозов. Однако роль неблагоприятных генотипических вариантов этого гена в онкогенезе у BCR-ABL-положительных больных с ХМЛ изучена недостаточно.

Цель. Оценка роли полиморфизма A2425G гена CYP1A1 в формировании мутантного опухолевого клона и развитии ХМЛ.

Материалы и методы. Работа выполнена на образцах ДНК, выделенных из периферической крови пациентов, наблюдавшихся на базе клиники НИИ гематологии и переливания крови МЗ РУз. Всего исследовано 146 больных ХМЛ. Контрольная группа была сформирована из 217 лиц узбекской национальности, без каких либо онкологических заболеваний. Диагноз ХМЛ верифицирован в соответствии с Международной номенклатурой ISCN. Стандартизованную ПЦР с детекцией в режиме реального времени (РВ) проводили на термоциклере Rotor-Gene 6000 («Corbett Research», Австралия), при помощи набора

реагентов «АмплиСенс® Лейкоз Квант M-bcr-FRT» («ИнтерЛабСервис», Россия). Тестирование полиморфизма A2425 гена CYP1A1 проводилось на программируемом термоциклере фирмы «Applied Biosystems» (США), с использованием тест-систем компании «Литех» (Россия), согласно инструкции производителя. Статистический анализ результатов проведен с использованием пакета статистических программ «OpenEpi 2009, Version 2.3».

Результаты и их обсуждение

Частоты аллелей A и G составили: 87.7% и 12.3% у больных ХМЛ, и 93.3% и 6.7%, в группе контроля соответственно. Частоты распределения генотипов A/A, A/G и G/G составили: 76.7%, 21.9% и 1.4% – у больных ХМЛ, и 86.6%, 13.4% и 0.0% – в группе контроля.

Наблюдаемые частоты генотипов в исследованных группах соответствовали теоретически ожидаемым и находились в равновесии Харди-Вайнберга (P>0.05).

Отмечено статистически значимое снижение носительства неблагоприятной аллели в популяционной выборке по сравнению группой больных (1.4% против 6.7%, соответственно; $\chi 2$=6.8; P=0.01; OR=2.0;95% CI 1.17-3.282). Также, обнаружена достоверная ассоциация гетерозиготного генотипа A/G у больных ХМЛ, по сравнению с группой контроля (21.9% против 13.4%, соответственно). Риск формирования мутантного опухолевого клона при носительстве данного генотипа был в 1.8 раза достоверно выше, по сравнению с пациентами не имеющими его (χ^2=4.6; P=0.03; OR=1.8; 95% CI 1.046-3.166).

Гомозиготный генотип G/G в группе больных встречался значительно чаще по сравнению с контрольной группой (1.4% против 0.0%), но из-за малочисленности носителей данного генотипа различия в полученных результатах не достигли статистической значимости (P>0.05).

Функционально благоприятный генотип A/A встречался с высокой частотой в популяционной выборке 86.6% против 76.7% случаев у больных. При этом, различия достигли уровня пороговой значимости (χ^2=6.0; P=0.01; OR=0.5; 95% CI 0.29-0.88), что свидетельствует о благоприятном протективном эффекте данного генотипа в отношении развития ХМЛ.

Выводы. Полученные нами результаты позволяют предположить, что аллель G и гетерозиготный генотип A/G полиморфизма A2425G гена CYP 1A1 являются значимыми маркерами повышенного риска формирования бластной опухолевой клетки и развития ХМЛ в Узбекистане (P<0.05). При этом, гомозиготный генотип A/A полиморфизма A2425G гена CYP 1A1 имеет протективный характер в отношении риска ХМЛ.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА РЕТИНОБЛАСТОМЫ: СОВРЕМЕННЫЙ ПОДХОД

Алексеева Е.А.[1,2], Бабенко О.В.[2], Козлова В.М.[3], Саакян С.В.[4], Танас А.С.[2,5], Стрельников В.В.[2,5], Залетаев Д.В.[1,2,5]

[1] ФГБОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» МЗ РФ, Москва, Россия

[2] ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва, Россия

[3] ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ, Москва, Россия

[4] ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней им. Гельмгольца» МЗ РФ, Москва, Россия

[5] ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» МЗ РФ, Москва, Россия

Введение. Ретинобластома (РБ) – наиболее частая интраокулярная опухоль сетчатки глаза, развивающаяся внутриутробно или в первые пять лет жизни. Опухоль возникает из эмбриональных клеток сетчатки с частотой 1:15000-20000 новорожденных. РБ характеризуется высокой степенью злокачественности, инвазивностью и способностью быстро метастазировать в соседние органы и ткани [1,2].

С генетической точки зрения выделяют наследственную (40%) и спорадическую (60%) формы заболевания. Наследственная форма РБ представляет собой, как правило, мультифокальную опухоль, которая возникает в более раннем возрасте по сравнению со спорадической формой. При наследственной РБ поражение глаз в 2/3 случаев носит двусторонний характер (билатеральная форма) и в 1/3 – односторонний характер (унилатеральная форма). Спорадическая форма проявляется как унилатеральная монофокальная опухоль и диагностируется, как правило, после 2 лет [1].

Основной причиной развития РБ является инактивация обеих аллелей гена *RB1* в клетках опухоли. Наследственная форма опухоли обусловлена наличием герминальной мутации в одной из аллелей этого гена, передающейся потомству по аутосомно-доминантному типу наследования с неполной (90%) пенетрантностью. Опухоль развивается при инактивации второй аллели гена в клетках сетчатки у детей в раннем возрасте. При спорадической форме РБ инактивация обеих аллелей гена происходит только в клетках сетчатки. Спектр структурных повреждений, приводящих к развитию различных форм РБ, очень гетерогенен[1,3].

Молекулярно-генетическое исследование изменений гена *RB1* при РБ необходимо для подтверждения или исключения наследственного характера заболевания, что позволяет выбрать адекватный алгоритм наблюдения и лечения опухоли, а также планировать дальнейшее деторождение. Кроме того, при наследственной форме РБ ген *RB1* поврежден во всех соматических клетках, для та-

ких пациентов существует большой риск развития других опухолей различной локализации [4].

Текущий подход для определения точковых мутаций и коротких делеций/инсерций в гене *RB1* – секвенирование по Сэнгеру – является высокоэффективным, однако из-за отсутствия «горячих» точек и значительной протяженности гена трудоемким и продолжительным по времени. Микросателлитный анализ, используемый для определения протяженных делеций в гене *RB1,* является низкоинформативным.

Целью настоящего исследования явились оптимизация и повышение эффективности существующей молекулярно-генетической диагностики РБ.

Задачи исследования:

1. В группе пациентов с РБ осуществить поиск мутаций с помощью высокопроизводительного секвенирования.

2. Провести верификацию выявленных мутаций с помощью метода секвенирования по Сэнгеру у больных и членов их семьи.

3. Провести анализ количества копий гена *RB1* в группе пациентов с использованием метода мультиплексной лигазозависимой амплификации (MLPA).

Материалы и методы

Исследовано 44 пациента с РБ, среди которых 14 пациентов – с двусторонней формой заболевания и 30 – с односторонней. Поиск точковых мутаций, малых делеций/инсерций в гене *RB1* осуществляли высокопроизводительным параллельным секвенированием на приборе Ion Torrent PGM (Life Technologies, США). С целью валидации выявленных мутаций применяли метод секвенирования по Сэнгеру.

Для анализа протяженных делеций гена *RB1* использовали MLPA.

Молекулярный анализ гена *RB1* проводился на ДНК из материала опухолей и ДНК из лимфоцитов периферической крови. Такой подход обусловлен необходимостью определения характера молекулярной патологии гена – является ли повреждение герминальным или носит только соматический характер. При отсутствии материала опухоли исследование проводилось только на ДНК из лимфоцитов периферической крови.

Результаты

В 23,3% (7/30) случаев пациентов с односторонней формой заболевания выявлена герминальная мутация, то есть, определена наследственная форма РБ. У 28,6% (4/14) пациентов с билатеральной формой РБ не выявлено никаких структурных нарушений гена *RB1*. Такая ситуация может объясняться развитием опухоли вследствие других механизмов (например, амплификации гена *MYC*). В одном случае при односторонней форме РБ выявлена мозаичная герминальная мутация. Методом MLPA обнаружены делеции и ПГ в гене *RB1* у 11 пациентов. Потерянный участок включал один или несколько экзонов, либо захватывали весь ген. Частоты структурных повреждений гена *RB1* при различных формах РБ представлены в таблице.

Форма РБ	Нонсенс	Миссенс	Мутации сдвига рамки	Протяженные делеции	Мутации сайтов сплайсинга	Потеря гетерозиготности
Односторонняя	16,7%	6,7%	-	6,7%	6,7%	30,0%
Двусторонняя	50,0%	-	14,3%	-	-	7,1%

Выводы

Таким образом, использование двух новых высокотехнологичных подходов в молекулярно-генетической диагностике РБ позволяет выявить весь спектр генетических изменений в гене *RB1* у пациентов с РБ с высокой эффективностью и за более короткое время. Кроме того, использование секвенирования нового поколения позволяет выявлять мозаичные варианты мутаций, что часто затруднено при использовании секвенирования по Сэнгеру.

Список используемой литературы

1. Lohmann D.R., Brenda G.L. Retinoblastoma: Gene Reviews 2013. Доступна на http://www.nlm.nih.gov/book/NBK1452.

2. Kivela T. The epidemiological challenge of the most frequent eye cancer: retinoblastoma, an issue of birth and death // Br J Ophthalmol. – 2009. – Vol.93. – P. 1129-1131.

3. Dommering C.J., Mol B.M., Moll A.C. et al. RB1 mutation spectrum in a comprehensive nationwide cohort of retinoblastoma patients // J Med Genet. – 2014. – Vol.51. – P. 366-374.

4.Marees T., Moll A.C., Imhof S.M. et al. Risk of second malignancies in survivors of retinoblastoma: more than 40 years of follow-up // J Natl Cancer Inst. – 2008. – Vol.100. – P. 1771-1779.

ВАРИАНТНАЯ РЕАРАНЖИРОВКА МЕЖДУ ХРОМОСОМАМИ 15 И 17 ПРИ ПЕДИАТРИЧЕСКОМ ОПЛ, ВЫЯВЛЕННАЯ ТЕХНИКОЙ GTG-БЕНДИНГА

Ассесорова Ю.Ю., Аланазарова Б.Р., Мустафина Л.К., Бабаханова Н.Н.

НИИ гематологии и переливания крови МЗ РУз, Ташкент, Узбекистан

Слитный ген PML-RARA, возникающий в результате хромосомной транслокации t(15;17)(q22;q21) является маркерным генетическим изменением при остром промиелоцитарном лейкозе (ОПЛ). Классический цитогенетический анализ в комбинации с FISH позволяет идентифицировать характерную транслокацию между хромосомами 15 и 17 у 86-90% больных. В остальных случаях выявляется более редкая атипичная транслокация с вовлечением, кроме 15-й и 17-й, и других хромосом. Благодаря современным методам терапии, на сегодняшний день

ОПЛ является одним из наиболее курабельных типов лейкозов: полной ремиссии после лечения достигает до 95% больных, из которых около 80% имеют длительную бессобытийную выживаемость. Однако для незначительного количества больных ОПЛ прогноз остается неблагоприятным. Предполагается, что одной из причин этого могут быть нетипичные генетические изменения, дополняющие патогенетический эффект слитного гена PML-RARA, влияющие на формирование особенностей клинического течения ОПЛ и модифицирующие ответ на химиотерапию. Среди подобных аберраций известны такие редкие генетические аномалии, как, например, ider(17)(q10)t(15;17)(q22;q12), описанные, в том числе, при педиатрических случаях ОПЛ. Имеющиеся в литературе данные говорят о том, что вариантные цитогенетические изменения с вовлечением 15-й и 17-й хромосом связаны с плохим ответом на терапию ОПЛ у детей, а больные, имеющие такие реаранжировки погибают в течение 1-21 месяца после диагностики. Роль вовлеченности дополнительных хромосом все еще продолжает исследоваться, однако в большинстве случаев сообщается об их ассоциации с неблагоприятным прогнозом ОПЛ, особенно у детей.

Целью нашей работы является описание и оценка роли сложной цитогенетической перестройки с вовлечением 15-й и двух 17-х хромосом, выявленной у ребенка с ОПЛ.

Материалы и методы. Объектом исследования стал костный мозг и периферическая кровь (бластные клетки – 73%) больного Х. (2008 г.р.), которому был поставлен диагноз острый промиелоцитарный лейкоз (М3 вариант ОМЛ). Кариотипирование выполняли методом стандартного цитогенетического анализа (СЦИ) с лабораторными модификациями. Идентификацию хромосом проводили согласно общепринятым принципам международной номенклатуры ISCN2009, предложенной для исследования хромосом человека.

Основные результаты. Нами было выполнено кариотипирование бластных клеток костного мозга и периферической крови ребенка с диагнозом ОПЛ, поставленного ему в НИИГиПК М3 РУз в октябре 2015 года. Больной получил два курса полихимиотерапии по программе АМЛ-БФМ-2004, НАМ. После первого курса наступало клинико-гематологическое улучшение, однако перед вторым курсом консолидационной терапии общее состояние больного, обусловленное основным заболеванием, было тяжелым. В результате лечения состояние ребенка улучшилось, и он был выписан домой в состоянии клинико-гематологической ремиссии. Однако дальнейшего обращения больного в НИИГиПК за 10 месяцев, прошедших с момента второго курса консолидационной терапии, не последовало.

Методом стандартного цитогенетического исследования кариотипа больного была выявлена редкая вариантная цитогенетическая перестройка с вовлечением 15-й и двух 17-х хромосом. Разрыв в одной из хромосом 17 (№1) произошел в локусе ~q21, а во второй хромосоме 17 (№2) – в локусе ~q12. Одна из хромосом 15 имела два разрыва: в локусе ~q22 и в локусе ~q21, что привело к формированию трех фрагментов 15-й хромосомы – двух терминальных (p13–c–q12-14 и q22–q26.3) и одного интерстициального (q12-14–q22). Вторая хромосома 15 не имела цитогенетически детектируемых изменений. Два терминальных фрагмента участвующей в перестройке хромосомы 15 соединились с фрагментами одной из хромосом 17 (№1): один фрагмент хромосомы 15, несущий р-плечо и центромеру, соединился с безцентромерным фрагментом хромосомы 17, а второй терминальный фрагмент хромосомы 15 – с фрагментом хромосомы 17, несущим р-плечо и центромеру. Интерстициальный фрагмент хромосомы 15 (q12-14–q22) встроился в центральную часть второй хромосомы 17, в локусе ее разрыва ~q12.

В результате сложной перестройки образовалось три цитогенетически детектируемых деривата: 1) der(15;17)(q12-14;q21); 2) der(17;15)(q21;q22); 3) der(17;15;17)(q12;q12-14–q22;q12) (вовлеченные хромосомы указаны начиная с фрагмента, несущего центромеру). По нашим данным, это первый описанный при ОПЛ случай подобной вариантной транслокации t(15;17) с вовлечением второй хромосомы 17.

Выявление нами данной перестройки у ребенка согласуется с данными других авторов о более частой встречаемости вариантных изменений 15-й и 17-х хромосом в педиатрических случаях ОПЛ. Анализ клинических данных подтверждает, что описанные нами цитогенетические изменения сочетаются с тяжелым состоянием больного, плохим ответом на химиотерапию, кратким сроком клинико-гематологической ремиссии.

Заключение. Описанная нами цитогенетическая реаранжировка является новым случаем в цитогенетическом анализе ОПЛ. Полученные данные позволяют предположить, что вариантная реаранжировка с вовлечением хромосомы 15 и обеих хромосом 17 может быть маркером плохого прогноза при детском ОПЛ.

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА БРЕМЕНИ АЛЛЕЛИ V617F ГЕНА JAK2 МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ У БОЛЬНЫХ С ПОРАЖЕНИЕМ МИЕЛОИДНОГО РОСТКА КРОВЕТВОРЕНИЯ

Бердюгина О.В.

ФГБУ «Уральский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России, ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Екатеринбург, Россия

Введение. В настоящее время существует два обоснованных показания к назначению определения мутации V617F гена, кодирующего янус-киназу 2 (JAK2). Во-первых, это первичная диагностика классической формы полицитемии взрослых в условиях наличия клинико-лабораторных данных. Во-вторых, первичная диагностика классических форм эссенциальной тромбоцитемии или первичного миелофиброза взрослых при наличии клинических, лабораторных или морфологических данных в отсутствие результатов выявления гибрид-

ного белка BCR-ABL. Тестирование генетической мутации JAK2^{V617F} не считается необходимой с медицинской точки зрения процедурой в каких-либо иных случаях, чем вышеописанные показания в силу недостатка доказательств терапевтической ценности. С другой стороны, нет возможности ограничить использование данного теста для диагностики наличия миелопролиферативных новообразований у детей, а также количественной оценки бремени аллели JAK2^{V617F} вслед за ее качественным определением у взрослых. Более того, в последнее время были получены данные о наличии соматических мутаций гена JAK2^{V617F} не только у больных с классическими хроническими миелопролиферативными заболеваниями (хМПЗ), но и в ряде случаев при хронических миеломоноцитарных лейкозах, миелодиспластическом синдроме (МДС) и остром миелолейкозе. Предполагается, что JAK2^{V617F}-положительному острому миелолейкозу может предшествовать период эссенциальной тромбоцитемии, первичного миелофиброза или эритремии, что и приводит к выявленным изменениям.

Целью проведенного исследования стало изучение клинико-диагностического значения определения мутации V617F гена JAK2 у больных с поражением миелоидного ростка кроветворения.

Материалы и методы. Исследование включает изучение результатов тестирования образцов биологической жидкости 112 человек. Из них первую группу пациентов составили 56 больных хМПЗ, диагноз которых был установлен на основании клинико-лабораторных данных, верифицирован морфологически. Популяция представлена 23 мужчинами и 33 женщинами, средний возраст которых составил 59,9±2,4 года. Вторая группа исследования состояла из 15 пациентов, направленных с диагностической целью для верификации этого же диагноза. В ней было 8 мужчин и 7 женщин, средний возраст которых составил 52,2±4,8 года. Третья группа была представлена больными с МДС (16 человек). Среди них было 8 мужчин и столько же женщин, средний возраст 51,0±7,8 года. Четвертая группа состояла из 10 больных хроническим миелолейкозом. В ней было 6 мужчин, 4 женщины, среднего возраста 70,0±2,0 года. Контрольная группа была представлена 15 здоровыми добровольцами обоего пола, с равным гендерным представительством, средний возраст 54,2±8,6 года. В подавляющем большинстве случаев для исследования была использована периферическая кровь, стабилизированная антикоагулянтом ЭДТА, в некоторых случаях изучали костный мозг. Перед исследованием биологической материал стандартизировали. Количество копий мутантной аллели V617F гена JAK2 определяли методом ПЦР с детекцией результата в режиме реального времени, используя технологию TaqMan. Исследования выполнены на приборе Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Australia), реагенты Muta Quant (Ipsogen, France).

Основные результаты.

Связь уровня аллельной нагрузки с неблагоприятным течением хМПЗ была обнаружена разными авторами и в настоящее время является общепризнанным фактом. Очевидно, что она является как одним из диагностических критериев заболевания, так служит и для осуществления контроля эффективности лечения. В подавляющем большинстве случаев значение бремени аллели выражают в виде отношения количества выявленной мутантной аллели JAK2^{V617F} к уровню аллели дикого типа JAK2^{wt} или общему количеству аллелей, выраженного в процентах. Качественного анализа (констатации факта наличия или отсутствия данной мутации у пациента) для полного понимания клинической картины при хМПЗ становится уже недостаточно.

Проведенное исследование позволило установить, что у больных первой группы, представленной пациентами с хМПЗ, с диагностированной эссенциальной тромбоцитемией доля JAK2^{V617F} в суммарном количестве всех аллелей JAK2 составляет в среднем 25,1%±5,2%. Она варьирует в диапазоне от 10,0% до 43,6%. Наибольшие значения величин отмечаются у больных женщин. У пациентов мужского пола доля JAK2^{V617F} в суммарном количестве всех аллелей JAK2 варьирует в диапазоне, не превышающем среднего установленного значения для данной группы. Более того, получены данные, что частота встречаемости эссенциальной тромбоцитемии среди мужчин в три раза меньше, чем у обследованных женщин. У пациентов с подтвержденной истинной полицитемией доля JAK2^{V617F} в суммарном количестве всех аллелей JAK2 составляет в среднем 21,1%±7,7%. Она варьирует в значительных пределах – от 0,5% до 78,6%. Установлено, что высокие значения бремени мутантной аллели встречаются преимущественно у лиц мужского пола. Вместе с тем, гендерное соотношение пациентов с истинной полицитемией среди всех изученных больных равное. Среди всех больных с диагностированным хроническим миелопролиферативным заболеванием (56 человек) средняя величина аллельной нагрузки JAK2^{V617F} составила 26,7%±4,0%.

Другая группа обследованных состояла из 15 человек и была направлена на исследование с диагностической целью: для получения (отклонения) данных, свидетельствующих о наличии хМПЗ. Средняя величина аллельной нагрузки в этой группе была близка к вышеописанным значениям и составила 20,2%±7,4%. Однако, доля JAK2^{V617F} в суммарном количестве всех аллелей JAK2 более 10% была отмечена в 33,3% случаев с равной частотой встречаемости как у мужчин, так и у женщин, в то время, как подтвержденных случаях у женщин этот процент составлял - 50%, у мужчин – 52,4%.

Третью группу, 16 человек, составили больные с МДС. Материалом для исследования в данном случае послужил костный мозг. Доля JAK2^{V617F} в суммарном количестве всех аллелей JAK2 была в 1,5 – 2,0 раза выше, чем средние показатели у пациентов с хМПЗ. Она составляла 34,0%±3,0%. Вместе с тем, и значений, превышающих показатель в 40%, отмечено не было.

Четвертая группа была представлена 10 больными хроническим миелолейкозом. Данные по аллельной нагрузке варьировали от 36,4% до 98,6%. У этих же пациентов были выполнены исследования по сравнительной оценке доли JAK2^{V617F} в суммарном количестве всех аллелей JAK2 в пробах периферической крови и костного мозга. Было установлено, что расхождения значений в образцах одного и того же пациента составляют 1,52%, что может быть значимо при получении значений в диапазоне малых величин.

Контрольную группу составили 15 здоровых добровольцев обоего пола, аллельная нагрузка $JAK2^{V617F}$ в среднем в которой составила 1,5%±0,2%. Ее значения варьировали незначительно, а распределение не зависело от пола и возраста (от 26 до 71 года) испытуемых.

Заключение. Метод полимеразной цепной реакции с детекцией результата в режиме реального времени позволяет устанавливать различие бремени аллели $JAK2^{V617F}$ у больных с поражением миелоидного ростка кроветворения.

Контактное лицо: Бердюгина Ольга Викторовна д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории диагностических и экспериментальных методов исследования. Тел.: 8(904)988-43-82; berolga73@rambler.ru

ГЕНЫ СИСТЕМЫ РЕПАРАЦИИ: ПОПУЛЯЦИОННЫЕ РАЗЛИЧИЯ НАСЛЕДСТВЕННЫХ РАКОВ ЯИЧНИКОВ И МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, ВЫЯВЛЯЕМЫЕ МЕТОДОМ NGS

Бровкина О.И.[1], Гордиев М.Г.[2], Сакаева Д.Д. [3], Еникеев Р.Ф.[2], Дружков М.О.[2], Шигапова Л.Х.[4], Шагимарданова Е.И.[4], Гусев О.А.[4], Ходырев Д.С.[1], Никитин А.Г.[1]

[1] Лаборатория генетики, Федеральный научно-клинический центр ФМБА России. (г. Москва)
[2]ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер МЗ РТ»
[3]ГУЗ «Башкирский республиканский клинический онкологический диспансер МЗ РБ»
[4]Казанский (Приволжский) федеральный университет (г. Казань), RIKEN (Йокогама, Япония)

Введение

Встречаемость наследственного рака молочной железы (РМЖ) составляет примерно 5-10%, а наследственного рака яичников (РЯ)- около 20%. Развитие наследственных РЯ и РМЖ обусловлено генетическими нарушениями в системе репарации ДНК, состоящей из более чем 100 генов. Однако в настоящее время в большинстве медицинских центров России диагностика наследственного РЯ и РМЖ представляет собой определение наиболее частых мутаций (8 точек) в генах *BRCA1* и *BRCA2* с помощью ПЦР-методов. При этом данные мутации являются частыми для славянской популяции в то время как в остальных популяциях России они встречаются реже.

Цель и задачи

Целью этой работы является популяционный анализ мутаций в генах системы репарации, которые необходимо учитывать для назначения таргетных препаратов.

Материалы и методы

Методом секвенирования нового поколения (NGS) были проанализированы гены репарационной системы в 123 образцах крови от пациенток из татарской популяции с наследственным РЯ и РМЖ.

Критериями включения были как минимум два критерия из трех: молодой возраст возникновения РМЖ и РЯ (до 50 лет), отягощенный семейный анамнез (наличие одного и более РМЖ или РЯ у родственниц первой или второй линии родства), первично множественный РМЖ и РЯ, а также самоидентификация больных к татарскому этносу (не менее чем в двух поколениях в роду все родственники должны принадлежать к татарскому этносу).

Для сравнения частот встречаемости мутаций были методом ПЦР «в реальном времени» были проанализированы 49 образцов крови от пациенток славянского происхождения, проходивших обследование в Федеральном научно-клиническом центре ФМБА России (г. Москва) в 2014-2016 гг.

Основные результаты

Полученные результаты секвенирования 123 образцов пациенток с наследственным РМЖ можно разделить на две группы: патогенные и предположительно патогенные.

Таблица 1. Обнаруженные патогенные мутации

Ген	Координата hg19	Транскрипт: кДНК	Белок	Количество
BRCA1	chr17:41215382	NM_007300.3:c.5224C>T	p.Gln1742*	2
BRCA1	chr17:41209079	NM_007300.3:c.5329dup	p.Gln1777Profs*74	9
BRCA1	chr17:41258504	NM_007300.3:c.181T>G	p.Cys61Gly	2
BRCA1	chr17:41246513	NM_007300.3:c.1034_1035insC	p.Pro346Serfs*4	1
BRCA1	chr17:41245587	NM_007300.3:c.1961del	p.Lys654Serfs*47	1
BRCA1	chr17:41209095	NM_007300.3:c.5314C>T	p.Arg1772*	2
BRCA1	chr17:41243924	NM_007300.3:c.3624del	p.Lys1208Asnfs*2	1
BRCA1	chr17:41245587	NM_007300.3:c.1961del	p.Lys654Serfs*47	1
BRCA1	chr17:41244614	NM_007300.3:c.2934del	p.Arg979Valfs*21	1
BRCA1	chr17:41244282	NM_007300.3:c.3266del	p.Leu1089Cysfs*20	1
BRCA1	chr17:41215890	NM_007300.3:c.5215+1G>T	- (сайт сплайсинга)	1
BRCA1	chr17:41244761	NM_007300.3:c.2787del	p.Pro930Leufs*70	1
BRCA1	chr17:41246083	NM_007300.3:c.1465G>T	p.Glu489*	1

Ген	Координата hg19	Транскрипт: кДНК	Белок	Количество
BRCA1	chr17:41245918	NM_007300.3:c.1630del	p.Gln544Lysfs*2	1
BRCA1	chr17:41246633	NM_007294.3:c.915T>A	p.Cys305*	1
BRCA2	chr13:32900279	NM_000059.3:c.468dup	p.Lys157*	1
BRCA2	chr13:32906625	NM_000059.3:c.1010_1011insTG	p.Asp339Leufs*11	1
BRCA2	chr13:32906576	NM_000059.3:c.965_966dup	p.Val323Lysfs*2	2
BRCA2	chr13:32907409	NM_000059.3:c.1796_1800del	p.Ser599*	1
BRCA2	chr13:32968950	NM_000059.3:c.9381G>A	p.Trp3127*	1
BRCA2	chr13:32968836	NM_000059.3:c.9269del	p.Phe3090Serfs*14	1
BRCA2	chr13:32972745	NM_000059.3:c.10095_10096insT	p.Ser3366*	2
BRCA2	chr13:32906843	NM_000059.3:c.1231del	p.Ile411Tyrfs*19	1
BRCA2	chr13:32915113	NM_000059.3:c.6622_6623del	p.Asn2208Tyrfs*16	1
BRCA2	chr13:32915062	NM_000059.3:c.6574del	p.Met2192Trpfs*14	1
BRCA2	chr13:32914265	NM_000059.3:c.5773del	p.Gln1925Argfs*38	1
CDH1	chr16:68844220	NM_004360.4:c.808T>G	p.Ser270Ala	2
MUTYH	chr1:45800146	NM_001128425.1:c.74G>A	p.Gly25Asp	1
MUTYH	chr1:45800167	NM_001128425.1:c.53C>T	p.Pro18Leu	1
CHEK2	chr22:29091857	NM_001005735.1:c.1229del	p.Thr410Metfs*15	1
CHEK2	chr22:29099504	NM_001005735.1:c.1022_1026del	p.Tyr341Cysfs*12	1
CHEK2	chr22:29090060	NM_001005735.1:c.1550G>A	p.Arg517His	1
MUTYH	chr1:45797228	NM_001128425.1:c.1187G>A	p.Gly396Asp	2
RAD51C	chr17:56801399	NM_058216.2:c.905-2_905-1del	- (сайт сплайсинга)	1
CHEK2	chr22:29130389	NM_001005735.1:c.319+2T>A	- (сайт сплайсинга)	2
MUTYH	chr1:45798269	NM_001128425.1:c.667A>G	p.Ile223Val	1
MSH2	chr2:47630353	NM_000251.2:c.23C>T	p.Thr8Met	1
FANCI	chr15:89838324	NM_001113378.1:c.2635C>T	p.Arg879*	1

В первой группе было выявлено 39 мутаций у 54 пациенток. Ко второй группе были отнесены 22 мутации, присутствующие у 28 пациенток. У 15 пациенток были выявлены мутации в генах системы репарации, не относящихся к *BRCA1/BRCA2*, при этом именно эти мутации были патогенными (HGMD Professional 2016.4).

По результатам анализа ПЦР «в реальном времени» среди женщин славянского происхождения была выявлена мутация 5382insC (NM_007300.3:c.5329dup) в 47% случаев. Эта же мутация обнаруживалась лишь в 7% случаев у татарских женщин. Таким образом, мы подтвердили предположение о том, что ПЦР-наборы, которые используют для поиска мутаций в генах *BRCA1/BRCA2* в РФ, не столь эффективны в отношении пациенток татарского происхождения.

С помощью метода NGS появилась возможность выявить редкие мутации, характерные для различных этносов, что дает возможность исследовать обнаруженные мутации с помощью секвенирования по Сэнгеру у родственников пациенток.

Выводы

В результате проведенного NGS-анализа 123 пациенток с наследственными РМЖ и РЯ татарской национальности было выявлено 39 мутаций в генах системы репарации, что позволит оптимизировать тактику лечения и ведения этих пациенток.

ВЫЯВЛЕНИЕ ДРАЙВЕРНЫХ МУТАЦИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С РАКОМ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Левина Т.А.[1], Ткачев Г.А.[1], Бодунова Н.А.[2], Кирьянов С.А.[1]

[1] ООО «НекстБио», Москва, Россия
[2] ГБУЗ «МКНЦ» ДЗМ

Введение. Опухоли поджелудочной железы, главным образом протоковые аденокарциномы, относятся к одним из наиболее агрессивных типов раков. Средняя продолжительность жизни больных после установления диагноза может составлять от 4 до 15 месяцев, а 5-летняя выживаемость после перенесенной резекции – часто менее 5%.

Генетическим основанием онкогенеза рака поджелудочной железы (РПЖ) предположительно является клональная экспансия опухолевых клеток с наличием драйверных мутаций в генах *KRAS*, *BRAF* и *GNAS,* с последующим накоплением генетических и эпигенетических мутаций в генах *CDKN2A*, *TP53*, *SMAD4 u ARID1A.* Активирующие точечные мутации в экзонах 2 и 3 гена *KRAS* встречается более чем в 80 % протоковых аденокарцином разной локализации, что сопряжено с наихудшим прогнозом выживания. Мутации в генах *BRAF* и *GNAS* обнаруживается совокупно в менее чем 7% РПЖ.

Цель. Исходя из клонального характера накопления мутаций в данных генах проверить возможность мультивариантного накопления мутаций в разных позициях генов *KRAS, BRAF* и *GNAS* в образцах первичных опухолей РПЖ разной локализации методами аллель-специфичной ПЦР-амплификации и глубокого таргетного секвенирования.

Материалы и методы. В работе были использованы образцы опухолей из операционного материала, полученные от трех пациентов с диагнозом аденокарцинома головки поджелудочной железы в стадии T3NxM0, от двух пациентов с диагнозом рак внепеченочного желчного протока T3N1M0 и T3NxM0, одного пациента с диагнозом рак терминального отдела холедоха T3NxM0. Для выделения геномной ДНК отбирали по три гистологических образца каждого опухолевого материала с последующим гомогенизированием и выделением методом магнитной сорбции. Таргетное секвенирование с глубиной более 40 чтений на образец проводили после ПЦР-амплификации и клонирования фрагментов, покрывающих сайты наиболее часто встречающихся мутаций в экзонах 2 и 3 гена *KRAS,* экзоне 15 гена *BRAF* и экзонах 8 и 9 гена *GNAS*. Аллель-специфическую ПЦР-амплификацию собственной разработки с использованием специфичных блокирующих олигонуклеотидов использовали для определения процента представленности мутантных аллелей в кодонах 12, 13 и 61 гена *KRAS,* кодонах 597 и 600 гена *BRAF,* кодонах 201 и 227 гена *GNAS.* Чувствительность исследования позволяла выявить до 1.0% представленности мутантных аллелей на фоне аллелей дикого типа.

Результаты. Аллель-специфическая ПЦР-амплификация выявила мутации G12D гена *KRAS* во всех гистологических образцах двух из трех аденокарцином головки поджелудочной железы со средней представленностью 1.2% и 8.0%, что было подтверждено таргетным секвенированием. Мутация G12D (12.0%) гена *KRAS* была также детектирована в трех образцах опухоли пациента с диагнозом рак терминального отдела холедоха. Конкордантность с секвенированием по мутациям *KRAS* – 100%. Известные мутации в кодонах 201 и 227 гена *GNAS* выявлены не были.

Сиквенс-анализ образцов третьей аденокарциномы головки поджелудочной железы выявил новую мутацию G226D в гене *GNAS* с представленностью в опухоли около 18%. В одной злокачественной опухоли внепеченочного желчного протока была выявлена мутация G13R (10.0%) в гене *KRAS,* тогда как в другой опухоли были обнаружены две мутации в гене *BRAF* с разной представленностью – D594G (6.7%) и Q612E (3.3%). Данные мутационного анализа и представленности мутаций в РПЖ разной локализации представлены в таблице.

Пациент (возраст, пол)	Гистологический тип и локализация РПЖ	Стадия по классификации TNM	Детекция мутаций	
			АСБ-ПЦР (<%>)	Секвенироание (<%>)
I (77, мужской)	Рак головки поджелудочной железы	T3NxM0	G12D *KRAS* (1.2)	G12D *KRAS* (2.5)
II (64, мужской)	Рак головки поджелудочной железы	T3NxM0	G12D *KRAS* (8.0)	G12D *KRAS* (7.5)
III (62, мужской)	Рак головки поджелудочной железы.	T3NxM0	Нет данных	G226D *GNAS* (18.0)
IV (69, женский)	Злокачественное новообразование внепеченочного желчного протока	T3N1M0	G13R *KRAS* (10.0)	G13R *KRAS* (9.0)
V (66, мужской)	Рак внепеченочного желчного протока. Рак ободочной кишки	T3NxM0	Нет данных	D594G (6.7%) Q612E (3.3%) *BRAF*
VI (59, мужской)	Рак терминального отдела холедоха	T3NxM0	G12D *KRAS* (12.0)	G12D *KRAS* (14.0)

Выводы. Такие методы как аллель-специфичная ПЦР-амплификация с блокирующими олигонуклеотидами и глубокое секвенирование позволяют выявлять основные драйверные мутации с представленностью выше 1% в опухолях РПЖ. Возможность клонального накопления драйверных мутаций в разных позициях гена *KRAS* в зависимости от локализации опухоли требует дальнейших исследований.

АНАЛИЗ АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФНЫХ ЛОКУСОВ rs7766585 И rs741581 С РАЗВИТИЕМ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Бермишева М.А.[1], **Тахирова З.Р.**[1], **Хуснутдинова Э.К.**[1,2]

[1]*ФГБУН «Институт биохимии и генетики» УНЦ РАН, Уфа, Россия*
[2]*ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет», Уфа, Россия*

Цель исследования - изучение ассоциации полиморфных вариантов rs7766585 гена *ESR1* и rs741581 гена *PPARGC1B* с развитием рака молочной железы у женщин из Республики Башкортостан.

Материалы и методы. В работе использованы образцы ДНК, выделенные из венозной крови пациенток РМЖ. Материал собран на базе РКОД ГБУЗ (г. Уфа) и ГБУЗ РБ КБ №1 (г. Стерлитамак) за период 2007-2014 гг. Средний возраст пациенток с РМЖ составляет 52.2 года. Контрольная группа представлена женщинами без онкологической патологии на момент забора крови. Выборки больных РМЖ и контроля представлены женщинами, принадлежащими к трем этническим группам - русские, татары и башкиры, проживающими в РБ. Генотипирование локусов *rs741581* в гене *PPARGC1B* и *rs7766585* в гене *ESR1* проведено в выборках, включающих 537 больных РМЖ и 566 здоровых индивидов. Детекция проводилась методом дискриминации аллелей *Taqman*.

Рак молочной железы относится к гормонозависимым опухолям. Нарушения механизмов регуляции гормоногенеза (Bartella et al., 2012), передачи сигналов клеткам и др. могут приводить к раку. Большой интерес у исследователей вызывают гены рецепторов эстрогена. Ген *ESR1 (Estrogen receptor alpha gene)* локализован на хромосоме 6q25.1 и кодирует эстрогеновый рецептор ERα. В случае нарушения его работы, происходит изменение его связывания с коактиваторами, вовлеченными в процесс образования гормонов. Сравнительный анализ частот аллелей и генотипов полиморфного варианта *rs7766585* в гене *ESR1* между группами «больные РМЖ – контроль» не выявил достоверных различий, как в общих выборках (таблица), так и с учетом этнической принадлежности. Таким образом, мы говорим об отсутствии ассоциации полиморфного варианта *rs7766585* с развитием РМЖ ($p > 0.05$). При дальнейшей стратификации исследуемых групп больных с учетом различных клинических признаков (возраст, менопаузальный статус, стадия заболевания, семейная история, гормональный статус, поражение лимфоузлов) статистически значимых различий также не обнаружено. Наши данные противоречат результатам, представленным в работе Harlid et al., где полиморфный локус *rs7766585* гена *ESR1*, ассоциирован с повышенным риском развития рака молочной железы (OR=1.30. 95%CI=1.17-1.45. $p= 2.1 \times 10^{(6)}$) в североевропейских популяциях (Harlid et al., 2011).

Ген *PPARGC1B* расположен в области 5q32 хромосомы и кодирует белок - активатор пролиферации пероксисомального рецептора - γ - коактиватора - 1β (Lelliott et al., 2009). PGC - 1β транскрипционный коактиватор принимает участие в механизме регулирования уровня гормонов, а именно, усиливает работу эстрогенового рецептора ERα. PPARGC1B повышает транскрипционную активность рецептора ERα не только в ответ на присутствие специфических лигандов, таких как эстрадиол, но и в отношении селективных ER-модуляторов (тамоксифен) (Kressler et al., 2007). Структурные изменения в гене *PPARGC1B* способны повлиять на его функционирование. Сравнительный анализ частот аллелей и генотипов полиморфного варианта *rs741581* в гене *PPARGC1B* между больными РМЖ и контролем (таблица), как в целом, так и после стратификации по этническим группам достоверных различий не выявил ($p > 0.05$). Дальнейший анализ с учетом клинических признаков у больных определил, что у носителей генотипа**A*G* локуса *rs741581* понижена вероятность развития эстроген положительного РМЖ. Так, у женщин с опухолями негативными по статусу эстрогена частота гетерозиготного генотипа **A*G* превышает таковую у пациенток с карциномами ER+-типа (15.69% и 2.74%, соответственно). В группе больных с ER+ статусом опухоли выше частота генотипа **G*G*, чем у больных с ER- статусом карциномы (95.89 и 84.31%). Оценка показателя относительного риска развития РМЖ ER+ составила*:* OR: 0.15 (0.02-0.83), p_{fdr}=0.0174 (AG *vs* GG + AA).

Таблица. Распределение частот генотипов и аллелей полиморфных вариантов *rs7766585* в гене *ESR1* *rs741581* в гене *PPARGC1B* в общих выборках больных РМЖ и контроля

Генотипы, аллели		Случай, n=536		Контроль, n=555		**OR** (95% доверительный интервал), **p, p_{fdr}**
		n	**p_i±Sp, CI%**	**n**	**p_i±Sp, CI%**	
Генотипы *rs7766585*	***TT***	398	74.25±1.89 (70.33-77.91)	404	72.79±1.89 (68.89-76.46)	***GG vs TT + GT:*** 0.73 (0.30-1.78) **p** =0.59, **p_{fdr}** =1
	TG	128	23.88±1.84 (20.33-27.72)	137	24.68±1.83 (21.15-28.49)	
	GG	10	1.87±0.58 (0.90-3.40)	14	2.53±0.67 (1.39-4.20)	

Генотипы, аллели		Случай, n=536		Контроль, n=555		**OR** (95% доверительный интервал), **p, p_{fdr}**
		n	**p_i±Sp, CI%**	**n**	**p_i±Sp, CI%**	
Аллели *rs7766585*	***T***	924	86.19±1.05 (83.98-88.20)	945	85.14±1.07 (82.90-87.18)	***G vs T:*** 0.92 (0.72-1.17) **P=**0.51, **p_{fdr}**=1
	G	148	13.81±1.05 (11.80-16.02)	165	14.86±1.07 (12.82-17.10)	
Генотипы *rs741581*	*GG*	497	92.55±1.13 (89.99-94.63)	538	95.05±0.91 (92.93-96.69)	***AA vs GG + GA:*** 2.48 (0.58-12.13) **p**=0.30, **p_{fdr}**=1
	GA	33	6.15±1.04 (4.27-8.52)	25	4.42±0.86 (2.88-6.45)	
	AA	7	1.30±0.49 (0.53-3.40)	3	0.53±0.31 (0.11-1.54)	
Аллели *rs741581*	***G***	1027	95.62±0.62 (83.98-88.20)	1101	97.26±0.49 (96.14-98.13)	***A vs G:*** 1.62 (1.00-2.64) **p** =0.049, **p_{fdr}**=0.25
	A	47	4.38±0.62 (3.23-5.78)	31	2.74±0.49 (1.87-3.86)	

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта № 14-04-97088 РФФИ-Поволжье.

Список литературы

1. V. Bartella, P. De Marco, R. Malaguarnera et al. New advances on the functional cross-talk between insulin-like growth factor-I and estrogen signaling in cancer. Cellular signalling. 2012. V. 24. № 8. P. 1515-1521.

2. S. Harlid M.I. Ivarsson S. A candidate CpG SNP approach identifies a breast cancer associated ESR1-SNP / Butt // International Journal of Cancer. 2011. V. 129. № 7. P. 1689-1698.

3. D. Kressler, M.B. Hock, A. Kralli. Coactivators PGC-1β and SRC-1 interact functionally to promote the agonist activity of the selective estrogen receptor modulator tamoxifen. Journal of Biological Chemistry. 2007. V. 282. № 37. P. 26897-26907.

4. J. Lelliott, A. Vidal-Puig. PGC-1β: a co-activator that sets the tone for both basal and stress-stimulated mitochondrial activity / C // Early Nutrition Programming and Health Outcomes in Later Life. – Springer Netherlands. – 2009. – P. 133-139.

АНАЛИЗ НАРУШЕНИЙ В ЭКСПРЕССИИ микроРНК ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С РАЗЛИЧНЫМ СТАТУСОМ ПО HER-2/NEU

Гутковская Е.А.

РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова, Минск, Беларусь

Введение. Рак молочной железы (РМЖ) – гетерогенное заболевание, которое включает большое количество фенотипически различных гистологических вариантов опухолей. Уровень экспрессии рецептора эпидермального фактора роста Her-2/neu, который характеризует клинически различные по степени агрессивности типы опухолей, меняется во время прогрессирования опухолевого процесса и в ответ на проводимую противоопухолевую терапию. В настоящее время активно изучаются нарушения в экспрессии генов, кодирующих микроРНК при РМЖ, а также их взаимосвязь с клинико-морфологическими характеристиками опухолей молочной железы и их молекулярным фенотипом.

Цель и задачи. Оценить спектр нарушений в экспрессии микроРНК (miR-145, miR-155, let-7c, miR-182, miR-21) при раке молочной железы с различным статусом по рецептору эпидермального фактора роста Her-2/neu.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужили 163 образца опухолевой ткани, заключенной в парафин, пациенток с РМЖ IIA-IIIC стадий. Молекулярно-генетические исследования выполняли с использованием метода полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени». Оценка уровня экспрессии микроРНК осуществлялась методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$. В качестве референсного гена использовали мяРНК RNU1. Определение статуса РМЖ по рецептору эпидермального фактора роста Her2/neu осуществлялось иммуногистохимическим методом.

Основные результаты. Средний возраст обследованных пациенток составил 53,4±11,0 года. В анализируемой группе преобладала (n=89; 54,6%) III стадия опухолевого процесса. Наиболее частым морфологическим типом опухоли явилась протоковая аденокарцинома (n=127; 78%) с умеренной степенью дифференцировки (n=122; 74,8%). Позитивный статус по рецептору эпидермального фактора роста Her-2/neu диагностирован у 53 (32,5%) пациенток, отрицательный – в 110 (67,5%) наблюдениях.

По результатам проведенного молекулярно-генетического исследования установлено, что уровень экспрес-

сии микроРНК miR-145 у пациенток, страдающих РМЖ, колебался в пределах от 0,03 до 3,36 отн. ед., miR-155 – 0,41 до 25,81 отн. ед., let-7c – 0,03 до 2,27 отн. ед., miR-182 – 0,16 до 21,11 отн. ед., miR-21 – 0,37 до 47,18 отн. ед.

Нарушения в экспрессии микроРНК выявлены у 134 (82,2%) пациенток, при этом, в 104 случаях (77,6%), изменения затрагивали 1–2 микроРНК.

Характер изменения экспрессии let-7c и miR-145 соответствовал низкому уровню; miR-155, miR-182 и miR-21 – высокому. В исследуемой выборке низкий уровень экспрессии let-7c установлен у 31 (19%) и miR-145 – у 34 (20,9%) пациенток. Высокий уровень микроРНК miR-155 выявлен в 39 (23,9%) случаях, miR-182 – у 49 (30,1%) и miR-21 – у 94 (57,7%) пациенток.

Анализ аберрантной экспрессии исследуемого спектра микроРНК показал, что при Her-2/neu-положительном статусе РМЖ преобладала патологически высокая экспрессия онкогенных микроРНК miR-155, miR-21 и miR-182, а при Her-2/neu-отрицательном РМЖ – низкая экспрессия микроРНК-супрессоров опухоли let-7c и miR-145. У пациенток с Her-2/neu-положительными опухолями молочной железы высокий уровень miR-155 установлен в 20 (37,7%), miR-21 – в 38 (71,2%), miR-182 – в 19 (35,9%) случаях. Низкая экспрессия let-7c и miR-145 диагностирована в 8 (15,1%) наблюдениях соответственно.

В группе пациенток с Her-2/neu-отрицательным РМЖ высокая экспрессия miR-155 отмечена в 19 (17,3%), miR-21 – в 56 (51%), miR-182 – в 30 (27,9%) случаях. Снижение уровня экспрессии let-7c выявлено в 23 (21%) наблюдениях, miR-145 – у 26 (23,6%) женщин. Установлено статистически значимое преобладание высокого уровня экспрессии miR-155 (X^2=8,228; p<0,01) и miR-21 (X^2=5,791; p<0,05) при Her-2/neu-позитивном РМЖ.

Оценка распределения патологической экспрессии исследуемого спектра микроРНК в зависимости от гистологического варианта и Her-2/neu статуса РМЖ показала, что в большинстве случаев аберрантная экспрессия let-7c (n=18; 21,7%) характерна для протокового, а miR-145 (n=9; 33,3%) – долькового морфотипа РМЖ с Her-2/neu-отрицательным статусом. В свою очередь патологически высокая экспрессия miR-155 (n=18; 40,9%) и miR-182 (n=15; 51,7%) отмечалась, преимущественно, при протоковом, а miR-21 (n=7; 77,8%) – дольковом Her-2/neu-позитивном РМЖ.

Исследование профиля микроРНК в зависимости от степени дифференцировки опухоли и статуса РМЖ по Her-2/neu выявило преобладание низкой экспрессии miR-145 (n=20; 25,3%) при умеренной, а let-7c (n=7; 31,8%) – низкой степени дифференцировки РМЖ отрицательного по Her-2/neu. Высокий уровень экспрессии miR-21 (n=32; 74,4%), miR-182 и miR-155 (n=17; 39,5%) ассоциировался, главным образом, с умеренно дифференцированным Her-2/neu-положительным РМЖ соответственно.

Выводы. Рак молочной железы характеризуется значительными нарушениями в системе микроРНК: низким уровнем экспрессии микроРНК-супрессоров опухоли (let-7c, miR-145) и высокой экспрессией онкогенных микроРНК (miR-21, miR-155, miR-182). Для рака молочной железы с различным морфотипом, степенью дифференцировки и Her-2/neu-статусом характерен специфический профиль экспрессии микроРНК. Выявлена ассоциация высокого уровня экспрессии miR-155 (X^2=8,228; p<0,01) и miR-21 (X^2=5,791; p<0,05) с Her-2/neu-позитивным РМЖ.

КОМПЛЕКС МЕТОДИК, ОСНОВАННЫХ НА ТЕХНОЛОГИИ ПИРОСЕКВЕНИРОВАНИЯ, ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ Ph-НЕГАТИВНЫХ ХРОНИЧЕСКИХ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ НЕОПЛАЗИЙ

Дунаева Е.А.[1], Миронов К.О.[1], Субботина Т.Н.[2,3], Ольховский И.А.[3,4], Шипулин Г.А.[1]

[1] ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия
[2] ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», Красноярск, Россия
[3] Красноярский филиал ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, Красноярск, Россия
[4] ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр» СО РАН, Красноярск, Россия

Введение. В соответствии с международными и отечественными клиническими рекомендациями выявление соматических мутаций в генах JAK2, MPL и CALR является важным диагностическим критерием Ph-негативных хронических миелопролиферативных неоплазий (ХМН) [1, 2]. Соматическая мутация V617F в гене JAK2, наиболее частая находка при разных фенотипах Ph-негативных ХМН, ассоциирована, в 95% с развитием истинной полицитемии, в 55% с эссенциальной тромбоцитемией и в 45–68% с первичным миелофиброзом. При этом чувствительность используемой методики обнаружения циркулирующих в венозной крови небольшого количества трансформированных мутацией V617F клеток имеет важное значение для выявления латентных форм ХМН и лиц с высоким риском сосудистых тромбозов. В отличие от мутации V617F, мутации в онко-ассоциированной области 12 экзона гена JAK2 являются высокоспецифичными только для одной из клинических форм ХМН – истинной полицитемии, хотя и выявляются всего в 3-5% случаев этого заболевания. Выявление активирующих мутаций, обуславливающих ХМН, может быть использовано для мониторинга уровня клонального гемопоэза в развитии заболевания и оценке эффективности терапии.

Цель и задачи. Целью исследования явилась разработка методик количественной детекции соматических мутаций – диагностических маркеров ХМН, основанных на технологии пиросеквенирования. В задачи исследования входил анализ мутаций, содержащихся в базе данных COSMIC (http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/), выбор олигонуклеотидов и параметров секвенирования с использованием технологии, описанной в [3], оптимизация методик для повышения чувствительности анализа, и их клиническая апробация.

Материалы и методы. Для выявления соматических мутаций использовались реагенты для постановки ПЦР и пробоподготовки из набора реагентов «АмплиСенс® Пироскрин» (ФБУН «Центральный НИИ Эпидемиологии»). Определение нуклеотидных последовательностей проводилось на приборе «PyroMark Q24» с использованием набора «PyroMark® Q96 Gold Reagents» («Qiagen», Германия). Для клинической апробации методик использованы образцы ДНК, выделенных от пациентов, направленных на обследование в Красноярский филиал ФГБУ Гематологического научного Центра Минздрава России с подозрением на ХМН. Выделение ДНК проводили из лейкоцитов 250 мкл цельной периферической крови с использованием набора «ДНК-сорб-В» (ФБУН «Центральный НИИ Эпидемиологии»).

Основные результаты. Разработана методика для определения мутации V617F в гене JAK2. Этот вариант методики включен в форму комплектации 8 «ТРОМБО-скрин» набора реагентов «АмплиСенс® Пироскрин» (ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии», регистрационное удостоверение № ФСР 2012/13246 от 19 марта 2012 года) [4]. Методика позволяет количественно детектировать мутантную аллель, начиная от 7%, при этом «серая зона» находится в диапазоне от 4 до 6% [3]. Использование вариантов амплификации COLD-ПЦР и аллель-специфичной ПЦР, направленных на избирательную амплификацию мутантной аллели, позволило повысить чувствительность определения мутации до 0,25% (при концентрации анализируемого контрольного образца 10^4 копий ДНК/ПЦР) для аллель-специфичной ПЦР и до 0,5% (при концентрации 10^5 копий ДНК/ПЦР) для COLD-ПЦР [5]. Данная чувствительность является более чем достаточной для ранней диагностики ХМН [6]. При проведении сравнительной апробации методик на клиническом материале, полученном от 106 пациентов с подозрением на ХМН, методом COLD-ПЦР было выявлено 13 (14%), а методом аллель-специфичной ПЦР – 15 положительных образцов (16%). Во всех 15 случаях обнаружения мутации было получено клиническое подтверждение диагноза ХМН. Данная чувствительность методики аллель-специфичной ПЦР позволяет ее использовать для скрининга пациентов из групп риска сердечно-сосудистых заболеваний, в патогенез которых могут быть вовлечены тромбофилетические нарушения, обусловленные мутацией V617F [7].

Для определения других клинически значимых мутаций, используемых в комплексной диагностике ХМН, был разработан алгоритм пиросеквенирования и анализа результатов на наличие всех известных клинически значимых вариантов соматических мутаций в 12 экзоне гена JAK2 (делеций, инсерций и точечных мутаций), в нуклеотидной последовательности, соответствующей аминокислотным остаткам с 533 по 547 белка JAK2. При клинической апробации методики на 120 образцах ДНК, выделенных из крови пациентов с высоким уровнем гемоглобина и гематокрита, и не содержащих мутацию V617F, было найдено 4 мутации в анализируемой последовательности. Все найденные мутации ассоциированы с истинной полицитемией; уровень аллельной нагрузки мутантной аллели находился в диапазоне от 11 до 52%. Подробное описание методики и спектр выявленных мутаций описаны в [8].

В настоящее время проводится разработка методик определения соматических мутаций в 9 экзоне гена CALR и мутаций W515 в гене MPL, которые являются важными диагностическими маркерами эссенциальной тромбоцитемии и первичного миелофиброза.

Заключение. Соматические мутации в генах JAK2, CALR и MPL имеют ключевое значение для диагностики Ph-негативных ХМН и принятия клинических решений [1,2]. Разрабатываемый нами комплекс методик, основанных на технологии пиросеквенирования, помогает в дифференциальной диагностике истинной полицитемии, эссенциальной тромбоцитемии, первичного миелофиброза от ряда других миелопролиферативных заболеваний, а также вторичных (реактивных) эритроцитозов и тромбоцитозов. Несмотря на то, что окончательный диагноз ХМН в соответствии с рекомендациями ВОЗ 2016 года требует морфологического исследования костного мозга, поиск клинически значимых соматических мутаций в генах JAK2, CALR и MPL является необходимым молекулярно-генетическим исследованием для пациентов с подозрением на ХМН [9].

Список литературы

1. Tefferi A. Myeloproliferative neoplasms: a decade of discoveries and treatment advances. Am.J.Hematol. 2016; 91(1): 50-58.

2. Клинические рекомендации по диагностике и терапии Ph-негативных миелопролиферативных заболеваний (истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия и первичный миелофиброз). Гематология и трансфузиология. 2014; 4: 31-56.

3. Миронов К.О., Дунаева Е.А., Дрибноходова О.П. и др. Детекция генетических полиморфизмов с использованием системы генетического анализа на основе пиросеквенирования PyroMark Q24. Справочник заведующего КДЛ. 2011; 4: 39-48.

4. Дунаева Е.А., Миронов К.О., Дрибноходова О.П. и др. Количественное определение мутации V617F в гене JAK2 методом пиросеквенирования. Клиническая лабораторная диагностика. 2014; 59(11): 60-63.

5. Дунаева Е.А., Миронов К.О., Субботина Т.Н. и др. Разработка и сравнительная апробация методик для повышения чувствительности определения мутации V617F в гене JAK2 методом пиросеквенирования. Клиническая лабораторная диагностика. 2017.

6. Субботина Т.Н., Ольховский И.А. Сравнительная характеристика методов количественной оценки мутации V617F в гене JAK2. Молекулярная диагностика – 2014. Т.2: 126. М., 2014.

7. Миронов К.О., Дунаева Е.А., Дрибноходова О.П. и др. Частота мутации V617F в гене янус-киназы-2 (JAK2) у лиц, перенесших ишемический инсульт. Молекулярная диагностика – 2017. М., 2017.

8. Дунаева Е.А., Субботина Т.Н., Миронов К.О. и др. Выявление и количественная оценка соматических мутаций в 12 экзоне гена JAK2 методом пиросеквенирования. Молекулярная диагностика – 2017. М., 2017.

9. Ольховский И.А., Горбенко А.С., Субботина Т.Н., Столяр М.А. Современные возможности молекулярно-генетического анализа в диагностике хронических миелоидных опухолей. Медицинский алфавит. 2015; 18(4): 44-46.

ГИПЕРМЕТИЛИРОВАНИЕ ПРОМОТОРНЫХ ОБЛАСТЕЙ ГЕНОВ *AMOTL1, ZNF43, ZNF134* И *CHFR* – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ МАРКЕР CIMP+ ОПУХОЛЕЙ ТОЛСТОЙ КИШКИ

Краснов Г.С., Кудрявцева А.В., Мельникова Н.В., Бениаминов А.Д., Дмитриев А.А.

ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

Введение

CIMP+ фенотип (CpG-Island Methylator Phenotype) представляет собой отдельную группу опухолей, характеризующуюся плотным метилированием промоторных CpG-островком одновременно многих генов [1]. На сегодняшний день его существование среди эпителиальных опухолей является общепризнанным только для рака толстой кишки [2]. Ранняя диагностика CIMP+ фенотипа имеет значительную прогностическую ценность [1], однако наборы маркерных генов для его определения существенно различаются в разных исследованиях, что приводит к серьезным затруднениям при анализе результатов [2].

Цель и задачи

Целью данного исследования была идентификация перспективных маркеров для определения CIMP+ фенотипа при раке толстой кишки на основе системного подхода, включающего анализ современных транскриптомных и метиломных баз данных (таких как TCGA, The Cancer Genome Atlas) и последующее экспериментальное подтверждение полученных данных на выборке образцов опухолей российских пациентов.

Материалы и методы

В работе использовали данные ресурса TCGA по уровню метилирования CpG-сайтов (β-value), полученные с помощью микрочипов Infinium HumanMethylation450 (Illumina, США), а также по уровню экспрессии, полученные с помощью высокопроизводительного секвенатора Illumina HiSeq. Ассоциацию сайта с промоторной областью гена определяли на основе данных ENCODE. Для проведения экспериментальной части исследования сформирована коллекция из 30 образцов первичных опухолей и 30 образцов парных к ним гистологически нормальных тканей («условных норм») толстой кишки. Уровень мРНК целевых генов оценивали методом количественной ПЦР с использованием метода ΔΔCt и двух контрольных генов (*RPN1* и *PUM1*) на сформированной выборке образцов. Значимыми считали изменения в 2 и более раз. Анализ данных количественной ПЦР выполнен с использованием разработанного ранее приложения АТГ [3]. Статус метилирования ДНК на сформированной выборке образцов оценивали методом бисульфитной конверсии с последующим клонированием и секвенированием по Сэнгеру. Праймеры для амплификации интересующих фрагментов конвертированной ДНК подобраны с использованием разработанного приложения InMethyl, которое позволяет создавать наборы праймеров для оценки профилей метилирования даже протяженных CpG-островков. Для каждого образца секвенировано по 10 клонов, для всех секвенированных CpG-сайтов рассчитаны значения β-value – отношение количества клонов с метилированным сайтом к общему числу клонов.

Основные результаты

С использованием разработанного ранее приложения CrossHub [4] провели анализ профилей метилирования для 297 образцов первичных опухолей и 38 парных к ним «условных норм» толстой кишки, представленных в TCGA. Для выявления CpG-сайтов – перспективных маркеров CIMP+ фенотипа разработан скоринг, учитывающий уровень метилирования CpG-сайтов, их расположение и уровень экспрессии соответствующих генов. Для дальнейшего анализа отбирали гены, для сразу нескольких CpG-сайтов которых получены высокие значения скора. В результате выбраны 4 гена: *AMOTL1*, *ZNF43*, *ZNF134* и *CHFR*. Определены участки промоторных областей этих генов, гиперметилирование которых является функциональным и ассоциировано с CIMP+ фенотипом опухоли: *AMOTL1* – chr.11: 94501368-94501719 (сборка hg19), *ZNF43* – chr.19: 22018747-22018959, *ZNF134* – chr.19: 58125532-58125868 и *CHFR* – chr.12: 133463886-133464328, 133464690-133464858. Цинковые пальцы (ZNF) являются самым крупным семейством транскрипционных факторов, которые играют ключевые роли в большинстве клеточных процессов [5]. Ген *AMOTL1* кодирует периферический мембранный белок, участвующий в контроле парацеллюлярной проницаемости и поддержании клеточной полярности. Ген *CHFR* кодирует убиквитинлигазу необходимую для поддержания контрольной точки, регулирующей вхождение клетки в митоз [genecards.org]. Оценили относительный уровень мРНК выбранных генов в 30 парных (опухоль/«условная норма») образцах толстой кишки методом количественной ПЦР. Для гена *AMOTL1* выявлено сохранение или незначительное повышение (в 2 раза) уровня мРНК в 40% опухолевых образцов по сравнению с образцами парных «условных норм» и снижение в 2-20 раз в остальных 60% случаев. Для гена *ZNF43* показано снижение экспрессии в 2-30 раз в 60% случаев, для гена *ZNF134* – в 2-15 в 53% и для гена *CHFR* – в 2-12 раз в 47%. В остальных случаях обнаружено сохранение экспрессии. Для дальнейшего анализа отобрано 6 образцов с одновременным снижением экспрессии всех 4-х генов, именно эти образцы, скорее всего, представляют CIMP+ фенотип опухоли. Кроме того, в анализ были включены 4 образца с сохранением уровня мРНК 4-х генов или незначительным (2 раза) снижением/повышением одного из них, эти образцы, скорее всего, относятся к CIMP- фенотипу. Выполнена бисульфитная конверсия ДНК из выбранных образцов опухолей и парных к ним «условных норм» с последующим клонированием и секвенированием областей, гиперметилирование которых по данным проведенного биоинформатического анализа ресурса TCGA ассоциировано с CIMP+ фенотипом опухоли. Во всех 10-ти образцах условных норм и 4-х образцах опухоли, веро-

ятно относящихся к CIMP- фенотипу, значения β-value CpG-сайтов не превышали 0,2. Для 6-ти образцов опухоли, предположительно относящихся к CIMP+ фенотипу, подтверждена высокая частота гиперметилирования сайтов, статус метилирования которых может быть использован в качестве маркера CIMP+ фенотипа (β-value = 0,3-0,9).

Заключение

Комплексный анализ данных ресурса TCGA позволил идентифицировать CpG-сайты, гиперметилирование которых функционально и ассоциировано с CIMP+ фенотипом опухолей толстой кишки. Полученный результат подтвержден на выборке первичных опухолей российских пациентов. Таким образом, статус метилирования CpG-сайтов генов *AMOTL1*, *ZNF43*, *ZNF134* и *CHFR* является перспективным потенциальным маркером CIMP+ опухолей толстой кишки.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Москвы (грант 15-34-70055 мол_а_мос), а также Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Список используемой литературы

1. Hughes, L.A., et al., The CpG island methylator phenotype: what's in a name? Cancer Res, 2013. 73(19): p. 5858-68.

2. Suzuki, H., et al., Biological significance of the CpG island methylator phenotype. Biochem Biophys Res Commun, 2014. 455(1-2): p. 35-42.

3. Krasnov, G.S., et al., RPN1, a new reference gene for quantitative data normalization in lung and kidney cancer. Molecular Biology, 2011. 45(2): p. 211-220.

4. Krasnov, G.S., et al., CrossHub: a tool for multi-way analysis of The Cancer Genome Atlas (TCGA) in the context of gene expression regulation mechanisms. Nucleic Acids Res, 2016. 44(7): p. e62.

5. Jen, J. and Y.C. Wang, Zinc finger proteins in cancer progression. J Biomed Sci, 2016. 23(1): p. 53.

ВЫЯВЛЕНИЕ И КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА СОМАТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ В 12 ЭКЗОНЕ ГЕНА JAK2 МЕТОДОМ ПИРОСЕКВЕНИРОВАНИЯ

Дунаева Е.А.[1], Субботина Т.Н.[2,3], Миронов К.О.[1], Ольховский И.А.[3,4], Шипулин Г.А.[1]

[1] ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

[2] ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», Красноярск, Россия

[3] Красноярский филиал ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, Красноярск, Россия

[4] ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр» СО РАН, Красноярск, Россия

Введение. Выявление соматических мутаций в соответствии с международными и течественными клиническими рекомендациями имеет важное значение для дифференциального диагноза и прогноза течения онкогематологиченских заболеваний. Перспективы внедрения новых таргетных препаратов при Ph-негативных хронических миелопролиферативных неоплазиях (ХМН) предполагают разработку и использование количественных тестов оценки эффективности терапии, основанных на определении уровня аллельной нагрузки мутированного аллеля. Мутации в онко-ассоциированной области 12 экзона гена янус-киназы 2 (JAK2) специфичны для одной из клинических форм ХМН – истинной полицитемии. Вместе с тем, диагностическое исследование 12 экзона гена JAK2 у пациентов с подозрением на истинную полицитемию до сих пор остается малодоступным во многих регионах страны.

Цель и задачи. Целью данной работы явилась разработка методики, основанной на технологии пиросеквенирования, позволяющей выявлять соматические мутации в онко-ассоциированной области 12 экзона гена JAK2. В задачи исследования входили анализ мутаций, содержащихся в базе данных COSMIC (http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/), выбор олигонуклеотидов и параметров секвенирования заданной нуклеотидной последовательности, оптимизация ПЦР и клиническая апробация методики.

Материалы и методы. Для выявления соматических мутаций в 12 экзоне гена JAK2 использовался набор реагентов «АмплиСенс® Пироскрин» (ФБУН «Центральный НИИ Эпидемиологии», Россия). Определение нуклеотидных последовательностей проводилось на приборе «PyroMark Q24» с использованием набора «PyroMark® Q96 Gold Reagents» («Qiagen», Германия).

Для проведения анализа 12 экзона были выбраны праймеры для ПЦР: CTC-ACC-AAC-ATT-ACA-GAG-GCC-TAC-T и biotin-GTC-ACA-TGA-ATG-TAA-ATC-AAG-AAA-ACA-GAT-G, и два праймера для пиросеквенирования: S1 CTC-ACC-AAC-ATT-ACA-GAG-GCC-TAC-T и S2 GCC-TAC-TCA-TAT-GAA-CCA-AAT-GG. Размер амплифицируемого фрагмента – 155 пар оснований. ПЦР проводилась в объеме 25 мкл. Смесь для проведения реакции готовилась следующим образом: праймеры и нуклеотидтрифосфаты смешивалась с 0,5 мкл реактива «Полимераза TaqF», 9,5 мкл «2,5хПЦР-буфера blue» и 10 мкл выделенной ДНК (ФБУН «Центральный НИИ Эпидемиологии», Россия). Использовалась следующая программа амплификации: 95°С – 15 минут; 95°С – 15 секунд, 60°С – 15 секунд, 72°С – 20 секунд (45 циклов).

Клиническую апробацию методики проводили на 120 образцах ДНК, полученных от пациентов с подозрением на ХМН и высокой клинико-гематологической вероятностью истинной полицитемии. Выделение ДНК проводили из лейкоцитов 250 мкл цельной периферической крови с использованием набора «ДНК-сорб-В» (ФБУН «Центральный НИИ Эпидемиологии», Россия).

Для секвенирования продуктов амплификации использовалась последовательность подачи нуклеотидов в реакцию, учитывающая все возможные варианты мутаций (замены, инсерции, делеции) на протяжении 533-547 кодонов. Анализ результатов осуществлялся с помощью программного обеспечения «PyroMark Q24 2.0.6» в количественном формате (AQ). Для оценки фоновых значений

в позициях, не содержащих мутацию, в каждой постановке параллельно с клиническими образцами анализировался контрольный образец, не содержащий никаких мутаций.

Подтверждение наличия мутаций в образцах с отклонениями от последовательности контрольного образца проводилось секвенированием по методу Сэнгера с предварительным клонированием ДНК в вектор pGem-T. Секвенирование клонов проводилось с использованием реагентов и оборудования фирмы «Applied Biosystems» (США).

Основные результаты. В результате анализа онко-ассоциированной области среди 120 образцов было выявлено 4 пробы, которые содержали следующие соматические мутации: N542-E543 (delAATGAA), I540-E543 (delinsTCAGAAATG<AAA), N542-E543 (delAAATGA) и R541-E543 (delGAAATG). Уровень нагрузки мутантной аллели составлял от 11 до 52%. У одного пациента с мутацией I540-E543 также выявлена мутация V617F в 14 экзоне гена JAK2 с нагрузкой мутантной аллели менее 1%. Наличие мутаций одновременно в 12 и 14 экзоне гена JAK2, согласно анализу литературы, наблюдается у пациентов крайне редко.

Секвенирование клонированных образцов, содержащих мутантные аллели, методом Сэнгера подтвердило наличие мутаций во всех четырех образцах. Необходимость предварительного клонирования была обусловлена недостаточной чувствительностью метода Сэнгера при исследовании клинического материала и сложностью последующей интерпретации результатов в образцах с нагрузкой мутантной аллели менее 15-20%.

Важным достоинством использованной методики является то, что она позволяет оценивать уровень аллельной нагрузки для любой из обнаруженных мутаций. После проведенного исследования на наличие мутации все пациенты с выявленными мутациями наблюдались с целью определения уровня аллельной нагрузки в динамике. Для пациентов с мутациями N542-E543 delAATGAA, I540-E543 и R541-E543 в 12 экзоне гена JAK2 был показан рост уровня аллельной нагрузки. У пациента с мутацией N542-E543 delAAATGA соответствующий уровень остается стабильным на протяжении нескольких лет. При анализе литературы, посвященной выявленным соматическим мутациям в 12 экзоне гена JAK2, мы не встречали публикаций, описывающих изменения нагрузки мутаций в 12 экзоне гена JAK2 в динамике, как это описано у больных с мутацией V617F в 14 экзоне гена JAK2.

Согласно информации, представленной в базе данных COSMIC, в исследуемом нами фрагменте 12 экзона описано более 40 различных вариантов клинически значимых соматических мутаций, встречающихся с разной частотой. Разработанный формат с использованием технологии пиросеквенирования позволяет проанализировать исследуемые образцы на наличие всех возможных вариантов соматических мутаций, представленных в базе COSMIC. Все выявленные мутации ассоциированы с ХМН, в частности с истинной полицетемией. Таким образом, обнаружение данных соматических мутаций на фоне развития у пациентов клинической картины, в соответствии с клиническими рекомендациями ВОЗ, позволяют подтвердить у пациентов диагноз истинная полицитемия.

Заключение. Разработанный метод позволил достаточно быстро и надежно проводить исследования образцов ДНК, выделенных из крови пациентов с подозрением на ХМН. Возможность применения данного формата анализа позволяет выявлять любые варианты соматических мутаций, которые могут встречаться на относительно небольших по протяженности (до 100 пар оснований) участках последовательностей и идентифицировать наблюдаемый вариант в количественном формате.

ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФИЗМА ТРОМБОЦИТАРНОГО РЕЦЕПТОРА КОЛЛАГЕНА С РАЗВИТИЕМ ХМН

Шайхутдинова Р.В.[1], Субботина Т.Н.[1,2], Кочмарева Г.Ю.[1], Серова Е.А.[1], Васильев Е.В.[3], Михалёв М.А.[4], Ольховский И.А.[2]

[1]ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», Красноярск, Россия
[2]Красноярский филиал ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, Красноярск, Россия
[3]КГБУЗ «Краевая клиническая больница», г. Красноярск, Россия
[4]МБУЗ «Городская клиническая больница № 7», г. Красноярск, Россия

Введение. Хронические миелопролиферативные неоплазмы (ХМН) представляют собой группу клональных нарушений гемопоэтической стволовой клетки, характеризующихся пролиферацией одной или более миелоидных линий в костном мозге и повышенным количеством зрелых и незрелых клеточных форм в крови. Согласно классификации ВОЗ 2016 года к этой группе заболеваний относится истинная полицитемия (ИП), эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ), первичный миелофиброз (ПМФ). Частым осложнением и причиной высокой смертности при ХМН являются тромбозы. Известно, что соматическая мутация V617F в гене JAK2 обуславливает развитие тромбозов при ХМН. Вместе с тем, роль полиморфизмов тромбоцитарных рецепторов в патогенезе развития тромбозов при ХМН изучена недостаточно.

Тромбоцитарный рецептор к коллагену (GPIa/IIa) опосредуют клеточную адгезию, активацию и агрегацию тромбоцитов. Эти процессы имеют важное значение для ограничения потери крови при повреждении сосуда. Тем не менее, при определенных патологических состояниях, эти же события способствуют образованию тромбов, которые могут привести к инфаркту миокарда и ишемическому инсульту[1]. Степень экспрессии и плотность рецепторов GPIa/IIa на поверхности тромбоцитов коррелирует с полиморфизмом C807T гена ITGA2, кодирующим α–субъединицу данного рецептора. Вариант генотипа 807TT ассоциирован с повышенной экспрессией рецептора

GPIa/IIa, в сравнении с вариантом 807CC. Гетерозиготный вариант 807CT соответствует промежуточному уровню плотности рецептора на поверхности тромбоцитов. Таким образом, увеличение плотности гликопротеина Ia/IIa ведет к увеличению риска тромбообразования. В работе Kritzik [2] показано, что полиморфизм C807T находится в сцеплении с двумя другими полимофризмами T837C и G873A, образуя единый гаплотип. Эти полиморфизмы являются синонимичными и не изменяют первичную аминокислотную последовательность белка. Механизм, с помощью которого эти синонимичные полиморфизмы приводят к усилению экспрессии и увеличению плотности рецептора нами в литературе не обнаружен. Kritzik высказал предположение о том, что, участок гена, где локализованы вышеуказанные полиморфизмы непосредственно участвует в регуляции, либо является участком, с которым связываются регуляторные молекулы. [2,3]. Также описаны дополнительные полиморфизмы, расположенные вокруг данной области, которые связывают с повышением уровня экспрессии гена. Каким образом это ведет к увеличению плотности рецептора на мембране тромбоцитов и тем самым к повышению риска тромбообразования остается неясным.

Цель и задачи. Исследовать распространенность полиморфизма C807T гена тромбоцитарного рецептора к коллагену ITGA2 среди пациентов с ХМН.

Материалы и методы. В исследование было включено 163 пациента с подтвержденным диагнозом ХМН, которые ранее поступали на консультативный прием врачей-гематологов в амбулаторно-поликлинические учреждения г. Красноярска и в Красноярскую краевую клиническую больницу. Средний возраст пациентов – 60 лет (от 19 до 81), из них 93 женщины и 70 мужчин. Контрольную группу составили 142 человека, не имевших ХМН на момент обследования: 55 женщин и 87 мужчин. Средний возраст контрольной группы составил 45 лет (от 18 до 87 лет).

Для пациентов с ХМН в лаборатории Красноярского филиала Гематологического центра ранее был проведен анализ на наличие соматических мутаций, обуславливающих развитие ХМН, в частности: в генах JAK2, MPL и Calr. Все участники тестировались на наличие полиморфизма ITGA2 (C807T, rs1126643).

Выделение ДНК из лейкоцитов цельной крови проводили с использованием реагентов «ДНК-экспресс кровь». ПЦР проводили в режиме реального времени с набором SNP –экспресс – РВ, (НПФ Литех) на приборе iCyclerIQ5 (BioRad).

Для проверки гипотезы о наличии связи между имевшимся у пациента соматическими мутациями и изучаемыми полиморфизмами проводили статистическую оценку таблиц сопряженности методом расчета параметра $\chi 2$ с использованием web-калькулятора на сайте ГНЦ РФ ГосНИИ генетика (http://gen-exp.ru/calculator_or.php).

Результаты и обсуждения. Распространенность полиморфизма C807T в гене ITGA2 в группе пациентов с ХМН в целом соответствует литературным данным по европейской популяции, а также данным, полученным при анализе популяции г. Красноярска. При сравнении групп пациентов с разными фенотипическими вариантами ХМН (ИП, ЭИ и ПФ) не выявлено достоверных отличий по распространенности полиморфизма C807T как между отдельными группами, так и между каждой группой пациентов с ХМН и контрольной группой. При разделении всех пациентов на подгруппы в зависимости от вида соматических драйверных мутаций, обуславливающих развитие ХМН выявлено, что в группе JAK2 V617F-положительных пациентов гетерозиготный вариант (CT) полиморфизма C807T встречается чаще, чем в подгруппах с мутациями в генах Calr и MPL. Выявленные отличия позволяют предположить наличие ассоциации между наследственным фактором C807T в гене ITGA2 и соматической мутацией JAK2V617F.

Частота встречаемости полиморфизма C807T в гене ITGA2 у пациентов с ХМН

		Общая группа пациентов с ХМН N=163 1	JAK + N=88 2	Calr + N=65 3	Сочетание Calr+ MPL+ N=75 4	Группа контроля N=142 5
ITGA2 C807T rs1126643 p2,3=0,04;OR=2,31 p2,4 =0,03;OR=2,35	C/C	41 (25, 1)	18 (20,4)	21 (32,3)	23 (30,7)	45 (31,7)
	C/T	88 (54,0)	56 (63,7)	28 (43,1)	32 (42,7)	74 (52,1)
	T/T	34 (20,9)	14 (15,9)	16 (24,6)	20 (26,6)	23 (16,2)

Заключение. У пациентов, имеющих гетерозиготный вариант полиморфизма C807T в гене ITGA2 чаще развивается вариант ХМН, обусловленный мутацией JAK2 V617F, чем варианты ХМН, обусловленные другими соматическими мутациями.

Список используемой литературы

1. Rivera J, Lozano ML, Navarro-Nú-ez L, Vicente V. Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. Haematologica. – 2009;94:700-11.

2. Marcie Kritzik, Brian Savage, DianeJ. Nugent, Sentot Santoso, Zaverio M. Ruggeri, and Thomas J. Kunicki. Nucleotide Polymorphisms in the a2 Gene Define Multiple Alleles That Are Associated With Differences in Platelet a2b1 Density. Blood. – 1998 – №92: 2382-2388.

3. Khatereh Moshfegh, Walter A Wuillemin, Maurice Redondo, Bernhard Lämmle, Jürg H Beer, Sabina Liechti-Gallati, Beat J Meyer. Association of two silent polymorphisms of platelet glycoprotein Ia/IIa receptor with risk of myocardial infarction: a case-control study. THE LANCET1999.– Vol 353:351-354.

ОСОБЕННОСТИ ПОЛИМОРФИЗМА C3435T ГЕНА MDR1 ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ МИЕЛОЛЕЙКОЗЕ

Каримов Х.Я., Абдурахманова Н.Н., Мохаммад А.Д., Эгамова С.К., Икрамов О.А., Маликова Н.Н., Бобоев К.Т.

НИИ гематологии и переливания крови МЗ РУз

По данным многочисленных исследований повышение уровня экспрессии гена MDR-1 и его белкового продукта Pgp-170 связано с высоким риском развития онкологических процессов. Ген MDR-1 экспрессируется в клетках надпочечников, печени, почек, кишечника, гемопоэтических стволовых клетках, а также в клетках опухолей, происходящих из этих тканей. Данные мета-анализов свидетельствуют о том, что наличие мутации в данном гене ассоциировано с повышенным риском развития опухолевых процессов.

Цель исследования. Оценить прогностическое значение полиморфизма C3435T гена MDR1 в риске формирования мутантного клона и развития хронического миелолейкоза (ХМЛ).

Материалы и методы. В исследование были включены 109 пациентов ХМЛ, наблюдавшихся на базе клиники НИИ гематологии и переливания крови МЗ РУз. Диагноз ХМЛ верифицирован в соответствии с Международной номенклатурой ISCN. Все включенные в исследование пациенты по программе GIPAP получали терапию ингибитором тирозинкиназы BCR-ABL – «Гливек»® согласно рекомендациям ELN, и находились в клинической и цитогенетической ремиссии. Стандартизованную ПЦР с детекцией в режиме реального времени (РВ) проводили на термоциклере Rotor-Gene 6000 («Corbett Research», Австралия), при помощи набора реагентов «АмплиСенс® Лейкоз Квант *M-bcr*-FRT» («ИнтерЛабСервис», Россия). Контрольная группа была сформирована из 86 условно здоровых лиц. ДНК выделяли из периферической крови с использованием набора Рибо-сорб (AmpliSens®, Россия). Концентрацию и чистоту выделенной ДНК определяли на приборе NanoDrop 2000 (США). Тестирование полиморфного локуса C3435T MDR1гена проводилось на программируемом термоциклере фирмы «Applied Biosystems» (США), с использованием тест-систем компании «Литех» (Россия), по инструкции производителя. Статистический анализ результатов проведен с использованием пакета статистических программ «OpenEpi 2009, Version 2.3».

Основные результаты. Методом ПЦР-генотипирования нами исследованы особенности распределения полиморфизма C3435T гена MDR1. Частоты встречаемости С и Т аллелей в исследованных основной и контрольной группах составили 48,6/51,4 против 62,8 /37,2%, соответственно. Различия по этим аллелям в обследованных группах были статистически значимыми (χ^2=7.8; P=0.005; OR=1.8; 95%CI 1.186, 2.68). В свою очередь распределение генотипов данного гена было следующим: дикий вариант С/С достоверно превалировал в группе контроля 39,5/25,7% в группе больных (χ^2=4.2; P=0.04; OR=0.5; 95%CI 0.2874, 0.9725). Гетерозиготный генотип С/Т, наоборот – незначительно чаще встречался среди больных, чем в контрольной группе 46,5,/45,96% (χ^2=0.01; P=0.9; OR=1.0; 95%CI 0.5528, 1.718.). При этом гомозиготный мутантный генотип Т/Т был выявлен у 28,4% больных ХМЛ, а в контрольной группе вообще Т/Т был выявлен у 13,9%.

Как видно, носительство гомозиготного мутантного генотипа Т/Т статистически значимо повышает формирование ХМЛ более чем в 2 раза (χ^2=5.9; P=0.01; OR=2.4; 95%CI 1.171, 5.128).

Таким образом, обнаружена статистически достоверная ассоциация между носительством мутантного генотипа Т/Т полиморфизма гена MDR1 среди больных ХМЛ. Риск развития заболеваний при его наличии достоверно возрастает в 2,4 раза. При этом, суммарное носительство неблагоприятных генотипов С/Т+Т/Т также статистически значимо повышает риск развития ХМЛ в 1.9 раза (OR =1.9, χ2= 5.9; p=0.01).

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ микроРНК У ПАЦИЕНТОВ СО СВЕТЛОКЛЕТОЧНОЙ ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМОЙ

Климентова Е.А.[1], Гилязова И.Р.[1], Кунсбаева Г.Б.[3], Султанов И.Р.[2], Измайлов А.А.[2], Павлов В.Н.[2], Хуснутдинова Э.К.[1,3]

[1]Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г. Уфа, Россия
[2]ФГБОУ ВО «Башкирский медицинский государственный университет», г. Уфа, Россия
[3]ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет», г. Уфа, Россия

Введение. Почечно-клеточная карцинома (ПКК) представляет собой злокачественное новообразование почки, на долю которого приходится примерно 3 % всех онкологических заболеваний. Известно, что ключевую роль в развитии ПКК играет VHL-HIF1α путь. На сегодняшний день накоплен ряд убедительных доказательств того, что микроРНК принимают участие в различных биологических процессах, таких как пролиферация и дифференциация клеток и апоптоз [1]. МикроРНК – короткие некодирующие РНК длиной 18-25 нуклеотидов, которые взаимодействуют по комплементарному принципу с 3'-нетранслируемыми областями мРНК-мишеней. Это взаимодействие в соответствующих сайтах связывания инициирует деградацию мРНК или препятствует ее трансляции. [2]. Изменение характера взаимодействия микроРНК с сайтом связывания в результате однонуклеотидной замены может способствовать изменению экспрессии генов-мишеней, задействованных в возникновении и развитии опухолей. Целью настоящего исследования является поиск ассоциаций полиморфных вариантов

генов VHL-HIF1α пути (*CDCP1 rs6773576, DEC1 rs10982724, TFRC rs406271, MAPK1 rs743409, MAPK1 rs9607241, TSC1 rs10491534, VHL rs1642742, VEGFA rs3025033*), расположенных в сайтах связывания микроРНК, с риском развития почечно-клеточных карцином и тяжести их течения.

Материалы и методы. Анализ полиморфных вариантов сайтов связывания микроРНК был проведен в генах VHL-HIFα-зависимого пути у 225 больных с установленным диагнозом «рак почки» и 298 здоровых индивидов. По этнической принадлежности пациенты распределились следующим образом: 13% башкир (31/225), 51% русских (115/225), 36% татар (79/225). Контрольная группа была сформирована из 298 здоровых неродственных жителей Республики Башкортостан, не имеющих злокачественных новообразований, которые по возрасту, полу, этнической принадлежности (29% русские, 51% татары, 20% башкир) и территории проживания соответствовали группе больных. В группе пациентов 56% пациентов имели начальные стадии заболевания (I-II стадии злокачественного процесса по TNM-классификации) и 44% пациентов – поздние (III-IV) стадии заболевания. Определение генотипов осуществляли с помощью технологии Taq-man с использованием ПЦР в реальном времени на приборе Bio-Rad CFX96. Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета Microsoft Excel, программ Haploview, SNPstats и таблицы сопряженности 2x2.

Результаты. В результате анализа полиморфного варианта *rs406271* гена *TFRC* в этнической группе башкир были выявлены статистически значимые различия между больными раком почки и контрольной группой. Обнаружено, что генотип *rs406271*T/T* является маркером пониженного риска развития почечно-клеточных карцином у башкир (p=0.037; OR=0.37; 95%CI=0.12-0.87). Ген *TFRC* кодирует белок TFR1, важный компонент системы трансферрин-связанного переноса железа. Повышенная экспрессия *TFRC* часто описывается при многих типах рака с указанием возможной связи с плохим прогнозом и ускорением прогрессирования заболевания [3].

При сравнении группы больных с учетом тяжести течения заболевания нами выявлены статистически значимые различия в распределении частот аллелей полиморфного локуса *rs10491534* гена *TSC1*. Аллель *rs10491534*C* встречалась в группе больных с тяжелым течением заболевания в 36,5% случаев, тогда как в контрольной группе в 9,4% случаев. Выявлено, что аллель *rs10491534*C* является маркером тяжелого течения рака почки (p=0.044; OR=1.72 (CI=1.012-2.911)). Ген *TSC1* – опухолевый супрессор, продуктом которого является белок гамартин. Белки гамартин и туберин (TSC2) формируют комплекс туберозного склероза и вовлечены в непосредственную регуляцию активности mTORC1[4].

Заключение. Несмотря на то, что полиморфные варианты сайтов связывания микроРНК при раке почки еще крайне мало изучены, полученные в результате настоящего исследования данные свидетельствуют об их ассоциации с риском развития рака почки, а также тяжестью течения заболевания. Тем не менее, необходимы дальнейшие исследования изученных генов для установления их функциональной значимости и роли в патогенезе злокачественных новообразований почки.

Список литературы

1. Yu Z, Li Z, Jolicoeur N, Zhang L et al. Aberrant allele frequencies of the SNPs located in microRNA target sites are potentially associated with human cancers. Nucleic Acids Res. 2007; 35(13):4535-41.

2. Аушев ВН МикроРНК: малые молекулы с большим значением Клиническая онкогематология 2015; 8(1): 1–12.

3. Rychtarcikova Z, Lettlova S, Tomkova V et al. Tumor-initiating cells of breast and prostate origin show alterations in the expression of genes related to iron metabolism // Oncotarget. Oncotarget, 2017; 8(4): 6376-6398

4. Damjanovic S.S., Ilic B.B., Beleslin Cokic B.B. et al. Tuberous sclerosis complex protein 1 expression is affected by VHL Gene alterations and HIF-1 α production in sporadic clear-cell renal cell carcinoma / Experimental and Molecular Pathology, 2016;101(3):323-331.

АНАЛИЗ ТРОМБОГЕННЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМИ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫМИ НЕОПЛАЗМАМИ

Кочмарева Г.Ю.[1], Субботина Т.Н.[1,2], Шайхутдинова Р.В.[1], Васильев Е.В.[3], Михалёв М.А.[4], Азаренко Г.Н.[3], Осадчая М.Г.[4], Смелянская М.Г.[3], Ольховский И.А.[2,5]

[1]ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», Красноярск, Россия
[2]Красноярский филиал ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, Красноярск, Россия
[3]КГБУЗ «Краевая клиническая больница», г. Красноярск, Россия
[4]МБУЗ «Городская клиническая больница № 7», г. Красноярск, Россия
[5]ФГБУН «Красноярский научный центр» Сибирского отделения РАН, Красноярск, Россия

Введение. Развитие хронических миелопролиферативных неоплазм (ХМН) в большинстве случаев обусловлено возникновением соматических мутаций в генах JAK2, MPL и CALR и часто ассоциированы с тромботическими осложнениями, которые являются основной причиной смертности пациентов с данными патологиями. Увеличение риска возникновения тромбофилий или геморрагий при наличии у пациентов с ХМН наследственных факторов риска, предрасполагающих к повышенной активности плазменного звена гемостаза обсуждается. Так в работе Papadakis E. и соавт., 2012 показана ассоциация полиморфизма 677T в гене MTHFR с тромботическими осложнениями у пациентов с ХМН (p = 0,001), а также показано, что у всех пациентов, имеющих сочетание полиморфной аллели T в гене MTHFR с полиморфизмом в генах FII или FV ассоциировано с наличием тромботических проявлений [1]. В исследованиях Tevet M. и соавт., 2015 было показано аддитивное влияние мутации JAK2 V617F и генетических

тромбогенных полиморфизмов в генах FV и FII на развитие тромбогенных осложнений при ХМН [2].

Цель и задачи. Провести анализ распространенности тромбогенных полиморфизмов у пациентов с ХМН и оценить их вклад в развитие тромботических осложнений.

Материалы и методы. Объектом исследования являлась геномная ДНК, выделенная термокоагуляционным методом из лейкоцитов цельной крови с использованием реагента «ДНК-экспресс-кровь». С выделенной ДНК проводили ПЦР с использованием комплекта реагентов «SNP-экспресс-РВ» (НПО «Литех»).

Для проверки гипотезы о наличии связи между имеющимся у пациента диагнозом и изучаемыми полиморфизмами для каждого из трёх генов проводилась статистическая оценка таблиц сопряженности методом расчета параметра $\chi 2$ с использованием web-калькулятора на сайте Государственного Научного Центра РФ «ГосНИИ генетика» http://gen-exp.ru/calculator_or.php.

Основные результаты. Группа обследованных составила 151 человек, среди них 78 женщин (51,7%) и 73 мужчины (48,3%) с подтверждённым диагнозом ХМО, при этом 89 пациентов (58,9%) с диагнозом ИП, 35 (23,2%) – с ЭТ и 27 (17,9%) – с МФ. Средний возраст обследованных составил 59 лет (от 20 – до 83 лет). Ранее всем пациентам был проведен анализ на наличие соматических мутаций, ассоциированных с ХМН. Выявлено, что 115 пациентов (76,2%) из 151 человека данной выборки имеют какую-либо одну драйверную мутацию в гене JAK2, CALR, MPL или сочетание двух драйверных мутаций.

В ходе работы все участники были протестированы на наличие тромбогенных полиморфизмов в генах системы гемостаза FII G20210A (rs1799963), FV G1691A (rs6025) и MTHFR C677T (rs1801133). Полиморфизм G20210A в гетерозиготном состоянии обнаружен у 3 человек (2 мужчин и 1 женщина), что составляет 2% от общей выборки. Полиморфизм A506G в гетерозиготном состоянии выявлен также у 3 человек (2 мужчин и 1 женщина), что составляет 2% от исследованной группы. Гомозиготный вариант данных полиморфизмов среди обследованных пациентов не выявлен.

Полиморфизм C677T в гене MTHFR был обнаружен у 51,6% обследованных пациентов (78 человек: 33 мужчины и 45 женщин). Из них у 60 человек (22 мужчины и 38 женщин) имела место гетерозиготная форма полиморфизма (39,7% от общей выборки пациентов), а у 18 человек (11 мужчин и 7 женщин) – обнаружена гомозиготная форма полиморфизма (11,3% от общей выборки пациентов). Среди 6-ти пациентов, которые имеют полиморфизмы в генах FII и FV 3 человека также имеют полиморфную аллель 677T в гене MTHFR. При этом один из этих трех пациентов является тринегативным, имеет стаж заболевания ИП более 13 лет, не имеет выраженных тромботических проявлений, но нужно отметить, что у этого пациента выявлено хроническое нарушение мозгового кровообращения (ХНМК). Двое других пациентов также не имеют каких-либо тромботических проявлений. Тромботическое проявление в виде атеротромботического инсульта обнаружено лишь у одного из 6-ти пациентов с полиморфизмами в генах FII и FV.

Характеристика пациентов с полиморфизмами в генах FII и FV

№	Пол	Год рождения	Соматическая мутация	Полиморфизмы	Диагноз	Длит-сть заб-ния, мес.	Терапия	Тромб. осложнения
1	м	1957	JAK2V617F	FII(G/A) MTHFR(C/T)	ЭТ	13	Гидроксикарбамид	нет
2	м	1942	MPLW515L	FII(G/A) MTHFR(C/C)	ЭТ	12	Интерферон альфа	нет
3	ж	1959	JAK2V617F	FII(G/A) MTHFR(T/T)	ЭТ	15	Дезагреганты	нет
4	ж	1954	MPLW515L	FV(G/A) MTHFR(C/C)	ЭТ	7	Гидроксикарбамид	Инсульт атеротромб.
5	м	1958	–	FV(G/A) MTHFR(C/T)	ИП	158	Дезагреганты	ХНМК
6	м	1973	JAK2V617F	FV(G/A) MTHFR(C/C)	ЭТ	5	Дезагреганты	нет

Заключение. Распространенность тромбогенных полиморфизмов в группе пациентов с ХМН в целом соответствует литературным данным по европейской популяции, а также данным, полученным при анализе популяции г. Красноярска. Несмотря на то, что нами не выявлено ассоциации наличия наиболее значимых тромбогенных полиморфизмов в генах FII и FV, как по отдельности, так и в сочетании с полиморфной аллелью 677T в гене MTHFR с наличием тромботических проявлений, всё же, при ведении пациентов с диагнозом ХМН и наличием тромбогенных полиморфизмов необходимо учитывать повышенный риск развития у таких пациентов тромботических осложнений.

Список литературы

1. Papadakis E., Papageorgiou V., Tsepanis K.. Impact of Inherited Thrombophilia Factors On Thrombotic Risk in Patients with Newly Diagnosed BCR- Abl (-) Myeloproliferative Disorders; Finally a Role of MTHFR- C677T Polymorphism? // Blood – 2012 – Vol 120(21): p.5065.

2. Tevet M., Ionescu R., Dragan C.. Influence of the JAK2 V617F Mutation and Inherited Thrombophilia on the Thrombotic Risk among Patients with Myeloproliferative Disorders // Maedica (Buchar) – 2015 – Vol 10(1): p.27-32.

АЛЛЕЛИ АН8.1 ГАПЛОТИПА ПОВЫШАЮТ ОБЩУЮ ВЫЖИВАЕМОСТЬ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Маливанова Т.Ф.[1], Осташкин А.С.[2], Кретова Е.Ю.[2], Мазуренко Н.Н.[1]

[1] ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия
[2] ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» ФМБА России, Москва, Россия

Введение. Ген фактора некроза опухоли (*TNF, TNF-alpha*) расположен на хромосоме 6p21.3 в высоко полиморфной области *HLA III* класса, на расстоянии 250 kb от *HLA-B* локуса I класса и 850 kb от *HLA-DR* локуса II класса. Известно, что некоторые полиморфизмы области гена *TNF* входят в наследуемые гаплотипы (ancestral haplotype, АН), в том числе в расширенные гаплотипы, охватывающие весь комплекс генов *HLA*. Так, распространенный европейский гаплотип АН8.1 включает аллель А однонуклеотидного полиморфизма *-308(G/A) TNF* и аллель а2 микросателлитного полиморфизма *TNFa* и ассоциирован с нарушением баланса синтеза цитокинов и предрасположенностью к аутоиммунным состояниям. Поскольку полиморфизм *-308(G/A)* расположен в промоторной области гена *TNF* и экспериментально доказано его влияние на уровень транскрипции, предполагается, что эффект АН8.1 может быть связан с повышенной экспрессией этого цитокина у носителей А аллели. Однако, напротив, эффект *TNF* может быть обусловлен, по крайней мере, частично, сцепленностью с генами HLA комплекса. Интенсивно изучается и выявлена индивидуальная ассоциация полиморфизма *-308(G/A) TNF* с предрасположенностью к некоторым аутоиммунным и онкологическим заболеваниям, в том числе к раку молочной железы (РМЖ). Ранее нами была показано повышение общей выживаемости для носителей аллели *-308A TNF* при РМЖ.

Целью исследования было изучение влияния аллелей, входящих в гаплотип АН8.1, на общую выживаемость больных РМЖ.

Материалы и методы. В работе использована архивная коллекция ДНК от 265 первичных больных РМЖ с известным генотипом *-308(G/A) TNF*. Анализ полиморфизма микросателлитного маркера *TNFa* проводили с использованием двухэтапной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с внутренними праймерами с последующим разделением полученных фрагментов в 7% денатурирующем полиакриламидном геле. Для 68 случаев проведено HLA-типирование. Носителей одновременно трех аллелей *HLA A*01:B*08:DRB1*03* выделяли в группу АН8.1. Сравнение частот в группах проводили с помощью теста Фишера, общую выживаемость (ОВ) сравнивали Лог-ранговым тестом. Различия при $p<0,05$ считали достоверными.

Основные результаты. Аллель микросателлитного маркера *TNFa2* была выявлена в 32,5% образцов и ассоциировалась с аллелью *-308A TNF* ($p<0,0001$) (Таблица). В общей группе не обнаружено влияния микросателлитной аллели *TNFa2* на ОВ. Интересно, что в присутствии и в отсутствии этой аллели полиморфизм *-308(G/A) TNF* оказывал разнонаправленное действие на ОВ больных РМЖ, при этом у носителей *TNFa2:-308A* ОВ была на 20% выше, чем у носителей *TNFa2:-308GG* или в отсутствии аллели *TNFa2* (Таблица). Для 32 *TNFa2* положительных и 36 *TNFa2* отрицательных образцов было проведено HLA-типирование. Одновременно три аллели *HLA A*01:B*08:DRB1*03* были обнаружены только у 56,3% носителей *TNFa2:-308A*. Эта группа больных РМЖ имела 10-летнюю ОВ на 10% выше, чем для остальной *HLA*-типированной группы (77,8±13,8% и 66,1±6,2%), однако статистически значимых различий выявить не удалось.

Микросателлитный маркер TNFa	TNFa2(+) N=86		TNFa2(-) N=179	
Генотип *-308(A/G)TNF*	GG	AG	GG	AG
Всего, n	49	37	148	31
(частота n/N)	0,57	0,43	0,83	0,17 †
10-летняя ОВ±СО, %	63,3±6,9	83,9±6,1 ††	75,0±3,6	64,5±8,6
10-летняя ОВ±СО, %	72,1±4,9		73,2±3,4	
Всего HLA-типированных A*01:B*08:DRB1*03	16	16	27	9
положительные	0	9 (56,3%) ‡	0	0
10-летняя ОВ±СО, %		77,8±13,8		
отрицательные	16	7 (43,7%)	27	9
10-летняя ОВ±СО, %	68,8±11,6	71,4±17,1	62,9±9,2	66,7±15,7

† $p<0,0001$; †† $p<0,05$; ‡ $p<0,001$

Заключение/выводы. Наше исследование впервые показало, что полиморфизм *-308(G/A)TNF* возможно является маркером, отражающим влияние аутоиммунного наследуемого гаплотипа AH8.1 на выживаемость больных РМЖ, что подчеркивает важность иммунной системы для этого онкологического заболевания. Необходимы дальнейшие исследования для выяснения взаимодействия *-308(G/A)TNF* с полиморфизмами области *HLA*.

МАРКЕРЫ МЕТИЛИРОВАНИЯ И ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА У ДЕТЕЙ

Руденко В.В.[1], Казакова С.А.[4], Танас А.С.[1,2], Попа А.В.[3], Немировченко В.С.[3], Кузнецова Е.Б.[1,4], Залетаев Д.В. [1,4], Стрельников В.В. [1,2]

[1] ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва, Россия (shkarupo@mail.ru)

[2] Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия (vstrel@list.ru)

[3] Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина, Москва, Россия (apopa@list.ru)

[4] ФГБОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России, Москва, Россия (zalnem@mail.ru)

Введение. При остром миелоидном лейкозе (ОМЛ) цитогенетические аномалии и мутации генов хорошо известны и используются для классификации заболевания. Однако показано, что в процессе лейкемогенеза помимо цитогенетических генетических аберраций участвуют эпигенетические механизмы, в частности, метилирование ДНК. Нормальный профиль метилирования ДНК важен для развития организма, дифференцировки тканей и поддержания гомеостаза клетки. Паттерны метилирования ДНК наследуются при делении клеток с высокой точностью. Нарушение распределения метилирования, гиперметилирование или гипометилирование, является маркерным событием процесса канцерогенеза и может играть значимую роль в инициации и прогрессии опухолевого перерождения генома.

Целью настоящего исследования является выявление диагностического потенциала аберрантного метилирования, который может быть использован, в том числе для выявления подтипов ОМЛ, обладающих различной чувствительностью к терапевтическим схемам. **Задачей** для достижения цели считается формирование и анализ системы маркеров метилирования острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) у детей.

Материалы и методы. Для определения профиля метилирования системы маркеров метилирования, принадлежащих промоторным областям 6 генов, методом МЧ-ПЦР использованы образцы биологического материала костного мозга (КМ) детей с ОМЛ (НИИ ДОиГ им. Н.Н.Блохина) и 6 образцов донорского КМ (ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева). На настоящий момент проанализированы образцы КМ 39 пациентов с ОМЛ до лечения, а также на различных его этапах (10 - после введения Децитабина (группа I); 25 пациентов после блока AIE *б*ез Децитабина; 15 после AIE и Децитабина (группа II)).

Основные результаты. Частоты метилирования генов до и после лечения для обеих групп пациентов показаны в таблице 1. Все образцы донорского КМ продемонстрировали отсутствие метилирования по изучаемым локусам.

В группе I (до и после лечения) профиль метилирования различается по процентному выражению. По трем генам (*SOX8, EGFLAM и TMEM176A/B*) снижение частоты метилирования произошло на ≥50%. Ген *CXCL14* показал снижение на 10% и метилирование гена *CLDN7* осталось не измененным (30%).

Таблица 1. Частоты метилирования генов изучаемой панели до и после лечения

Ген	Группа I до лечения, % (n=10)	Группа I после лечения, % (n=10)	p	Группа II до лечения, % (n=29)	Группа II после лечения, % (n=25)	p	AIE+ дакоген (n=15)
CLDN7	30	30	1	20.7	80	<0.0001	66.7
SOX8	50	10	0.1409	51.7	0	<0.0001	0
EGFLAM	20	10	1	10.4	20	0.4487	13.3
THEM176A/176B	60	30	0.3698	62	68	0.7772	53.3
CXCL14	90	80	1	96.6	100	1	100
GSG1L	10	0	1	10.4	8	1	0

В группе II происходит увеличение частоты метилирования гена *CLDN7* с 20.7 до 80% (*p<0.0001*) и уменьшение частоты метилирования гена *SOX8* с 51.7 до 0 (*p<0.0001*). В целом происходит увеличение частоты метилирования у 4-х изучаемых генов, а снижение - у 2-х, что свидетельствует о клональной эволюции опухоли.

Сравнение пациентов из группы I и группы II после лечения показало, что введение в курс ХТ Децитабина

приводит к снижению метилирования, однако не столь отчетливому как при использовании только эпигенетической терапии. При этом в группе пациентов, получавших дакоген до курса ХТ, лейкозная нагрузка была значительно выше, чем для второй группы, так как содержание клеток в КМ до лечения значительно выше, чем уже после первого блока ХТ. После AIE лейкозные клетки представлены более агрессивными клонами, однако они плавно восстанавливают профиль метилирования бластной клетки, благодаря тому, что действие лекарства неспецифично и затрагивает все метилированные клетки и кроме того количество молекул лекарства становится более сопоставимым с пулом аномально метилированных клеток.

Заключение:

1) Предложенная система из 6 маркеров аномального метилирования является универсальной системой маркеров ОМЛ у детей.

2) Показано, что использование деметилирующей терапии перед курсом химиотерапии значительно снижает уровень метилирования ДНК.

3) После блока AIE происходит увеличение частоты метилирования у 4х изучаемых генов (статистически значимо для гена *CLDN7*), а снижение - у 2х (статистически значимо для гена *SOX8*), что свидетельствует о клональной эволюции опухоли.

4) После введения деметилирующего агента на этапе между AIE и HAM частота метилирования изучаемых генов начинает плавно снижаться, а профиль метилирования панели становится близок к профилю группы I.

5) С помощью разработанной системы возможна оценка злокачественной прогрессии бластных клеток, так как бластные клетки после ХТ – морфологически считаются нормальными, при этом они демонстрируют профиль аномального метилирования опухолевых клеток.

УРОВЕНЬ ЛИГАНДОВ РЕЦЕПТОРА NKG2D СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННЫХ МОЛЕКУЛ ULBP В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

Абакушина Е.В.[1], Абакушин Д.Н.[2], Пасова И.А.[1], Гельм Ю.В.[1], Каприн А.Д.[3]

[1] МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, Обнинск, Россия

[2] ООО «Клиника № 1», Обнинск, Россия

[3] ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, Обнинск, Россия

Введение. Для понимания механизмов, генерирующих иммуносупрессию при опухолевом росте, необходимо изучать влияние различных факторов на противоопухолевый иммунный ответ. Хорошо известно, что первую линию защиты от трансформированных клеток осуществляют NK-клетки. На их поверхности экспрессируется ряд активирующих и ингибирующих рецепторов. Одним из значимых активирующих рецепторов является член семейства лектиноподобных молекул NKG2D. Его лигандами являются стресс-индуцированные молекулы MICA/B, ULBP-1-6. Первоначально молекулы ULBP-1, -2, и -3 были идентифицированы в качестве лигандов для гликопротеина UL16 цитомегаловируса человека и были названы как UL16-связывающие белки (ULBP - UL16-binding proteins). Эти белки отдаленно родственны с молекулами гистосовместимости класса I (MHC I), обладающими альфа-1 и альфа 2 Ig-подобными доменами, но не содержащими домен альфа-3. В отличие от молекул MHC класса I, они не способны связывать пептид или взаимодействовать с бета2-микроглобулином. Как известно ULBP-1, -2 и -3, являются лигандами и связываются с активирующим рецептором NKG2D, который экспрессируется на NK-клетках, NKT-клетках, гамма-дельта Т-клеток, а также CD8 + альфа-бета-Т-клетках. Трансформированные клетки способны сбрасывать лиганды рецептора NKG2D со своей поверхности и ускользать от распознавания эффекторными лимфоцитами. Также растворимые сывороточные формы молекул ULBP могут взаимодействовать со своим рецептором NKG2D на поверхности лимфоцитов и ингибировать их функциональную активность. Обнаружение данных молекул в сыворотке крови может служить одним из супрессивных факторов для противоопухолевого иммунного ответа.

Цель. Определить уровень стресс-индуцированных молекул ULBP-1 и -2 в сыворотке крови онкологических больных и здоровых добровольцев.

Материалы и методы. Уровень молекул ULBP-1 и ULBP-2 был определен в сыворотке крови 50 онкологических больных с помощью ИФА с использованием набора реагентов DuoSet ELISA human ULBP -1 и -2 (R&D Systems, США) по инструкции. В первую группу вошли 20 больных злокачественными новообразованиями абдоминальной области (ЗНАО), во вторую группу включены 30 больных меланомой. В качестве группы сравнения использовали сыворотку крови 30 условно здоровых доноров. Оптическую плотность образцов измеряли при длине волны 450 нм на фотометре ChroMate 4300 (Awareness Technology, США). Результаты обрабатывали при помощи программ Microsoft Excel 2003 и Statsoft Statistica 6.0. (StatSoft, USA). Данные представляли как среднее по группе. Использовали t-критерий Стьюдента. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. В работе определен уровень стресс-индуцированных опухолеассоциированных молекул ULBP-1 и ULBP-2 у онкологических больных двух различных нозологических групп ЗНАО и меланомой. Были найдены достоверные различия между концентрацией данного белка у пациентов различных нозологических групп. У больных ЗНАО сывороточный уровень ULBP-1 превышал таковой у группы больных меланомой в 1,3 раза ($p=0,001$). Показано, что уровень молекул ULBP-1 у онкологических больных в 2,5 раза выше по сравнению с контрольной группой в 2434 пг/мл ($p<0,001$). Также у онкологических больных не было выявлено случаев отсутствия в циркуляции данных стресс-индуцированных молекул. Большинство пациентов имели концентрацию ULBP-1 превышающую максимальные значения в 78% случаев. Только

у трех больных уровень молекул ULBP-1 был ниже, чем средний показатель в контрольной группе. Замечено, что выше была концентрация ULBP-1 у пациентов с наличием большой опухолевой массы. Данное утверждение нельзя применить к другому лиганду NKG2D белку ULBP-2. В сыворотке крови как здоровых добровольцев так и онкологических больных не были обнаружены молекулы ULBP-2 данной аллельной формы. Концентрация молекул ULBP-2 в сыворотке крови всех пациентов кроме одного была равна фоновым значениям. У одного больного меланомой лиганды обнаруживались в следовых количествах (291 пг/мл).

Заключение. Таким образом, можно заключить, что обнаружение в сыворотке крови онкологических больных лигандов NKG2D – молекул ULBP-1 в больших концентрациях, с большой вероятностью может свидетельствовать о наличии опухолевых клеток и развитии злокачественного новообразования, а также служить маркером злокачественного роста у данных пациентов. Данный лиганд может являться не только маркером наличия злокачественного новообразования, но и предиктивным фактором у онкологических больных, который появляется в сыворотке крови раньше чем объективно можно оценить развитие заболевания инструментальными методами исследований. Молекулы ULBP-1, также как и MICA, могут дополнить спектр имеющихся опухоле-ассоциированных маркеров в диагностике онкологического заболевания у больных раком.

ТЕХНОЛОГИЯ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОГО НАЗНАЧЕНИЯ НЕОАДЪЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ БОЛЬНЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Литвяков Н.В.[1,2*], Казанцева П.В.[1], Цыганов М.М.[1,2], Ибрагимова М.К.[1,2], Слонимская Е.М.[1], Чердынцева Н.В.[1,2]

[1] НИИ онкологии Томского НИМЦ, Томск, Россия
[2] НИ Томский государственный университет, Томск, Россия
**e-mail: nvlitv72@ya.ru*

В настоящее время ответ опухоли молочной железы на неоадъювантную химиотерапию (НАХТ) наблюдается в 30-65% случаев в зависимости от молекулярного подтипа, а решение о ее назначении принимается на основе клинико-морфологических характеристик.

Цель. Разработать и клинически валидировать технологию персонализированного назначения НАХТ больным РМЖ, для повышения ее эффективности.

Материалы и методы. Для разработки технологии на первом ретроспективном этапе было обследовано 68 больных РМЖ (лечение в 2006-2010 гг.), которым проводили НАХТ. ДНК выделяли из 68 биопсийных образцов опухолевой ткани до лечения. Микроматричный анализ CNV (Copy Number Variation) проводили на чипах Affymetrix (USA) CytoScan™ HD Array. На втором этапе клинически валидировали разработанную технологию. Проспективную группу составили 37 пациентов с люминальным В РМЖ, которым НАХТ персонализировано назначалась по результатам микроматричного анализа ДНК биопсийного материала до лечения. Группу исторического контроля составили 71 больной РМЖ люминального В подтипа, которым назначали НАХТ по клиническим показателям.

Результаты. На первом этапе исследования были идентифицированы маркеры ожидаемой эффективности НАХТ, которые позволили бы определить целесообразность ее проведения, а также маркеры ответа опухоли на отдельные химиопрепараты для назначения схемы НАХТ. Было установлено, что при делеции хотя бы одного из локусов генов ABC (*ABCB5*-3q27, *ABCG2*-4q22.1, *ABCB3*-6p21.32, *ABCB1*-7q21.1, *ABCC1*-16p11.2) не формировался фенотип устойчивости и отмечалась 85-100% эффективность НАХТ [Litviakov N.V. et al., Oncotarget 2016]. Больные с CNV локусов 1q43, 11q22.1 – 23.3 или 18p11.21 отвечали на НАХТ, а у пациентов с нормальным состоянии этих локусов отсутствовал ответ на НАХТ (p = 0.000005 – 0.0004) [Литвяков Н.В. и др. 2014]. Амплификация локуса гена *TOP2A*-17q21.2 обусловливала ответ на антрациклины [Казанцева П.В. и др. 2016]. Делеция локуса гена *TUBB3*-16q24.3 определяла ответ на таксотер у 67% пациентов. Делеция локуса *BRCA1*-17q21.31 в опухоли молочной железы отмечалась у 37% больных, и они хорошо отвечали на схему химиотерапии CAX (75%), но не на таксотер. Делеция локуса *TYMS*-18p11.32 в 100% случаев была сопряжена с ответом на кселоду (CAX) и в 88% на фторурацил (FAC). На основе этих данных была разработана технология персонализированного назначения НАХТ. При ее клинической валидации проводили микроматричное исследование ДНК опухоли до лечения и при наличии хотя бы одного из выявленных маркеров ожидаемой эффективности НАХТ пациенты начинали лечение с НАХТ (в противном случае назначали операцию). Схему НАХТ подбирали индивидуально: при амплификации гена *TOP2a* и/или высокой экспрессии гена *TOP2a* более 4 назначали антрациклины (FAC или CAX), при делеции *TYMS* назначали CAX, а не FAC, при делеции *TUBB3,* отсутствии делеции гена *BRCA1* и отсутствии амплификации *TOP2a* назначали таксаны, при делеции *BRCA1* в опухоли назначали препараты платины, а таксаны были противопоказаны. По результатам клинической валидации эффективность НАХТ в группе с персонализированным назначением составила 89%, против 53% в группе контроля (p=0,0017 по критерию Фишера). Кроме этого в группе с персонализированным назначением частота полной морфологической регрессии (pCR) опухоли в процессе НАХТ составила 26%, в группе контроля частота pCR составила 7% (p=0,02, по критерию Фишера). Как известно, при полной морфологической регрессии в процессе НАХТ значительно увеличивается выживаемость больных РМЖ [Kaufmann M., et al., 2012]. Кроме того, в последнее время в литературе появились данные, свидетельствующие о том, что не только полная, но и выраженная частичная регрессия опухоли с регрессом более 80% в ответ на НАХТ ассоциирована с

улучшением показателей выживаемости [Miller M., et al., 2014]. По нашим данным в группе больных с персонализированным назначением НАХТ у 74% больных наблюдалось регрессия опухоли в процессе НАХТ более 80%, в группе контроля только у 24% пациентов регрессия была выраженной (p=0,00002 по критерию Фишера).

Таким образом, наша технология позволяет персонализированно назначать предоперационную химиотерапию больным раком молочной железы и повысить ее эффективность в 2 раза. По результатам исследования получен патент RU № 2594251.

Работа поддержана грантом РФФИ 15-04-03091.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ *TLR2* (Arg753Gln) У БОЛЬНЫХ ПРОЛИФЕРАТИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ И РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ЗАБАЙКАЛЬСКОМ КРАЕ

Марковский А.В., Страмбовская Н.Н.

Читинская государственная медицинская академия, Чита, Россия

В настоящее время получены убедительные доказательства, что при многих опухолях существуют изменения в генах, контролирующих Toll-like receptors (TLR), что может рассматриваться как фактор риска развития опухоли. Генетические изменения TLRs в области TIR-домена (Toll/IL-1 receptor domain), как в случае полиморфного варианта Arg753Gln гена *TLR2*, могут служить причиной развития иммуносупрессии и хронического воспаления, являющегося одной из главных причин возникновения и прогрессии опухолевых заболеваний. Сложный механизм этой взаимосвязи изучен недостаточно полно, а роль TLR в онкогенезе неоднозначна – с одной стороны они участвуют в противоопухолевом иммунитете, с другой – способствуют уклонению опухолевых клеток от иммунного ответа**,** что представляет особый интерес в изучении ранних молекулярных предикторов злокачественной трансформации клеток.

Цель работы. Сравнить частоту аллелей и генотипов генетического полиморфизма *TLR*2(Arg753Gln) среди относительно здоровых женщин и больных пролиферативными заболеваниями и раком молочной железы (РМЖ) в Забайкальском крае.

Материалы и методы. Обследовано 150 женщин, из них 32 больных пролиферативными заболеваниями молочной железы (ПЗМЖ) - фиброаденомой, фиброзно-кистозной мастопатией и 118 с РМЖ в возрасте 53±13,3 лет, находившихся на стационарном лечении в краевом онкологическом диспансере. Диагноз, подтвержден гистологическим методом исследования. Контрольную группу составили относительно здоровые и не имеющие на момент исследования онкологической патологии 176 женщин Забайкальского края в возрасте 40,1±10,0 лет.

Определение полиморфизма проводилось методом ПЦР с детекцией продукта амплификации в агарозном геле (PCR-Ef) (амплификатор «Бис-М111», ООО «Бис-Н», Новосибирск) на геномной ДНК лейкоцитов периферической крови, выделенной с помощью набора реагентов «ДНК-экспресс кровь» и использованием отдельных SNP-наборов (ООО НПФ «Литех», Москва). Для оценки соответствия распределений наблюдаемых генотипов ожидаемым значениям при равновесии Харди-Вайнберга и для сравнения распределений частот генотипов и аллелей в двух субпопуляциях использовали критерий $\chi 2$. Значения уровня $p<0,05$ рассматривались как статистически значимые. Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы Microsoft Excel 2010 и on-line калькулятора (http://gen-exp.ru/calculator_or.php.).

Результаты. При сравнении частот генотипов в клинической и контрольной группе выявлено преобладание носителей аллели *TLR2*-753Gln - 9,7% ($\chi 2$=4,03; p=0,04, d.f.=1) среди больных РМЖ, против 5,4% с увеличением риска развития заболевания в 1,9 раза (CI 95%:1,01 – 3,56) (табл.1).

Таблица 1. Частота полиморфизма гена *TLR2* (Arg753Gln) в группах сравнения*

Генотипы Аллели	Группы			$\chi 2$ (p)[1]	$\chi 2$ (p)[2]	$\chi 2$ (p)[3]
	контрольная (n=176)	больные с ПЗМЖ[1] (n=32)	больные с РМЖ[2] (n=118)			
Arg/Arg	157 (89,2)	29 (90,6%)	97 (82,2%)	0,06 (0,97)	4,92 (0,09)	1,53 (0,46)
Arg/Gln	19 (10,8%)	3 (9,4%)	19 (16,1%)			
Gln/Gln	0 (0%)	0 (0%)	2 (1,7%)			
Arg	333 (0,946)	61 (0,953)	213 (0,903)	0,05 (0,82)	4,03 (0,04)	1,63 (0,2)
Gln	19 (0,054)	3 (0,047)	23 (0,097)			

*Примечание: [1,2,3] ($\chi 2$ тест) – сравнение распределений частот генотипов и аллелей групп больных ПЗМЖ и РМЖ, с соответствующим показателем в группе контроля и между собой (df = 1,2).

Это дает основание предполагать, что мутантная аллель Gln маркирует повышенный риск развития РМЖ, хоть эта мутация и встречается достаточно редко, согласно данным E. Lorenz и др. (2000). Кроме того, в контрольной группе и среди больных ПЗМЖ не выявлено ни одного носителя мутантной аллели в гомозиготном состоянии *TLR2*-753Gln/Gln, которое обуславливает нарушение функции проведения сигнала от лигандов TLR2

и активации механизмов врожденного иммунитета, т.е. одной функционально нормальной аллели *TLR2*-753Arg, достаточно для полного обеспечения воспалительного ответа.

TLR2 (толл-подобный рецептор 2) расположен в клеточной мембране и после взаимодействия с лигандом запускает каскад реакций, в результате которых активируется транскрипция провоспалительных цитокинов, миграция клеток иммунной системы к месту воспаления в результате повышения выработки хемокинов и повышение продукции антиапоптотических факторов. Взаимосвязь TLR2 с опухолевой прогрессией показали исследования B. Huang (2007) и M. Karin (2004) с соавт., где в одном случае, TLR2-зависимая активация в клетках рака яичника приводила к повышению их устойчивости к действию химиотерапевтических препаратов, и в другом, где определена ключевая роль этого рецептора в метастазировании рака легкого. Однако, исследование H. Davoodi и F. Seow (2011) показывает отсутствие связи изучаемого полиморфизма с риском колоректального рака.

Таким образом, можно предположить, что носительство мутантной аллели влияет на развитие хронического воспалительного процесса патологической направленности и обладает предикторными свойствами в развитии РМЖ. При этом, важно отметить, что воспаление может быть вызвано как инфекцией, так и патологическими внутриклеточными событиями, не связанными с прямым инфицированием, а пациенты с иммунодефицитом имеют повышенный риск. Однако, противоречивые сведения в литературе о двойственном эффекте TLR на рост опухоли, указывают на более сложную их функциональную значимость, где активируют и другие биологические процессы (пролиферацию, ангиогенез, инвазию), лежащие в основе опухолевой трансформации, что требует дальнейшего изучения данного вопроса.

Вывод. При изучении частот генетического полиморфизма *TLR2*(Arg753Gln), выявлено увеличение частоты носительства аллели *TLR2*-753Gln у больных РМЖ с ростом риска развития заболевания в 1,9 раза, что дает основание рассматривать ее в качестве предикторного фактора.

Список литературы

1. A novel polymorphism in the toll like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection / Lorenz E. [et al.] // Infect. Immun. – 2000. – Vol. 68, №11. – P. 6398–6401.

2. Davoodi H, Seow H.F. Variant Toll-like receptor 4 (Asp299Gly and Thr399Ile alleles) and Toll-like receptor 2 (Arg753Gln and Arg677Trp alleles) in colorectal cancer // Iran J. Allergy Asthma Immunol. – 2011. – V. 10, №2. – P. 91-99.

3. Karin M., Yamamoto Y., Wang Q.M. The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development // Nat. Rev. Drug. – 2004. – V. 3, №1. – P. 17–26.

4. Listeria monocytogenes promotes tumor growth via tumor cell toll-like receptor 2 signaling / Huang B. [et al.] // Cancer. Res. – 2007. – V. 67, №9. – P. 4346–4352.

ПОЛИМОРФИЗМ thr399Ile И asp299Gly ГЕНА *tlr4* И УРОВЕНЬ tlr4 В ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ У БОЛЬНЫХ ПРОЛИФЕРАТИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Марковский А.В., Страмбовская Н.Н., Номоконова В.Б.

ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия», Чита, Россия

Введение. Рак молочной железы (РМЖ) продолжает оставаться ведущей онкологической патологией у женского населения в России. РМЖ относится к числу опухолей, в развитии которых существенную роль играют генетические факторы. Среди многочисленных генов, в разной степени ассоциированных с развитием заболевания, интерес представляют гены Toll-like рецепторов (TLR), эффекты которых, выходят за рамки реакций врожденного иммунного ответа и первый, обнаруженный из этой группы (в 1997 году) - TLR4. Однако роль TLR в онкогенезе неоднозначна – с одной стороны они участвуют в противоопухолевом иммунитете, с другой – способствуют уклонению опухолевых клеток от иммунного ответа, что указывает на сложный механизм эффектов TLR и их лигандов, который вызывает определенный интерес и необходимость более детального изучения.

Цель работы. Сравнить частоту аллелей и генотипов генетического полиморфизма *TLR4*(Thr399Ile) и *TLR4*(Asp299Gly) среди относительно здоровых женщин и больных пролиферативными заболеваниями молочной железы (ПЗМЖ) в Забайкальском крае, в том числе влияние носительства SNPs (Single nucleotide polymorphism) на уровень TLR4.

Материалы и методы. В исследование вошли 35 больных ДОМЖ и 122 пациентки с РМЖ, в возрасте 46-66 лет. Диагноз, подтвержден гистологическим методом исследования. Контрольную группу составили 176 здоровых женщин Забайкальского края в возрасте 31-50 лет, не имеющих на момент исследования онкологической патологии.

Материалом для молекулярно-генетического анализа (PCR-Ef) служили образцы ДНК, выделенные из лейкоцитов периферической венозной крови. Амплификацию для выявления полиморфизма *TLR4*(Thr399Ile) и *TLR4*(Asp299Gly) проводили в термоциклере (ООО «Бис-Н», Новосибирск). В работе использовались стандартные наборы для исследуемых SNP научно-производственной фирмы «Литех» (Москва). Для оценки соответствия распределений наблюдаемых генотипов ожидаемым значениям при равновесии Харди-Вайнберга и для сравнения распределений частот генотипов и аллелей в двух субпопуляциях использовали критерий $\chi 2$. Статистическая обработка данных проводилась с использованием on-line калькулятора (http://gen-exp.ru/calculator_or.php).

Для определения концентрации TLR4 методом сэндвич-ИФА использовался операционный материал 62 больных РМЖ и 25 ДОМЖ и коммерческий набор ELISA Kit for Toll Like Receptor 4 (Cloud-Clone Corp., USA) в соответствии с инструкциями изготовителя. Результаты представлены в расчете на 1 мг биоптата молочной железы из

очага опухолевого процесса. Статистическую значимость различий количественных признаков определяли по критерию Манна-Уитни с помощью Ms Excel 10.0, Statistica 6.0. Показатели считали значимыми при p<0,05. Результаты представлены в виде Me [P25-P75].

Результаты и обсуждение. В ходе работы обнаружены все искомые мутации в гомо- и гетерозиготном состоянии с частотным подчинением закону Харди-Вайнберга (p>0,05). Выявлено, что частоты генотипов и аллелей гена *TLR4* (rs4986790 и rs4986791) не отличались в группах сравнения (в двух клинических и контрольной) и нами не было обнаружено ассоциаций полиморфизма гена *TLR4* (rs4986790 и rs4986791) с развитием ПЗМЖ.

Изучив уровень TLR4 в опухолевой ткани, мы определили, что его концентрация была значительно выше в группе с ДОМЖ (0,88 [0,65;1,20] пг/мг), чем у больных с раком молочной железы (0,50 [0,37;0,64] пг/мг) (p=0,0001). Это может быть связано с недостаточной активацией TLR4 у страдающих РМЖ и, как следствие, опухолевой прогрессией. Анализ ассоциации носительства отдельных аллелей полиморфизма гена *TLR4* (rs4986790 и rs4986791) с уровнем тканевого TLR4 в группах сравнения, показал отсутствие различий по концентрации белка. Однако носительство гаплотипов Thr399Thr×Asp299Asp и Thr399Ile×Asp299Gly гена *TLR4*, показало, что уровень TLR4 был выше у пациентов ДОМЖ с гаплотипом Thr399Thr×Asp299Asp гена *TLR4*, а у больных РМЖ, наоборот, с Thr399Thr×Asp299Asp (p<0,05).

Таким образом, мы предполагаем, что носительство определённых гаплотипов гена *TLR4* может привести к дисрегуляции сигнализации TLR4 и, как следствие, к изменению взаимосвязи лиганда и баланса между про- и противовоспалительными цитокинами, модулируя тем самым риск хронического воспаления и рака, а значительное содержание TLR4 в опухолевых тканях обеспечивает высокую скорость регулирования клеточной активации. Учитывая это, полиморфизм *TLR4*(Thr399Ile) и *TLR4*(Asp299Gly) вместе с TLR4 могут быть рассмотрены в качестве диагностических биомаркеров. Следует отметить, что в литературе встречаются противоречивые результаты ассоциации модифицирующего влияния гена *TLR4* на риск развития рака, что можно объяснить различными факторами, модулирующими действие генотипа и проявляющимися с различной силой в изучаемых популяциях (различный генетический фон в популяциях, особенности окружающей среды или кишечной микрофлоры).

Выводы. В результате исследования частоты аллелей и генотипов полиморфизма гена *TLR4*(Thr399Ile) и *TLR4*(Asp299Gly) у больных пролиферативными заболеваниями молочной железы значимых отличий не выявлено. При этом, уровень TLR4 в опухолевых тканях был выше у пациенток с ДОМЖ, и преимущественно на фоне носительства гаплотипа Thr/Ile×Asp/Gly гена *TLR4*, по сравнению с концентрацией белка у больных РМЖ.

Список литературы

1. Каприна А.Д. Злокачественные новообразования в России в 2014 году (заболеваемость и смертность) / А.Д. Каприн, В.В. Старинский, Г.В. Петрова – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «ФМИЦ им. П.А. Герцена» Минздрава России, 2016. – 250 с.

2. Марковский А.В. Носительство полиморфизма Thr399Ile и Asp299Gly гена *TLR4* и уровень TLR4 в опухолевой ткани у больных пролиферативными заболеваниями молочной железы / А.В. Марковский, Н.Н. Страмбовская // Забайкальский медицинский вестник. – 2016. – № 4. – С. 43-47.

3. Davoodi H. Variant Toll-like receptor4 (Asp299Gly and Thr399Ile alleles) and Toll-like receptor 2 (Arg753Gln and Arg677Trp alleles) in colorectal cancer / H. Davoodi, H.F. Seow // Iran J. Allergy Asthma Immunol. – 2011. – V.10, №2. – P. 91-99.

МАРКЕРЫ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК В ОЦЕНКЕ ОТВЕТА НА НЕОАДЪЮВАНТНУЮ ХИМИОТЕРАПИЮ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Танас А.С.[1,2], Сигин В.О.[2], Кекеева Т.В.[1], Кузнецова Е.Б.[1,3], Поддубская Е.В.[4], Керимов Р.А.[4], Литвяков Н.В.[5], Руденко В.В.[1], Залетаев Д.В.[1,2,3], Стрельников В.В.[1,2]

[1]ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва, Россия
[2]ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Россия
[3]ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России, Москва, Россия
[4]ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия
[5]НИИ онкологии Томского НИМЦ РАН, Томск, Россия

Введение. Метилирование ДНК – один из важнейших регуляторов нормального развития и функционирования организма человека. Нарушения метилирования ассоциированы с широким спектром патологии и наиболее выражены в клетках злокачественных опухолей, начиная с ранних этапов онкогенеза. Опухольспецифические паттерны аномального метилирования ДНК могут использоваться для выявления новообразований на доклинической стадии, для дифференциальной диагностики в онкологии, в качестве предиктивных и прогностических маркеров.

Идентификация отдельных подтипов злокачественных новообразований, предполагающих различные подходы к их лечению, – актуальная проблема онкологии. Для рака молочной железы (РМЖ) уже предложена классификация подтипов, основанная на различиях экспрессии генов. Однако определение уровня экспрессии в клиническом образце осложняется наличием примеси нормальной ткани и низким качеством РНК, получаемой из архивных материалов. В качестве альтернативы рассматривается возможность использования для классификации подтипов РМЖ профилей метилирования ДНК геномов опухолей.

Цель. Разработать диагностическую панель маркеров метилирования ДНК для априорной оценки ответа опухолей молочной железы на неоадъювантную химиотерапию.

Задачи исследования. Разработать метод широкогеномного секвенирования ДНК, позволяющий определять состояние метилирования тысяч генов в больших выборках образцов клинического материала. Проанализировать выборку образцов РМЖ и выделить эпигенетические подтипы заболевания. Определить маркеры метилирования ДНК, ассоциированные с клинико-морфологическими свойствами опухолей и ответом на неоадъювантную химиотерапию.

Материалы и методы. Были исследованы 6 образцов клеточных линий РМЖ, 10 образцов нормальной ткани молочной железы и 110 операционных образцов РМЖ. Исследование метиломов проводили с использованием собственной модификации метода бисульфитного секвенирования ограниченных выборок локусов XmaI-RRBS [1].

Результаты. Разработан и внедрен новый способ бисульфитного секвенирования ограниченных выборок геномных локусов, XmaI-RRBS. Отличительной особенностью способа является эффективное сокращение размера изучаемой области генома без значительной потери CpG-островков, основанное на использовании для подготовки геномных библиотек эндонуклеазы XmaI. Такой подход позволяет проводить исследования на больших выборках клинического материала. Использование нового подхода позволило нам создать самую большую на сегодняшний день в мире коллекцию данных широкогеномного секвенирования метилирования ДНК для образцов, имеющих отношение к злокачественным опухолям одного органа (в данном случае – молочной железы).

Для полученных результатов XmaI-RRBS проведен кластерный анализ, который позволил выделить 10 молекулярных подтипов тканей и клеток молочной железы в зависимости от профилей метилирования CpG-динуклеотидов. Выявлены группы генов, аномальное метилирование которых характерно для эпигенетических подтипов РМЖ. Определено 114 генов, частоты дифференциального метилирования которых достоверно отличают два эпигенетических подтипа РМЖ верхнего уровня - гиперметилированный и умеренно метилированный подтипы. Среди них обращает на себя внимание частое метилирование генов: аденилатциклаз и стимуляторов аденилатциклазной активности; генов белков клеточной адгезии и внеклеточного матрикса, а также модификаторов внеклеточного матрикса; генов ионного гомеостаза - калиевых каналов, активаторов калиевых каналов; гена обратной транскриптазы теломеразы TERT и ДНК-хеликазы PIF1 – негативного регулятора длины теломер; генов компонентов комплемента и системы свертывания крови; дигидропиримидиназы DPYS. Более трети дифференциально метилированных генов относятся к гомеобоксным или кодируют другие транскрипционные факторы и белки, задействованные в процессах раннего развития и морфогенеза, в том числе нейрогенеза. Продукты выявленных дифференциально метилированных генов задействованы в работе сигнальных путей Wnt, RAS, PI3K и Hippo. В исследованной выборке образцов не выявлено статистически достоверных различий уровней метилирования CpG-островков генов, вовлеченных в репарацию ДНК, а также классических генов супрессоров опухолевого роста как между нормальными и опухолевыми образцами, так и между различными эпигеномными подтипами РМЖ. Определены гены, достоверно отличающие каждый подтип тканей МЖ от других подтипов по статусу метилирования промоторных областей.

Таким образом, сформирован эпигенетический классификатор тканей и клеток молочной железы, выявлены гены, дифференциальное метилирование CpG-островков которых маркирует эпигенетические подтипы на различных уровнях иерархии. Определены метаболические пути, молекулярные функции и биологические процессы, нарушения которых посредством метилирования характерны для метилотипов РМЖ.

Предложена тест-система из 12 маркеров метилирования ДНК для изучения эпигенетических подтипов РМЖ, отличающихся ответом опухолей на неоадъювантную химиотерапию с использованием антрациклинов, в больших выборках клинического материала. Результаты использования этой системы на основе метилчувствительной ПЦР воспроизводят результаты широкогеномного анализа метилирования с высокой точностью; запланировано валидационное исследование в независимой выборке образцов РМЖ.

Выводы. Разработанная технология широкогеномного скрининга метилирования ДНК позволяет сформировать независимую эпигеномную классификацию РМЖ. Выявленные маркеры могут использоваться для разработки систем диагностики эффективности противоопухолевой терапии.

Список используемой литературы

1. Tanas, A.S., Kuznetsova, E.B., Borisova, M.E., Rudenko, V.V., Zaletayev, D.V., Strelnikov, V.V. Reduced representation bisulfite sequencing design for assessing the methylation of human CpG islands in large samples // Molecular Biology. – 2015. - V 49, №4, P. 689-699.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 14-04-01606 А.

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ РНК ИЗ ОСАДКОВ МОЧИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭКСПРЕССИИ ОПУХОЛЕВЫХ МАРКЕРОВ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Алатырев А.Г., Кирьянов С.А.

ООО «НекстБио», Москва, Россия

Введение. В настоящее время активно разрабатываются методы неинвазивной диагностики и мониторинга рака предстательной железы, основанные на ПЦР-анализе РНК-маркеров, выделенных из образцов жидкостной биопсии, таких как осадки мочи. Наряду с очевидными преимуществами такого подхода, одной из

проблем при использовании метода ОТ-ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) для измерения экспрессии онкомаркеров в образцах мочи, является недостаточное для адекватного анализа количество выделенной РНК. Сорбционные колоночные методы выделения нуклеиновых кислот, удобные в лабораторной практике, не позволяют получить достаточное количество РНК из осадков мочи. Методы, основанные на осаждении нуклеиновых кислот сорбцией на носителе (стеклянные бусы, диатомовая земля, стеклянное «молоко») в присутствии хаотропных солей высокой концентрации без предварительной фазовой очистки, приводят к выделению РНК/ДНК с большим содержанием примесей, в том числе ингибиторов, влияющих на эффективность ПЦР. Применение метода выделения нуклеиновых кислот на основе магнитной сепарации обеспечивает ряд преимуществ, в том числе разделение фаз лизиса и сорбции, отделение от компонентов клеточного лизата, возможных ингибиторов ПЦР, более селективную экстракцию НК, разделение ДНК и РНК, концентрирование из больших объемов, возможность увеличения общего выхода и потенциал автоматизации.

Цель. Разработать метод выделения РНК из осадков мочи, основанный на магнитной сорбции, обеспечивающий эффективное выделение низкокопийных РНК-маркеров.

Материалы и методы. Материалом в исследовании были образцы первой порции мочи от трех условно-здоровых доноров мужского пола. Осадки мочи высаживанием центрифугированием при 13000 об/мин в течение 10 мин. Выделение РНК из объема 10 мл мочи методом магнитной сорбции проводили в трех повторах по разработанному авторами протоколу. Для сравнения использовали сорбционно-колоночный (Norgen, Канада) и преципитационный (Рибопреп, ЦНИИ Эпидемиологии, РФ) наборы выделения РНК из того же объема мочи от тех же индивидов в соответствии с протоколами выделения, рекомендуемыми производителями наборов. Реакции обратной транскрипции проводили в объеме 25 мкл в течение 60 мин при 42С с использованием набора Реверта (ЦНИИ Эпидемиологии, РФ) с последующим аликвотированием кДНК для постановки мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ с парами праймеров на высококопийную мишень (GAPDH) и низкокопийные простат-специфичные мишени KLK3, PCA3 и ERG, и Taqman гибридизационными зондами, комплементарными каждой мишени. Праймеры и зонды для ОТ-ПЦР-амплификации были выведены с использованием Primer Express v2.0 (Applied Biosystems, США). Для обеспечения эффективности проведения мультиплексной ПЦР длину ампликонов ограничили размером 95-110 н. Определение эффективности амплификации мишеней проводили методом построения калибровочных графиков.

Результаты. Был разработан и опробован метод выделения РНК из осадков мочи с использованием высокопористых магнитных частиц. Эффективность выделения РНК оценивали методом ОТ-ПЦР-РВ по представленности как высококопийных генов (GAPDH), так и низкокопийных преимущественно простат-специфичных генов (KLK3, PCA3 и ERG). Результаты сравнения с референсными методами сорбционно-колоночным (Norgen, Канада) и преципитационным (Рибопреп, ЦНИИ Эпидемиологии, РФ) представлены в таблице 1. Методом с магнитной сорбцией обеспечивается кратно лучший выход высококопийного гена GAPDH Ct=28 против 30 и 35 при выделении сорбционно-колоночным и преципитационным методами соответственно. Уровень детекции низкокопийных простат-специфических транскриптов (PCA3, KLK3) , выделенных методом сорбции на магнитных частицах, также обеспечивает кратно лучший выход против референсных методов выделения. Различия между эффективностями амплификации каждого из генов были незначительными, что косвенно является показателем отсутствия или крайне незначительного ингибирования возможных примесей в образце РНК, выделенных предлагаемым методом магносорбции.

Таблица 1. Сравнительный анализ эффективности выделения РНК различными методами

Исследуемые транскрипты генов	Наборы для выделения		
	Рибопреп (ЦНИИ Эпидемиологии, РФ)	Norgen total RNA purification kit (Norgen biotek, Канада)	Магносорбция (Некстбио, Россия)
	Значения Ct*		
GAPDH	30	35	28
PCA3	37	NA**	34
KLK3	32	38	29
ERG	39	NA	39

* - указанно среднее значение Ct из трех постановок ОТ-ПЦР в реальном времени. В качестве матрицы использована РНК, выделенная из образца(мочи) условно здорового донора.

** - не определено

Заключение. Метод выделения РНК из осадков мочи, основанный на магнитной сорбции, обеспечивает эффективное выделение как высококопийных, так и низкокопийных РНК-маркеров. Количество РНК, полученное данным методом из 10 мл мочи, достаточно для проведения ПЦР-анализа РНК маркеров клеток предстательной железы в моче. Одна из дальнейших перспектив применения метода – масштабирование и выделение РНК на автоматических станциях для использования в клинической практике.

АНАЛИЗ АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ ИММУННОГО ОТВЕТА И ВОСПАЛЕНИЯ С РИСКОМ РАЗВИТИЯ РАКА ЯИЧНИКОВ

Мингажева Э.Т.[1], Прокофьева Д.С.[1], Сакаева Д.Д.[2], Хуснутдинова Э.К.[1,3]

[1] ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет», г. Уфа, Россия
[2] ГБУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер», г. Уфа, Россия
[3] ФГБУН Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, г. Уфа, Россия

Рак яичников (РЯ) является одной из наиболее часто встречающихся и агрессивных опухолей женских половых органов. За последние годы смертность от рака яичников остается стабильно высокой и занимает одно из первых мест в структуре смертности от онкологических заболеваний женской репродуктивной системы. Это обусловлено как бессимптомным течением болезни на ранних стадиях и недостаточной эффективностью диагностических методов исследования неопластических процессов яичников, так и отсутствием персонализированного подхода к лечению пациенток.

Рак яичников является распространенным мультифакториальным заболеванием. Одним из основных факторов риска данной патологии выступает генетическая предрасположенность. В первую очередь, развитие РЯ ассоциировано с мажорными мутациями в высокопенетрантных генах *BRCA1* и *BRCA2*, белковые продукты которых являются ключевыми участниками сигнального пути клетки в ответ на воздействие ионизирующей радиации. Однако, нарушения в этих генах объясняют не более 15% всех случаев заболевания. В последнее время важная роль в возникновении и прогрессии злокачественных опухолей яичников отводится компонентам иммунной системы.

Целью исследования является поиск ассоциации ряда полиморфных вариантов генов, вовлеченных в иммунный ответ и воспаление, с риском развития рака яичников у женщин из Республики Башкортостан. В работе проведен анализ распределения частот аллелей и генотипов некоторых известных полиморфных вариантов в генах *NFKB1* (*rs28362491*), *IL18* (*rs1946518*) и *IL23R (rs7517847*, *rs10889677*), а также новых локусов в генах *AGBL2* (c.G481A) и *ITIH2* (c.C1438T), выявленных в результате ранее проведенного экзомного секвенирования, в группах больных РЯ (n=284) и здоровых женщин (n=223). Генотипирование полиморфных локусов осуществлялось методом ПЦР-ПДРФ-анализа.

В результате проведенного исследования обнаружена ассоциация аллели C полиморфного варианта *rs10889677* в гене *IL23R* с повышенным риском развития РЯ, OR: 1.51; 95%, CI (1.17–1.97), p=0.002. Также была выявлена ассоциация гомозиготного генотипа *CC* с повышенным риском развития заболевания, OR: 1.86; 95%, CI (1.27– 2.72), p=0.001. Данная однонуклеотидная замена приводит к увеличению сродства с микроРНК let-7f, тем самым способствуя высокой транскрипции гена *IL23R* как in vitro так и in vivo. Согласно литературным данным, для лиц с генотипом *CC* характерна более высокая пролиферация Т-клеток и более низкая регуляторных Т-клеток, чем для лиц с генотипом *AA* [1]. Результаты, аналогичные нашим, были обнаружены в исследовании Zhang с соавт. (2010) где было показано, что аллель *C* значительно чаще встречается среди пациентов с диагнозом «рак яичников» по сравнению с женщинами из контрольной группы (OR: 51.752, 95% CI (1.107–2.772) [2].

При изучении распределения частот аллелей и генотипов полиморфного варианта c.G481A гена *AGBL2* было выявлено, что генотип *AA* значительно чаще встречался в группе контроля – 8%, по сравнению с пациентами – 0,4%, а также частота аллели *A* была выше в группе здоровых женщин (7,6% vs 0,8%). Таким образом, аллель A является маркером пониженного риска развития РЯ, OR=0.11, 95% CI:(0.04-0.3), p=0,0005. Белковый продукт гена *AGBL2* является партнером опухолевого супрессора p53 и вовлечен в регуляцию процессов пролиферации опухолевых клеток, эпителиально-мезенхимального перехода и резистентности к химиотерапии.

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного локуса c.C1438T гена *ITIH2* между больными РЯ и здоровыми женщинами также показал ассоциацию редкой аллели T с пониженным риском развития РЯ, OR=0,04, 95% CI:(0,01-0,15), p=0,0005 Белковый продукт гена *ITIH2* участвует в процессах воспаления и иммунного ответа, а также препятствует метастазированию опухоли и взаимодействует с такими белками как EGFR и FN1. Согласно некоторым исследованиям, при раке молочной железы наблюдается потеря экспрессии гена *ITIH2*[3].

Статистически значимых различий в распределении частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов rs28362491/ *NFKB1*, rs1946518/*IL18* и rs7517847/ *IL23R1* между группами больных РЯ и контролем не выявлено.

Полученные результаты свидетельствуют о существенном вкладе полиморфных локусов *rs10889677,* c.G481A и c.C1438T в генах иммунного ответа и воспаления *IL23R, AGBL2* и *ITIH2* соответственно, в патогенез рака яичников у женщин из Республики Башкортостан.

Список литературы

1. Zheng J, Jiang L, Zhang L et al. Functional genetic variations in the IL-23 receptor gene are associated with risk of breast, lung and nasopharyngeal cancer in Chinese populations // Carcinogenesis. 2012 Dec;33(12):2409-16

2. Zhang Z, Zhou B, Zhang J, et al. Association of interleukin-23 receptor gene polymorphisms with risk of ovarian cancer //Cancer genetics and cytogenetics. 2010 Jan 15;196(2):146-52.

3. Hamm A, Veeck J, Bektas N, et al. Frequent expression loss of Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain (ITIH) genes in multiple human solid tumors: a systematic expression analysis. BMC Cancer. 2008 Jan 28;8:25.

ДЕТЕКЦИЯ МУТАЦИЙ ГЕНОВ JAK2 И MPL ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ХРОНИЧЕСКИХ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Каримов Х.Я.[1], Мохаммад Дин Асмо[2], Бобоев К.Т.[1]

[1] НИИ гематологии и переливания крови МЗ РУз
[2] Ташкентская медицинская академия

Актуальность. Хронические миелопролиферативные заболевания (ХМПЗ) – это группа клональных Ph-негативных гематологических болезней, к которым относятся эритремия (истинная полицитемия, ИП), хронический мегакариоцитарный лейкоз (эссенциальная тромбоцитемия, ЭТ) и сублейкемический миелоз (первичный миелофиброз, ПМФ, хронический идиопатический миелофиброз). Происхождение этих заболеваний связано с трансформацией гемопоэтической стволовой клетки, результатом чего служит чрезмерная продукция зрелых клеток эритроидного, мегакариоцитарного и гранулоцитарного ростков с относительно продолжительным течением заболевания. Частота встречаемости мутации V617F гена JAK2 в 12 экзоне и гена MPL варьирует в разных литературных данных.

Цель работы: определение частоты встречаемости мутаций генов JAK2 и MPL и выявление её значимости при верификации данных заболеваний.

Материалы и методы. В исследование были включены 300 пациентов с хроническими миелопролиферативными заболеваниями – с истинной полицитемией (ИП) 120 больных, с эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ) – 58, с хроническим идиопатическим миелофиброзом (ХИМФ) – 55 и 67 пациентов обследовались с целью дифференциальной диагностики с Ph(-) ХМПЗ. Возраст больных варьировал от 20 до 70 лет, медиана возраста составила 54 года. Изоляция ДНК больных производилась с использованием набора реагентов «АмплиПрайм РИБО-преп» (ООО «Интерлабсервис», Россия). Концентрацию и чистоту выделенной ДНК определяли на приборе Nano Drop 2000 (США). Детекции мутации гена JAK2V617F и гена MPL проводили путем стандартной полимеразной цепной реакции на термоциклере 2720 «Applied Biosystems» (США), с использованием набора «Литех» (Москва).

Результаты. Результат проведенных исследований показал, что частота встречаемости мутации V617F в гене JAK2 варьировала у пациентов в зависимости от типа заболевания. При ИП мутация V617F в гене JAK2 определялась у 118 из 120 (98,3 %) исследуемых больных, при ЭТ – у 31 из 58 (54,2 %) пациентов, при ХИМФ – у 27 из 55 (49,1 %) проанализированных больных. У 67 больных не гематологического профиля, обследованных с целью дифференциальной диагностики с Ph(-) ХМПЗ, V617F в гене JAK2 обнаружена у 6 (8,6 %), что позволило достоверно подтвердить Ph(-) ХМПЗ.

Мутация в 12 экзоне гена JAK2 выявлялась у 2 из 33 (2,9 %) исследуемых V617FJAK2-отрицательных больных исключительно с диагнозом ИП. В то время как мутация W515L гена MPL обнаруживалась при ЭТ и ХИМФ в 2,2 % (у 1 из 41) и 2 % (1 из 52) больных, соответственно.

Заключение. Таким образом, установленные наши данные также подтверждают, что мутации в генах JAK2 и MPL являются высокоспецифичными диагностическими маркерами пациентов с Ph-отрицательными ХМПЗ.

НЕКОТОРЫЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ СЛИЗИСТЫХ АДЕНОКАРЦИНОМ ТОЛСТОЙ КИШКИ У РОССИЙСКИХ ПАЦИЕНТОВ

Поспехова Н.И., Майновская О.А., Шелыгин Ю.А., Кашина И.Ю., Фролов С.А., Шубин В.П.

ФГБУ «Государственный научный центр колопроктологии им. А.Н. Рыжих» Минздрава России, Москва, Россия

Введение. На долю слизистого (муцинозного) колоректального рака (КРР) приходится около 10-15% всех случаев заболевания. По клиническим и патоморфологическим характеристикам слизистый рак отличается от других типов КРР и ассоциируется с неблагоприятным ответом на терапию. Такие различия позволяют предполагать особые пути патогенеза слизистого КРР и молекулярный статус. Частота мутаций генов RAS/RAF/MAPK пути, имеющих важное терапевтическое значение, в целом выше в муцинозных опухолях по сравнению с немуцинозными аденокарциномами, и они чаще демонстрируют высокий уровень микросателлитной нестабильности (МСН). Показатели молекулярных характеристик слизистых аденокарцином значительно варьируют в разных исследованиях, имеют популяционные различия и не описаны для выборки российских больных.

Цель и задачи. Целью работы явилось определение частоты и спектра мутаций в генах *KRAS/BRAF,* статуса микросателлитной нестабильности в слизистых аденокарциномах (СА) толстой кишки.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужили образцы КРР, полученные от 72 больных, проходивших лечение в ГНЦК им. А.Н.Рыжих. По результатам гистологического исследования все опухоли являлись слизистой аденокарциномой.

ДНК из парафиновых блоков выделяли с использованием набора GeneJet FFPE DNA (“Thermo Fisher Scientific”, Литва). Детекцию соматических мутаций в генах *KRAS/BRAF* проводили двумя методами: методом прямого секвенирования по Сэнгеру на приборе ABI PRISM 3500 (“Applied Biosystems”, США) – исследовали *KRAS*-мутации в 2 экзоне, *BRAF*-мутации в экзоне 15; методом цифровой капельной ПЦР (цкПЦР) на приборе QX200 (“Bio-Rad”, США) с использованием зондов для 7 *KRAS*-мутаций p.G12D, p.G12V, p.G12S, p.G12A, p.G12R, p.G12C, p.G13D и *BRAF*-му-

тации p.V600E согласно протоколу производителя. Определение МСН проводили методом фрагментного анализа.

Основные результаты. Методом прямого секвенирования мутации в генах *KRAS/BRAF* были выявлены в 45 образцах (62.5%). Частота мутаций в *KRAS* составила 54.2% (39/72), в 6 случаях (8.3%) обнаружена мутация p.V600E в гене *BRAF*. Спектр *KRAS*-мутаций характерен для КРР: наиболее часто обнаруживается мутация p.G12D (14/39, 35.9%), часто встречаются p.G12V (9/39, 23.1%) и p.G13D (8/39, 20.5%), также выявлены мутации p.G12A (3 случая), p.G12C (2 случая), p.G12S (2 случая), p.G12R (1 случай). При использовании цкПЦР все эти мутации были подтверждены. Кроме того, *KRAS*-мутации выявлены ещё в 5 опухолях, т.е. частота аденокарцином с мутацией достигла 69.4% (50/72). Ещё в двух образцах (2.8%) обнаружена вторая мутация в этом гене. Дополнительно выявлены: p.G12D (3 случая), p.G12V (2 случая), p.G12A (1 случай) и p.G13D (1 случай). Эти дополнительные варианты находились в образцах в низкой концентрации вне чувствительности прямого секвенирования.

Метод цкПЦР позволяет оценивать абсолютное число копий как аллели дикого типа, так и мутантной аллели гена в образце. Количество мутантной аллели в наших образцах, выраженное в процентах от общего числа копий гена, варьировало в пределах 0.37-51.9%. Секвенирование уверенно выявляло мутацию при её количестве от 16% и выше. При этом в 27 исследованных образцах этот показатель был ниже 30% и только в 18 выше этого значения. Семь мутаций, обнаруженных только с помощью цкПЦР, имели в образце концентрацию 0.37-13.9%.

Микросателлитная нестабильность высокого уровня выявлена в 13 образцах (18.1%), ещё две опухоли имели статус микросателлитной нестабильности низкого уровня (2.8%), большинство СА (79.1%) были микросателлитно стабильны.

Заключение. Частота мутаций в гене *KRAS* в слизистых аденокарциномах толстой кишки в российской выборке имеет высокие значения. Применение метода цкПЦР увеличивает чувствительность детекции мутаций в образцах и выявляет их в опухолях, статус которых трактуется по результатам прямого секвенирования как «дикий тип гена». Частота мутаций в гене *BRAF* в нашей выборке слизистых аденокарцином не отличается от таковой для немуцинозных опухолей. Частота МСН высокого уровня в слизистых аденокарциномах немного превышает этот показатель для опухолей другого гистологического строения. Слизистые аденокарциномы толстой кишки неоднородны по молекулярно-генетической структуре и представляют собой гетерогенную группу рака, состоящую из разных подтипов, которые отличаются друг от друга по клиническому течению заболевания и прогнозу.

АНАЛИЗ СТАТУСА МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОВ БЕЛКОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА И ТРАНСМЕМБРАННЫХ РЕЦЕПТОРОВ В НОРМЕ И ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Симонова О.А.[1], Кузнецова Е.Б.[1,3], Поддубская Е.В.[2], Керимов Р.А.[2], Танас А.С.[1], Руденко В.В.[1], Стрельников В.В.[1], Залетаев Д.В.[1,3]

[1] ФГБНУ «МГНЦ», Москва, Россия

[2] ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва, Россия

[3] ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России, Москва, Россия

Введение. Трансмембранные рецепторы и молекулы внеклеточного матрикса играют фундаментальную роль в регуляции жизнедеятельности клеток. Они участвуют в процессах адгезии, миграции, трансдукции сигналов, клеточной дифференцировки и вовлечены в поддержание тканевой архитектуры. При развитии опухоли могут происходить количественные, структурные и функциональные изменения клеточных рецепторов и белков матрикса. Следствием данных событий может быть нарушение взаимодействия клеток как между собой, так и с микроокружением, что способно приводить к самым разнообразным последствиям, в том числе и к инвазии опухолевых клеток.

Цели и задачи. Определение статуса метилирования 12 промоторных регионов генов субъединиц ламининов (*LAMA1, LAMA2, LAMA3A, LAMA3B, LAMA4, LAMA5, LAMB1, LAMB2, LAMB3, LAMC1, LAMC2, LAMC3*), 8 интегринов (*ITGA1, ITGA2, ITGA3, ITGA4, ITGA6, ITGA7, ITGA9, ITGB1*), 2 нидогенов (*NID1,NID2*), 2 генов кадгеринов (*CDH2,CDH3*), дистрогликана *DAG1*, а также 11 генов матриксных металлопротеиназ (*MMP2, MMP11, MMP14, MMP15, MMP16, MMP17, MMP21, MMP23B, MMP24, MMP25, MMP28*) и 4 ингибиторов матриксных металлопротеиназ (*TIMP1, TIMP2, TIMP3, TIMP4*) для выявления потенциальных маркеров канцерогенеза.

Материалы и методы. Основным методом работы являлась МЧ-ПЦР с последующей верификацией полученных данных при помощи бисульфитного секвенирования. Материалом исследования послужили 208 парных образца опухоли и условно нормальной ткани молочной железы, а также 6 аутопсийных образцов нормальной молочной железы.

Результаты. Определены 17 генов, способных подвергаться аномальному метилированию при раке молочной железы (частоты указаны в скобках): *LAMA1* (29,4% (60/204)), *LAMA2* (27% (55/204)), *LAMB1* (26% (53/204)), *LAMC1* (4,4% (9/204)), *ITGA1* (15,2% (29/191)), *ITGA4* (30% (61/206)), *ITGA7* (3,4% (7/206)), *ITGA9* (41,3% (85/206)), *NID1* (38,7% (79/204)), *NID2* (41,2% (84/208)), *CDH2* (8,8% (18/204)), *CDH3* (41,5% (85/205)), *MMP2* (7,7% (14/183)), *MMP23B* (17% (13/182)), *MMP24* (12% (20/168)), *MMP25* (15,4% (28/182)), *MMP28* (5% (9/183)). В небольшом количестве случаев аномальное метилирование генов *LAMA1, LAMA2, LAMB1, NID1, ITGA4,ITGA7* и *ITGA9* было зафиксировано как в опухолевой, так и в прилежащей условно нормальной ткани молочной железы. Метилирования данных 17 регионов в аутопсийных образцах молочной железы выявлено не было.

Кроме того, нами показано, что промоторные регионы *LAMA3A, LAMB2, LAMB3, LAMC2, MMP14, MMP21, TIMP1,*

TIMP4 конститутивно метилированы в ткани молочной железы.

Заключение. Межмолекулярные взаимодействия трансмембранных клеточных рецепторов и компонентов экстрацеллюлярного матрикса лежат в основе регуляции клеточных функций и обеспечивают поддержание структуры ткани. Изменение экспрессии интегринов, кадгеринов, ламининов, нидогенов и металлопротеиназ было зафиксировано в опухолях различного типа, в том числе и при раке молочной железы. К сожалению, причины, лежащие в основе данных событий, являются малоизученными. Одним из механизмов инактивации генов-супрессоров опухолевого роста может служить метилирование CpG-островков их промоторных областей. Нами впервые было проведено комплексное исследование статуса метилирования разнообразных белков экстрацеллюлярного матрикса и трансмембранных молекул, участвующих в регуляции клеточного цикла, процессах адгезии и миграции. По итогам выявлена группа генов (*LAMA1, LAMA2, LAMB1, LAMC1, ITGA1, ITGA4, ITGA7, ITGA9, NID1, NID2, CDH2, CDH3, MMP2, MMP23B, MMP24, MMP25, MMP28*), подвергающихся аномальному метилированию при раке молочной железы. Продукты данных генов опосредуют широчайший спектр функций, участвуя в трансдукции сигналов и осуществляя механические взаимодействия клеток как между собой так и с матриксом. Изменение их экспрессии в процессе развития опухоли может приводить к разнообразным последствиям, включая инвазию и метастазирование трансформированных клеток.

Список литературы

1. Симонова О.А., Кузнецова Е.Б., Поддубская Е.В. и соавт. Гены ламининов, конститутивно и аномально метилированные при раке молочной железы // Молекулярная биология. – 2015. – 49(4). – Стр. 667-677.

2. Симонова О.А., Кузнецова Е.Б., Танас А.С. и соавт. Метилирование генов интегринов, нидогенов и дистрогликана в норме и при раке молочной железы // Медицинская генетика. – 2016. - 15(1). – Стр. 13-20.

3. Ярмолинская М.И., Молоткова А.С., Денисова В.М. Матриксные металлопротеиназы и ингибиторы: классификация, механизм действия // Журнал акушерства и женских болезней. – 2012. – 61(1). – Стр. 113-125.

4. Крахмаль Н.В., Завьялова М.В., Денисов Е.В. и соавт. Инвазия опухолевых эпителиальных клеток: механизмы и проявления // Acta Naturae (русскоязычная версия). – 2015. – 7(2). – Стр. 18-31.

ДЕЛЕЦИИ И ТОЧКОВЫЕ МУТАЦИИ ГЕНА ABL1 КАК ПРИЧИНА РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ИНГИБИТОРАМ ТИРОЗИНКИНАЗ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОЛЕЙКОЗОМ

Нестерова О.Ю.[2], Михайлов И.А.[2], Абдуллаев А.О.[1], Судариков А.Б.[1]

[1]ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, Москва, Россия
[2]ФГОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова» (факультет фундаментальной медицины), Москва, Россия

Введение. Хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ) – это миелопролиферативное заболевание, обусловленное злокачественной трансформацией клеток-предшественников миелоидного ростка гемопоэза. Причина трансформации – появление цитогенетической аномалии, так называемой филадельфийской хромосомы. Ph-хромосома является результатом реципрокной транслокации (9;22). В результате такой транслокации появляется химерный ген BCR-ABL. ABL1 кодирует нерецепторную тирозинкиназу. Под влияением Bcr конститутивно неактивная тирозинкиназа приобретает способность к чрезмерной экспрессии и увеличению своей активности, что приводит к усиленной пролиферации миелоидных клеток в красном костном мозге и к их накоплению в периферической крови.

Появление ингибиторов тирозинкиназ (ИТК) произвело революцию в терапии ХМЛ. Тем не менее, у части пациентов развивается вторичная резистентность. Считается, что точковые мутации являются одной из главных причин резистентности к ИТК, но остается малоизученной роль делеций и инсерций (сплайсинговых вариантов) в её формировании. В нашей работе мы исследовали делецию экзона 7 гена ABL1 в сочетании с точковыми мутациями и их влияние на развитие резистентности к ИТК у пациентов с ХМЛ.

Цель и задачи. Изучить влияние наличия точковых мутаций и делеции экзона 7 гена ABL1 на формирование резистентности к ИТК у пациентов с ХМЛ.

Материалы и методы. Были использованы образцы крови 50 пациентов с ХМЛ с доказанной резистентностью к ИТК 1-ого поколения иматинибу. Выделение ядросодержащих клеток проводилось с использованием лизирующего буфера для эритроцитов (ELS) с последующим центрифугированием при 3000 об./мин. Конечный супернатант использовался для выделения тотальной РНК с использованием набора реагентов «РИБО-золь-D» в соответствии с рекомендациями изготовителя.

Обратная транскрипция проводилась с использованием набора реагентов «РЕВЕРТА-L» по методике изготовителя. Реакционная смесь инкубировалась в амплификаторе.

С целью амплификации необходимого участка ДНК ПЦР проводили в два этапа. На первом этапе амплифицировали фрагмент гена BCR-ABL длиной 2514 пар нуклеотидов (п.н.) с использованием праймеров BCR13F (экзон 13 гена BCR) и ABL11R (экзон 11 гена ABL1). На втором этапе осуществляли амплификацию короткого фрагмента гена ABL1 с использованием двух внутренних праймеров: ABL4F (экзон 4 гена ABL1) и ABL7R (экзон 7 гена ABL1). При этом получали фрагмент длиной 731 п.н.

Затем для очистки проводили электрофорез ПЦР-продукта в 1,5% агарозном геле. После элюции из геля проводили постановку сиквенсовой реакции и прямое секвенирование по Сэнгеру с использованием автоматического секвенатора ABI3130 («Applied Biosystems», США). Полученную нуклеотидную последовательность

сравнивали с референсной последовательностью транскрипта c-ABL1 (NCBI Reference Sequence: NM_005157.4).

Для измерения количества кДНК мутантного клона, несущего делецию экзона 7, относительно кДНК клона без делеции был поставлен фрагментный анализ MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification). Постановка лигирования и амплификации осуществлялась с использованием набора реагентов компании «Синтол».

Основные результаты. После секвенирования и анализа всех последовательностей ДНК были отобраны кДНК пациентов с подозрением на делецию экзона 7. После постановки фрагментного анализа с праймерами на район делеции у всех этих пациентов была выявлена кДНК двух клонов опухолевых клеток: клеток с нормальной длиной гена ABL1 и клеток с делецией экзона 7. Для определения направления эволюции опухолевых клонов у пациентов с делецией провели исследование образцов кДНК от 2 до 5-летней давности (секвенирование и фрагментный анализ). У одного из пациентов была обнаружена ранее неописанная точковая мутация c.844G>C (p.E282Q).

После сравнения последовательности участка гена ABL1 с делецией с базами данных (COSMIC, Gene) была установлена аминокислотная последовательность предполагаемого белкового продукта, который синтезируется с такого фрагмента. Делеция приводит к формированию преждевременного стоп-кодона и формированию укороченного пептида.

Заключение/выводы. Делеция экзона 7 гена ABL1 и точковая мутация c.844G>C (p.E282Q) способствуют формированию резистентности к ИТК у пациентов с ХМЛ. Опухолевые клоны, несущие делецию, склонны к быстрой прогрессии и приобретению сочетанных точковых мутаций, усиливающих резистентность. Мутация c.844G>C не описана для гена ABL1 у пациентов с ХМЛ. Однако установлено, что у пациентов с раком молочной железы её появление играет существенную роль в перерождении нормальной клетки в опухолевую. [1].

Полученные данные противоречат ряду литературных источников, согласно которым делеция экзона 7 не способна приводить к резистентности, поскольку является сплайсинговым вариантом и такая мРНК мгновенно подвергается деградации [2]. Однако имеются другие исследования, которые подтверждают обратное [3].

Таким образом, обязательно необходимо учитывать сплайсинговые варианты гена ABL1 (в частности, делецию экзона 7) при подборе терапии ХМЛ и оценке ее эффективности.

Список используемой литературы

1. Goswami R.S., Patel K.P., Singh R.R., Meric-Bernstam F., Kopetz E.S., Subbiah V., Alvarez R.H., Davies M.A., Jabbar K.J., Roy-Chowdhuri S. et al. Hotspot mutation panel testing reveals clonal evolution in a study of 265 paired primary and metastatic tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2015; 21(11): 2644-2651.

2. Gaillard J.B., Arnould C., Bravo S., Donadio D., Exbrayat C., Jourdan E., Reboul D., Chiesa J., Lavabre-Bertrand T. Exon 7 deletion in the bcr-abl gene is frequent in chronic myeloid leukemia patients and is not correlated with resistance against imatinib. *Molecular cancer therapeutics.* 2010; 9(11): 3083-3089.

3. Patkar N., Ghodke K., Joshi S., Chaudhary S., Mascerhenas R., Dusseja S., Mahadik S., Gaware S., Tembhare P., Gujral S. et al. Characteristics of BCR-ABL kinase domain mutations in chronic myeloid leukemia from India: not just missense mutations but insertions and deletions are also associated with TKI resistance. *Leukemia & lymphoma.* 2016; 57(11): 2653-2660.

РОЛЬ НАРУШЕНИЙ В ГЕНАХ *PALB2* И *RAD51D* В ПАТОГЕНЕЗЕ РАКА ЯИЧНИКОВ

Прокофьева Д.С.[1], Мингажева Э.Т.[1], Сакаева Д.Д.[2], Хуснутдинова Э.К.[1,3]

[1] ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет», Уфа, Россия
[2] ГБУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер», Уфа, Россия
[3] ФГБУН «Институт биохимии и генетики» УНЦ РАН, Уфа, Россия

Рак яичников (РЯ) занимает первое место по смертности среди гинекологических раков у женщин [1]. В России ежегодно выявляют более 12 500 новых случаев заболевания РЯ, при этом около половины из них заканчиваются смертельным исходом [2]. Высокая смертность от злокачественных опухолей яичников, в первую очередь, связана с установлением диагноза на поздних стадиях развития, когда резко сокращаются шансы на благоприятный исход лечения. Важную роль в патогенезе РЯ играют изменения в сигнальном пути ответа клетки на воздействие ионизирующего излучения. Данный сигнальный путь включает в себя множество участников: BRCA1, BRCA2, CHEK2, NBN, ATM, MDC1, PALB2, RAD51D, TP53, MRE11 и другие[3]. В первую очередь, развитие РЯ ассоциировано с мажорными мутациями в высокопенетрантных генах *BRCA1* и *BRCA2* [4]. Однако не более 15% всех случаев заболевания опосредованы мутациями в данных генах. Большая часть случаев РЯ связана с нарушениями в генах со средней и низкой пенетрантностью.

Продукт гена *RAD51D* участвует в образовании комплекса BCDX2 (RAD51B, RAD51C, RAD51D и XRCC2), который необходим для процесса гомологичной рекомбинации [5]. Согласно литературным данным мутации в гене *RAD51D* ассоциированы с высоким риском развития семейных форм рака яичников, которые не вызваны зародышевыми мутациями в генах *BRCA1* и *BRCA2*.

Белок PALB2 необходим для локализации BRCA2 в участках повреждений ДНК и взаимодействия белков BRCA1 и BRCA2 [6]. Перечень различных видов опухолей у носителей мутаций в гомозиготном состоянии в генах *PALB2* и *BRCA2* очень схож [7]. Учитывая важную роль белка PALB2 в локализации BRCA2, а также похожие фенотипические проявления биаллельных мутаций в генах *PALB2* и *BRCA2* у больных Анемией Фанкони, было сделано предположение, что моноаллельные мутации в гене *PALB2* мо-

гут предрасполагать к развитию рака молочной железы (РМЖ) или рака яичников.

Настоящее исследование посвящено анализу вклада изменений в нуклеотидной последовательности генов *PALB2* и *RAD51D,* участвующих в репарации ДНК с помощью гомологичной рекомбинации, в патогенез рака яичников.

В ходе данного исследования мы провели поиск изменений нуклеотидной последовательности ДНК в 10 экзонах гена *RAD51D* у 15 больных раком яичников. Определение нуклеотидных последовательностей проводили на автоматическом секвенаторе ABIPrism 3100 (AppliedBiosystems) с использованием набора для флюоресцентного мечения DYEnamicTMET согласно протоколу фирмы производителя [Amersham Pharmacia Biotech DYEnamicET Terminator Cycle Sequencing Kit]. Выборка (n=15) была сформирована с учетом наличия семейной истории заболеваний РЯ и/или РМЖ женщин, у которых на предыдущем этапе работы не обнаружено высокопенетрантных мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*. У двух пациенток с раком яичников выявлены два полиморфных варианта rs9901455 и rs4796033, которые ранее были описаны. Согласно литературным данным ген *RAD51D* выступает в качестве важного гена-кандидата при РЯ. В исследовании Loveday с соавт. у больных РЯ с семейной историей РЯ и/или РМЖ мутации в гене *RAD51D* были выявлены у 8/911 (0,9%) пациенток. Среди здоровых женщин контрольной группы мутации в гене были обнаружены с частотой 0,09% (1/1060). У 1,7% семей с двумя случаями РЯ наблюдались мутации в гене *RAD51D*, в то время как, у 5,1% семей с тремя и более случаями заболевания РЯ были выявлены мутации в гене *RAD51D*. Риск развития рака яичников у носительниц мутаций в гене *RAD51D* возрастает в 6,3 раза. Согласно представленным результатам работы Loveday с соавт., у женщин с мутациями в гене *RAD51D* риск развития РЯ в течение жизни составляет 10% [8]. Однако в ходе нашей работы мутаций в гене *RAD51D* у пациенток с семейной формой РЯ не идентифицировано. Для подтверждения полученных нами результатов необходимо проведение дополнительных исследований на расширенной выборке пациентов.

Кроме того, нами осуществлен поиск изменений нуклеотидной последовательности кодирующего региона гена *PALB2* с использованием метода анализа кривых плавления с высокой разрешающей способностью (HRM) у 243 больных РЯ. Анализ кривых плавления проводился на Rotor-Gene 6000 или CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System с использованием флуоресцентного красителя Eva Green (Biotium Inc, Hayward, CA). Все образцы с изменениями в кривых плавления были подтверждены секвенированием по Сэнгеру. В ходе проведенного анализа была обнаружена мутация c.172_175delTTGT (c.168_175del4) в 3 экзоне гена, приводящая к образованию преждевременного стоп кодона, у одного больного РЯ, а также выявлены 9 полиморфных вариантов, один из которых определен впервые (c.26T>A) (таблица 1).

Таблица 1. Изменения последовательности гена *PALB2* у больных раком яичников

Экзон	Изменения на нуклеотидном уровне	Изменения на аминокислотном уровне	Количество пациентов	Частота, %	Ссылка
5´-UTR	c.-47G>A	–	11	4,3	*rs*8053188
1	c.26T>A	p.L9L	1	0,4	данное исследование
3	c.172_175delTTGT	p.S58fsX8	1	0,4	[8]
4	c.212-58A>C	–	4	1,6	*rs*80291632
4	c.1010T>C	p.L337S	1	0,4	*rs*45494092
4	c.1676A>G	p.Q559R	51	20	*rs*152451
5	c.2014C>G	p.E672Q	18	7,1	*rs*45532440
8	c.2794G>A	p.V932M	2	0,8	*rs*45624036
9	c.2993G>A	p.G998E	9	3,5	*rs*45551636
12	c.3300T>G	p.T1100T	14	5,5	*rs*45516100

У женщины с мутацией c.172_175delTTGT в гене *PALB2* диагностирована серозная карцинома с высокой степенью злокачественности с поражением обоих яичников в возрасте 46 лет. Ранее у этой пациентки была диагностирована меланома кожи. Нами проведен дополнительный анализ выявленной мутации в группе больных раком молочной железы из РБ (n=999), в результате которого было выявлено 3 (0,3%) носительницы делеции c.172_175delTTGT. У двух пациенток с раком молочной железы диагноз был поставлен в возрасте до 50 лет, у одной из них отмечается семейная история заболевания. Все женщины русского этнического происхождения. Таким образом, в результате скрининга кодирующего региона гена *PALB2* впервые выявлен полиморфный вариант c.26T>A (p.L9L), а также мутация c.172_175delTTGT, приводящая к синтезу укороченного белка, которая обнаружена с низкой частотой среди больных РЯ (0,4%) и РМЖ (0,3%). Согласно данным литературы, делеция c.172_175delTTGT встречается у больных РМЖ из Европы. Так в исследовании S. Casadei с соавт, при изучении наследственного рака молочной железы, мутация c.172_175delTTGT была выявлена у пациентки, проживающей в Ирландии [8]. В работе Janatova M. с соавт. данная делеция была обнаружена у 4/409 (1%) больных раком молочной железы с семейной

историей РМЖ и/или РЯ, у которых не выявлены мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2.* В ходе дополнительного анализа среди пациентов без семейной истории исследуемой патологии были идентифицированы 2/704 (0,3%) носительницы данной мутации [9].

В целом, полученные нами данные свидетельствуют в пользу распространения мутации c.172_175delTTGT гена *PALB2* в славянских популяциях.

Список используемой литературы

1. J. Pertmuth-Wey, T. Sellers. Epidemiology of ovarian cancer // Cancer Epidemiology. – Humana Press, 2009. – P. 413-437.

2. А.Д. Каприн, В.В. Старинский, Г.В. Петрова. Злокачественные новообразования в России в 2014 году // – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, – 2016. – илл. – 250 с. ISBN 978-5-85502-219-3.

3. J. Petrini, T. Stracker. The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators // Trends in cell biology. – 2003. – Vol. 13. – P. 458-462.

4. R. Janavicius, I. Pepalyte, V. Kucinskas. Novel and common BRCA1 mutations in familial breast/ovarian cancer patients from Lithuania // Breast cancer research and treatment. – 2009. – Vol. 117. P. 467-469.

5. K. Miller, D. Sawicka, D. Barsky, J. Albala et al. Domain mapping of the Rad51 paralog protein complexes // Nucleic acids research. – 2004. – Vol. 32. – P. 169-178.

6. B. Xia, J. Dorsman, N. Ameziane, Y. de Vries et al. Fanconi anemia is associated with a defect in the BRCA2 partner PALB2 // Nature genetics. – 2006. – Vol. 39. – P. 159-161.

7. S. Reid, D. Schindler, H. Hanenberg, K. Barker et al. Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer // Nature genetics. – 2006. – Vol. 39. – P. 162-164.

8. S. Casadei, B. Norquist, T. Walsh et al. Contribution of inherited mutations in the BRCA2-interacting protein PALB2 to familial breast cancer // Cancer research. – 2011. – Vol. 71. – P. 2222-2229.

9. M. Janatova, Z. Kleibl, J. Stribrna, A. Panczak et al. The PALB2 gene is a strong candidate for clinical testing in BRCA1-and BRCA2-negative hereditary breast cancer // Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers. – 2013. – Т. 22. – №. 12. – С. 2323-2332.

ПАТТЕРН ЭКСПРЕССИИ микроРНК КАК НОВЫЙ ПЕРСПЕКТИВНЫЙ МАРКЕР РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ И ПРОГНОЗА РИСКА РАЗВИТИЯ РАКА ЖЕЛУДКА КИШЕЧНОГО ТИПА

Рубцов В.А., Поморгайло Е.Г., Федотова Ю.А.

ФГБОУ ВО «ОГМУ» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Омск, Россия

Цель и задачи: изучить экспрессию микроРНК, влияющих на ключевые для канцерогенеза сигнальные пути, в слизистой оболочке желудка у пациентов с хроническим гастритом и раком желудка кишечного типа (непосредственно в ткани опухоли и слизистой оболочки желудка с морфологическими признаками хронического гастрита).

Материалы и методы: объектами исследования были фрагменты слизистой оболочки желудков: 10 биоптатов с минимальными изменениями, 9 биоптатов слизистой оболочки антрального отдела желудка с H. pylori-ассоциированным хроническим гастритом; 28 образцов операционного материала желудков, резецированных по поводу рака желудка кишечного типа, у которых для исследования были взяты фрагменты опухоли и в 22 случаях - ткань дистантной зоны, вне опухолевого роста (хронический атрофический гастрит). Количество микроРНК-146a, микроРНК-155, микроРНК-21, микроРНК-223, микроРНК-192, микроРНК-200b, микроРНК-221, микроРНК-375 определяли методом ПЦР в реальном времени с использованием специфических праймеров а анализируемым микроРНК из парафиновых срезов. Нормализацию проводили на малую РНК U6 (РНК). В качестве основных характеристик описательной статистики числовых данных был использован – U-критерий Манна–Уитни для 2-х независимых выборок (основные группы и группа сравнения). Критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез принимали $p \leq 0,05$.

Результаты: отмечалось значимое и последовательное повышение экспрессии всех исследованных микроРНК в ряду хронический неатрофический (микроРНК-21: 55,76±9,85; микроРНК-223: 12,40±5,59), атрофический гастрит (микроРНК-21: 225,69±39,96; микроРНК-223: 84,6±22,43; микроРНК-375: 37,58±7,47), аденокарцинома желудка кишечного типа (микроРНК-21: 378,65±35,41; микроРНК-223: 114,09±38,56; микроРНК-375: 13,94±2,53)по сравнению с контрольной группой биоптатов слизистой оболочки желудков подростков (микроРНК-21: 5,54±0,93; микроРНК-223: -10,96±5,30), за исключением онкосупрессивной микроРНК-375, экспрессия которой при раке желудка закономерно снижена. Среди исследованных микроРНК наиболее статистически достоверные результаты были выявлены при анализе экспрессии микроРНК-21 и микроРНК-223.

Обсуждение: выявленная аберрантная экспрессия микроРНК реализует свою роль в канцерогенезе за счет регуляции экспрессии генов-мишеней белков из ключевых сигнальных путей, играющих важное значение при инициации и прогрессивном развитии рака желудка. МикроРНК-21 за счет гена-мишени PTEN, из сигнального пути PI3K-Akt, активирует пролиферацию и блокирует апоптоз при раке желудка. МикроРНК-223, за счет регуляции экспрессии EPB41L3, FBXW7, HCDC4, STMN1, связанна с инвазией и метастазированием. МикроРНК-375, экспрессия которой снижена в раке желудка, за счет мишени – Sp1 из PI3K-Akt-Sp1 сигнального пути препятствует инвазии и метастазированию.

Выводы: аберрантная экспрессия ключевых микроРНК в тканях слизистой оболочки желудка является перспективным кандидатом на роль нового маркера для ранней диагностики, типирования, прогноза при раке желудка кишечного типа.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ И ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ РАКА ЛЕГКОГО НА ОСНОВЕ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ДНК И РНК

Рыкова Е.Ю.[1,4], Запорожченко И.А.[1,5], Пономарева А.А.[2,6], Морозкин Е.С.[1,5], Скворцова Т.Э.[1], Гайнетдинов И.В.[3], Капицкая К.Ю.[3], Власов В.В.[1], Чердынцева Н.В.[2,7], Ажикина Т.Л.[3], Лактионов П.П.[1,5]

[1] ИХБФМ СО РАН, Новосибирск
[2] ТНИМЦ, Томск
[3] ИБХ РАН, Москва
[4] НГТУ, Новосибирск
[5] НИИПК им. академика Е.Н. Мешалкина, Новосибирск
[6] ТПУ, Томск
[7] ТГУ, Томск, Россия

Введение. Выявление первичной опухоли и рецидивов на ранних стадиях – это одно из главных условий повышения эффективности терапии, увеличения срока и улучшения качества жизни больных при раке легкого. Определение маркеров опухоли в составе ДНК и микроРНК, циркулирующих в крови (цирДНК и цир-микроРНК), может привести к значительному прогрессу в диагностике и мониторинге рака, а также разработке оптимальных подходов к индивидуальной терапии онкологических заболеваний.

Цель. Разработка методов диагностики рака легкого, основанных на определении маркеров опухоли в составе цирДНК и цир-микроРНК крови.

Материалы и методы. ЦирДНК получали из крови здоровых доноров (ЗД) и больных немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ), со стадией опухолевого процесса $T_{1-3}N_{0-3}M_0$, до лечения. Кровь разделяли на плазму и клетки, фракцию, связанную с клеточной поверхностью (скп-цирДНК) получали последовательной обработкой клеток фосфатным буфером и раствором трипсина. Для выделения цирДНК из плазмы и скп-цирДНК использовали наборы «Blood DNA Isolation Kit» (НПФ Биосилика, Россия). ЦирРНК из плазмы крови выделяли методом двухступенчатой денатурации в однофазной системе, содержащей гуанидин изотиоцианат и органические растворители, с последующей очисткой на стекловолокнистых сорбентах (НПФ Биосилика, Россия). Сравнительное исследование цирНК ЗД и больных раком легкого проводили при помощи масштабного секвенирования, микроэррея на основе количественной ПЦР. Для повышения эффективности анализа использовали методы специфического обогащения НК, и цирНК, связанные с поверхностью клеток крови (скп-цирНК). Для анализа выбраны эпигенетические изменения ДНК, микроРНК (миРНК).

Основные результаты. Разработана тест-система на основе метил-специфичной ПЦР двух генов, аберрантно метилированных в опухолях легкого, и контрольного гена FDPS. С использованием тест-системы выполнен анализ цирДНК плазмы крови ЗД (n=90), больных РЛ (n=78). По данным ROC анализа чувствительность и специфичность теста по диагностике РЛ составляет 82% и специфичность 91%, площадь под кривой AUC=0.93, что по экспертной шкале для AUC оценивает качество теста как отличное. Для выявления новых эпигенетических маркеров в цирДНК крови проведено масштабное секвенирование на платформе MiSeq (Illumina) фрагментов 5'-UTR L1 семейства ретротранспозонов в составе скп-цирДНК. Проведен сравнительный анализ соотношения L1 подсемейств (L1Hs, L1PA2-4) у больных РЛ и ЗД в скп-цирДНК до и после обогащения методом MIRA (Methylated CpG Island Recovery Assay). Показано, что при РЛ в цирДНК происходит достоверное снижение уровня метилирования для подсемейства L1Hs. Методом количественной ПЦР после MIRA-обогащения выявлено значимое снижение уровня метилирования фрагментов L1Hs подсемейства в скп-цирДНК крови у больных РЛ по сравнению со ЗД (критерий Манна-Уитни, p=.0012). По данным ROC анализа AUC = 0.69, что позволяет оценить качество теста как хорошее. Таргетное секвенирование на платформе MiSeq (Illumina) повторов Alu выявило достоверное увеличение уровня метилирования фрагментов двух подсемейств (AluB и AluScgqxz) в цирДНК у больных РЛ. Разработан тест на метилирование «старого» подсемейства AluScgqxz в цирДНК на основе количественной ПЦР после MIRA-обогащения. Сравнительный анализ показал, что этот маркер достоверно дискриминирует больных РЛ от ЗД. По данным ROC анализа AUC = 0.71, что позволяет оценить качество теста как хорошее. Результаты говорят о перспективности дальнейшей верификации тестов на метилирование L1HS и AluScgqxz в цирДНК крови на увеличенных выборках больных для расширения эффективной панели маркеров РЛ.

На основании мета-анализа информации, опубликованной в базах данных, были выбраны кандидатные микроРНК и получены новые данные об экспрессии 7-ми микроРНК (miR-19b, miR-21, miR-25, miR-205, miR-125b, miR-183, miR-126) (относительно референсной miR-16) в плазме крови больных РЛ (n=75) и ЗД (n=50) с учетом клинико-патологических характеристик больных раком легкого. Установлено, что miR-19b является значимым маркером для двух гистологических типов НМРЛ: плоскоклеточного рака и аденокарциномы легкого (ПКРЛ и АКЛ). Снижение уровня miR-183 в плазме крови является значимым маркером для дифференцировки больных АКЛ относительно ЗД. Отношение экспрессии для пары микроРНК miR-125b / miR-19b в плазме крови больных раком легкого ассоциировано с высоким ответом опухоли на 2 курса неоадъювантной химиотерапии в процессе комбинированного лечения. Выявлена ассоциация miR-19b, miR-21, miR-25, miR-205 и отношения miR-125b / miR-19b с общей 5-летней выживаемостью больных по методу Каплана-Майера. Проведено профилирование 179-ти микроРНК на платформе miRCURY LNA miRNA qPCR в образцах цирРНК ЗД (n=10) и больных РЛ (n=20). Статистический анализ данных профилирова-

ния при помощи пакетов функций языка R (версия 3.2.2) в оболочке R Studio выявил 29 пар микроРНК, отношение экспрессии которых в плазме крови является потенциально значимым для диагностики РЛ. Для верификации на платформе miRCURY LNA miRNA qPCR Panels Serum/Plasma (Exiqon, Дания) выявленных отношений экспрессии в парах микроРНК проведен анализ выбранной панели 20-ти микроРНК на независимой выборке больных РЛ, больных эндобронхитом и 3Д. Статистический анализ полученных данных выявил 20 отношений, которые достоверно отличались между больными раком легкого и двумя группами сравнения ($p<0,05$, после поправки Бенджамини-Хочберга). Экспрессия двух пар микроРНК (miR-484/miR-374a-5p и miR-150-5p/miR-144-5p) позволила разделить группы больных РЛ и группы сравнения с точностью 91%. Полученные знания важны для формирования панели микроРНК- маркеров АКЛ и ПКРЛ с целью их дифференциальной диагностики и лечения.

Заключение. Показана эффективность высокопроизводительных технологий анализа цирНК для поиска диагностических и прогностических маркеров рака. Проводится верификация выявленных маркеров рака легкого при помощи методов массового анализа и количественной ПЦР на расширенных группах пациентов.

Работа поддержана грантом № 2014-208 по программе II.1П фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий», грантом РФФИ №14-04-01881, в рамках программы «Постдок в Томском политехническом университете».

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ СОЧЕТАНИЯ МУТАЦИЙ JAK2V617F И CALR P.K385FS*47 У ПАЦИЕНТА С ПЕРВИЧНО ДИАГНОСТИРОВАННЫМ ХМН

Субботина Т.Н.[1,2], Николаева П.А.[1], Васильев Е.В.[3], Хоржевский В.А.[4], Горбенко А.С.[2], Абдуллаев А.О.[5], Судариков А.Б.[5], Ольховский И.А.[2,6]

[1]ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», Красноярск, Россия
[2]Красноярский филиал ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, Красноярск, Россия
[3]КГБУЗ «Краевая клиническая больница», Красноярск, Россия
[4]КГБУЗ «Красноярское краевое патолого-анатомическое бюро», Красноярск, Россия
[5]ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, Москва, Россия
[6]ФГБУН «Красноярский научный центр» Сибирского отделения РАН, Красноярск, Россия

Введение. Мутации в 9 экзоне гена CALR (Calreticulin) наряду с мутацией Jak2V617F с высокой частотой ассоциируются с хроническими миелопролиферативными новообразованиями (ХМН) и согласно пересмотренной классификации ВОЗ 2016г считаются большими диагностическими критериями эссенциальной тромбоцитемии (ЭТ) и первичного миелофиброза (ПМФ). Из-за высокой частоты встречаемости этих мутаций у пациентов с «первично диагностированными» ЭТ и ПМФ им придают статус «драйверных» или «пусковых» мутаций. В большинстве случаев патогенез «первично диагностированных» случаев ЭТ и ПМФ является «монодрайверным», то есть, выявляется при наличии только одной из указанных мутаций с широкой вариацией аллельной нагрузки. Случаи сочетания мутации JAK2V617F с мутациями в 9 экзоне гена CALR при первичной диагностике ЭТ и ПМФ являются достаточно редким событием и часто наблюдаются при длительном течении и «трансформации» заболевания в другие формы лейкозов. В большинстве случаев одновременного присутствия двух мутаций выявляется достаточно низкий уровень аллельной нагрузки мутацией JAK2V617F (≤ 1%) при более высоком уровне второй соматической мутацией. В связи с этим рекомендуется проводить поиск дополнительных драйверных мутаций в гене CALR при первичном выявлении низкого уровня аллельной нагрузки мутацией JAK2V617F. В то же время встречаются пациенты, у которых дополнительные драйверные мутации выявляются при наличии высокого уровня аллельной нагрузки мутацией JAK2V617F. Так, в работе Mansier, 2015 с соавторами описан пациент, у которого выявлена мутация в гене CALR с уровнем нагрузки ~10%, а уровень аллельной нагрузки мутацией JAK2V617F составил 57%.

Цель и задачи. Провести анализ аллельной нагрузки мутаций JAK2V617F и CALR p.K385fs*47 у пациента с первично диагностированным ХМН.

Материалы и методы. Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов цельной крови с использованием набора реагентов «ДНК-сорб-В» (АмплиСенс). Для детекции мутации V617F были использованы реагенты, входящие в форму комплектации №8 «Тромбо-скрин» набора реагентов «АмплиСенс® Пироскрин». Пиросеквенирование проводилось на приборе «PyroMark Q24» с использованием набора «PyroMark® Gold Q24 Reagents» («Qiagen», Германия). Последовательность нуклеотидов, добавляемых в реакцию пиросеквенирующего синтеза, была следующая: C/AACATACTCC. Анализ мутаций в гене CALR проводили на автоматическом секвенаторе ABI3130 (Applied Biosystems, США) методом фрагментного анализа с использованием праймеров: 5'CTGAGGTGTGTGCTCTGCC3' и 5'FAM CAGAGACATTATTTGGCGCGG3'. Наличие инсерции c.1154_1155insTTGTC со сдвигом рамки считывания p.K385fs*47 в 9 экзоне гена CALR было подтверждено методом секвенирования по Сэнгеру.

Основные результаты. Пациентка, в ДНК которой были выявлены одновременно две соматические мутации, обуславливающие развитие ХМН (JAK2V617F и CALR P.K385FS*47) – женщина 1939 г.р. Мутации впервые были выявлены в образцах крови, взятых в июне 2014г. Пациентка считает себя больной с января 2014г, после появления периодических носовых кровотечений, которые самостоятельно купировались. В апреле 2014г, при обследовании у гематолога в миелограмме данных за острый лейкоз не получено. При цитогенетическом исследовании – нормальный кариотип. По результатам обследова-

ния диагностируется фибротическая фаза ПМФ. С 2014 г. проводится циторедуктивная терапия гидроксикарбамидом 1000 мг/сутки. На фоне лечения спленомегалии нет, уровень WBC и Plt в норме, но в клинической картине превалируют конституциональные симптомы, прогрессирующая анемия.

Результаты клинико-гематологического исследования в динамике течения заболевания

Показатель	Июнь 2014 г.	Декабрь 2014 г.	Декабрь 2015 г.	Сентябрь 2016 г.
Гемоглобин (Hb), г/л	101	101	110	96
Гематокрит (Hct), %	36,3	34	31,2	31,4
Эритроциты (RBC), $\times 10^{12}$/л	4,15	3,43	2,97	2,87
Лейкоциты (WBC), $\times 10^{9}$/л	12,19	8,58	7,34	7,76
Тромбоциты (Plt), $\times 10^{9}$/л	473	405	451	338
Размер селезенки, см	-	-	10,8 × 4,4	10,1 × 4,1

В декабре 2015 г. проведено морфологическое исследование трепанобиоптата костного мозга. При микроскопическом исследовании отмечено: трепанобиоптат костного мозга подвздошной кости достаточен для исследования объема с грубым нарушением гистоархитектоники за счет явлений фиброза. Клеточность костного мозга снижена относительно возрастной нормы до 30% (норма 40-50%). Мегакариоциты с выраженными явлениями атипии с широким спектром размеров от мелких до средних, часто расположены в связи с костными балками, формируют плотные и рыхлые кластеры. Гранулоцитарный росток диссоциирован в связи с явлениями фиброза, без признаков дефицита созревания. Эритроидный росток диссоциирован в силу фиброза, на отдельных участках с тенденцией к формированию островков, нормобластического типа. Синусоидного типа сосуды эктазированы, содержат костномозговые элементы. Обращают на себя явления системного остеопороза с наличием множества «висячих» балок. При импрегнации солями серебра по Гомори MF-3. Заключение: морфологическая картина ХМН, соответствует фибротической фазе ПМФ, MF-3.

Уровень аллельной нагрузки JAK2V617F в пробе от декабря 2014г составил 9%, CALR P.K385FS*47 – 40%. Исходя из того, что уровень аллельной нагрузки двух выявленных мутаций в одной и той же пробе ДНК различен можно предположить, что мутации произошли в клетках из различных клонов или же мутация в гене CALR произошла на более ранних этапах клеточной дифференцировки, а мутация в гене JAK2 – на более поздних этапах развития одних и тех же клеточных клонов.

Заключение. Сочетанные с JAK2V617F мутации, обуславливающие развитие ХМН могут встречаться при разных уровнях аллельной нагрузки мутацией JAK2V617F. Для оценки вклада каждой из мутаций в развитие заболевания требуется более тщательное изучение пациентов, имеющих сочетанные мутации.

Список литературы

Mansier O., Migeon M., Etienne G., Bidet A., Lippert E. JAK2V617F and CALR double mutations are more frequently encountered in patients with low JAK2V617F allelic burdens. Leuk Lymphoma. 2016; 57(8):1949-51.

РОЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ МУТАЦИОННОГО СТАТУСА КИНАЗНОГО ДОМЕНА *BCR-ABL* БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОЛЕЙКОЗОМ ПРИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ТЕРАПИИ ИНГИБИТОРАМИ ТИРОЗИНКИНАЗЫ В УЗБЕКИСТАНЕ

Каримов Х.Я., Султанова Ш.Х., Казакбаева Х.М., Бобоев К.Т.

Научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови МЗ РУз, г. Ташкент, Узбекистан

Иматиниб стал первым ингибитором BCR-ABL тирозинкиназы (ИТК), использование которого у пациентов с хроническим миелолейкозом (ХМЛ) в хронической фазе привело к значительному увеличению как общей выживаемости (ОВ), так и выживаемости без прогрессии. Так, по данным 8-летнего наблюдения в рамках исследования IRIS (International Randomized Study of Interferon and STI571), вероятность ОВ пациентов, получающих терапию ИМ, составляет 93 %. При этом вероятность полного цитогенетического ответа (ПЦГО) достигает 83 %. Однако, несмотря на столь блестящие результаты, к 8-летнему сроку наблюдения 45 % пациентов вынуждены были прекратить терапию ИМ из-за неудовлетворительных результатов достигнутого ответа и/или непереносимости лечения. Одной из основных причин резистентности больных хроническим миелолейкозом к терапии ингибиторами тирозинкиназы (ИТК) являются мутации киназного домена *BCR-ABL*. Сохранение мутантных клонов при терапии ИТК указывает на неполное или неэффективное *BCR-ABL* ингибирование.

Цель и задачи. Оценка результатов внедрения GLIVEK International Patient Assistance Program(GIPAP) в Узбекистане и получение сведений о больных, резистентных к ингибиторам тирозинкиназы, для дальнейшего ведения больных, резистентных к ингибиторам тирозинкиназы первого поколения.

Материалы и методы. Для оценки результатов взято 265 больных ХМЛ, получающих препарат Гливек, в Узбекистане и проанализированы результаты точечных мутаций гена *BCR-ABL,* вызывающих резистентность к ингибиторам тирозинкиназ, с помощью метода прямого секвенирования. Количественное определение экспрессии химерного гена *BCR-ABL* проводили методом ПЦР в режиме «реального времени» на наборах АмплиСенс Лей-

коз Квант *M-bcr*-FRT, интенсивность экспрессии химерного онкогена *BCR-ABL* и контрольного гена *ABL* определяли согласно инструкции производителя. Выявление мутаций в киназном домене гена *BCR-ABL* проводили методом прямого секвенирования по Сэнгеру. Использованная методика подходит только для анализа следующих вариантов транскриптов b2a2, b2a3, b3a2, b3a3 с относительным уровнем экспрессии химерного гена *BCR-ABL* не менее 2%.

Основные результаты. Мутации гена *BCR-ABL* выявлены у 18 (6,79%) из 265 больных ХМЛ в среднем через 5 лет, у них чаще других определялись: *T3151*(образуется в результате замены треонина в положении 315 на изолейцин в АТФ-связывающей части киназы ABL. Следствием этого является нарушение образования водородной связи, что вместе со стерическим несоответствием за счет дополнительной углеводородной группы в боковой цепи изолейцина приводит к невозможности связывания ИТК с АТФ-карманом тирозинкиназы.)– у 6 (24,3%), *G250E* (замена глицина в положении 250 на глутаминовую кислоту) - у 4 (22,2%), M351T (данная мутация приводит к умеренному снижению чуствительности к иматинибу*)* – у 3 (16,6%) больных, нечувствительными к ИТК2 мутации были у 5 (27,7%).

Заключение. Высокая частота резистентности и широкий спектр мутаций гена *BCR-ABL* убедительно доказывают необходимость исследования мутационного статуса киназного домена *BCR-ABL* у всех больных ХМЛ при резистентности к терапии ИТК. Наличие мутаций гена *BCR-ABL* является прогностически неблагоприятным фактором отдаленной выживаемости при ХМЛ. Исследование мутационного статуса показано всем больным ХМЛ в хронической фазе заболевания с наличием первичной и вторичной резистентности к лечению иматинибом. Коррекция лечения без учета мутационного статуса может привести к возникновению новых мутаций, назначению неэффективной терапии и прогрессии заболевания.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА GLAD-ПЦР ДЛЯ АНАЛИЗА МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОВ-ОНКОМАРКЕРОВ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

Евдокимов А.А.[1], Нетесова Н.А.[1], Сметанникова Н.А.[1], Абдурашитов М.А.[1], Акишев А.Г.[1], Малышев Б.С.[1], Давидович Е.С.[1], Федотов В.В.[1], Кузнецов В.В.[1], Карпов А.Б.[2], Дегтярев С.Х.[1]

[1]ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирская область, Кольцово, Россия

[2]ФГУП «Северский биофизический научный центр» Федерального медико-биологического агентства, Томская область, Северск, Россия

Введение. Среди злокачественных новообразований колоректальный рак (КРР) занимает в мире четвертое место по показателям летальности (более 500 тыс. случаев в год). В Российской Федерации распространенность КРР достигает 235 случаев на 100 тыс. населения. Наиболее тревожным является тот факт, что на 100 пациентов, заболевших КРР, приходится более 70 умерших, причем 28 из них – в течение одного года с момента постановки диагноза. Это обусловлено тем, что при первичном обращении к врачу запущенные формы заболевания (III-IV стадии) диагностируются более чем у 50 % больных. В общей структуре смертности более 30 % составляют пациенты моложе 60 лет, что свидетельствует о высокой социальной значимости ранней диагностики КРР.

Известно, что на начальных этапах канцерогенеза происходит *de novo* метилирование регуляторных областей различных генов, что приводит к снижению уровня их экспрессии. Показано, что развитие КРР может быть ассоциировано с гиперметилированием более чем 50 генов. Метилирование ДНК *de novo* осуществляют ДНК-метилтрансферазы Dnmt3a и Dnmt3b, которые преимущественно распознают и метилируют последовательность RCGY с образованием сайта R(5mC)GY. Недавно обнаруженная метилзависимая эндонуклеаза GlaI узнает и расщепляет именно этот сайт, что делает ее удобным инструментом для выявления *de novo* метилированных сайтов в ДНК человека. Ранее на основе фермента GlaI нами был разработан новый способ определения сайтов R(5mC)GY в исследуемом участке ДНК, получивший название GLAD-ПЦР [Кузнецов В.В. и др. Способ определения нуклеотидной последовательности Pu(5mC)GPy в заданном положении протяженной ДНК // Патент РФ № 2587631].

Цель работы. Изучение возможности использования метода GLAD-ПЦР для анализа метилирования сайтов RCGY в регуляторных областях генов-онкомаркеров КРР.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили ДНК, выделенные из образцов опухолевых тканей (аденокарциномы различной степени дифференцировки), взятых при выполнении оперативного вмешательства у больных КРР (n=21). В качестве контрольных образцов использовали препараты ДНК, выделенные из фрагментов здоровой ткани толстой кишки (n=9), взятых на значительном удалении от опухолевого очага – на линии резекции. Выделение и очистку ДНК из опухолевых и здоровых тканей, а также ДНК клеток аденокарциномы ободочной кишки человека линии SW837, использованной для выявления перспективных для GLAD-ПЦР анализа сайтов R(5mC)GY, проводили методом фенол-хлороформной экстракции.

Анализируемые гены-онкомаркеры КРР были выбраны на основании литературных источников, в т.ч. данных бисульфитного секвенирования. Выявление сайтов R(5mC)GY в регуляторных областях генов-онкомаркеров КРР проводили методом GLAD-ПЦР, включающим GlaI-гидролиз ДНК, совмещенный с реакцией лигирования полученных рестриктов с адаптером (GLAD), и последующую амплификацию целевых фрагментов ДНК в ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

Статистический ROC-анализ значений пороговых циклов, полученных при исследовании образцов ДНК

по эпигенетическим маркерам КРР, проводили с помощью программного обеспечения MedCalc 15.11 (MedCalc Software). Интегральным показателем информативности маркера в ROC-анализе служит площадь под характеристической кривой (ППК), определяемая чувствительностью и специфичностью теста.

Основные результаты. Поиск метилированных сайтов RCGY в регуляторных областях генов *ADHFE1*, *ALX4*, *CNRIP1*, *EID3*, *ELMO1*, *ESR1*, *FBN1*, *HLTF*, *LAMA1*, *NEUROG1*, *NGFR*, *RARB*, *RXRG*, *RYR2*, *SDC2*, *SEPT9*, *SFRP2*, *SOCS3*, *SOX17*, *THBD*, *TMEFF2*, *UCHL1* и *VIM* методом GLAD-ПЦР с последующим ROC-анализом результатов, полученных для образцов ДНК из опухолевых и здоровых тканей, позволил определить диагностическую ценность исследованных маркеров КРР (таблица 1).

Таблица 1. Результаты ROC-анализа данных, полученных методом GLAD-ПЦР

Ген	Чувствительность, %	Специфичность, %	ППК (стандартная ошибка)
FBN1(3.3)	95.2	100	0.976 (0.024)
FBN1(3.1)	95.2	100	0.971 (0.029)
CNRIP1	76.2	100	0.952 (0.036)
ADHFE1	85.7	100	0.915 (0.055)
FBN1(2)	90.5	88.9	0.902 (0.065)
FBN1(1)	81.0	100	0.884 (0.062)
SDC2	71.4	100	0.873 (0.058)
UCHL1	61.9	100	0.870 (0.068)
SEPT9	76.2	100	0.862 (0.067)
VIM	71.4	100	0.862 (0.056)
THBD	71.4	100	0.841 (0.058)
SOCS3	61.9	100	0.825 (0.074)
RXRG	57.1	100	0.778 (0.085)
EID3	85.7	77.8	0.778 (0.103)
SFRP2	71.4	88.9	0.772 (0.099)
ELMO1	57.1	100	0.757 (0.089)
ESR1	57.1	88.9	0.730 (0.097)
TMEFF2	71.4	88.9	0.714 (0.114)
RYR2	81.0	66.7	0.704 (0.115)
NGFR	52.4	88.9	0.667 (0.108)
LAMA1	33.3	100	0.651 (0.106)
ALX4	57.1	88.9	0.646 (0.112)
HLTF	42.9	100	0.550 (0.106)
RARB	52.4	66.7	0.550 (0.114)
SOX17	66.7	55.6	0.548 (0.127)
NEUROG1	47.6	88.9	0.540 (0.110)

Сравнительная информативность онкомаркеров с наиболее высокими показателями чувствительности и специфичности (ППК > 0.8) может быть охарактеризована следующим образом: *FBN1* (вариант 3.3) > *FBN1* (вариант 3.1) = *CNRIP1* > *ADHFE1* > *FBN1*(2) > *FBN1*(1) > *SDC2* > *UCHL1* > *SEPT9* = *VIM* > *THBD* > *SOCS3*.

Заключение. Разработанный нами ранее метод GLAD-ПЦР был применен для поиска эпигенетических маркеров КРР – сайтов R(5mC)GY в регуляторных областях ряда генов. Следующим этапом работы будет формирование панели перспективных онкомаркеров для GLAD-ПЦР анализа препаратов ДНК из крови пациентов с целью разработки относительно простого и доступного метода лабораторной диагностики КРР.

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ СКРИНИНГА КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

Перфильева А.В., Абдикерим С., Кузовлева Е.Б., Жунусова Г.С., Хусаинова Э.М., Афонин Г.А., Бекманов Б.О., Джансугурова Л.Б.

Институт общей генетики и цитологии КН МОН РК, Алматы, Казахстан
Казахский национальный медицинский университет имени С.Д. Асфендиярова, Алматы, Казахстан
Алматинский онкологический центр, Алматы, Казахстан

Введение. В Казахстане колоректальный рак (КРР) занимает 4 место в структуре заболеваемости среди всех онкопатологий и 3 место в структуре смертности. Важнейшим условием успешного лечения КРР является обнаружение опухолевого процесса на ранних стадиях. Диагностическое и прогностическое значение в решении этой проблемы может иметь эпигенетическое метилирование ключевых генов колоректального канцерогенеза.

Цель и задачи. Целью настоящего исследования было изучение ассоциации статуса метилирования генов p16, SEPT9, *APC, MLH1* и *RASSF1A*, участвующих в регуляции клеточного цикла, апоптоза клеток и репарации ДНК, с риском развития КРР.

Материалы и методы. Всего для исследования было собрано 50 образцов опухолевой ткани больных спорадическим КРР, из них у 16 пациентов одновременно с биопсией опухолевой ткани взяты образцы периферической непораженной ткани кишечника и у 26 - периферическая кровь. Для контрольной группы в максимально возможном соответствии с анкетными данными больных КРР по критериям национальности, возраста, пола и наличию вредных привычек были отобраны образцы периферической крови 30 условно здоровых лиц. ДНК из клинического материала выделяли с использованием набора для быстрого выделения ДНК «ДНК-СОРБ-В» (АмплиСенс, Россия). Для определения метилирования промоторной области генов был использован метод метил-чувствительной и метил-специфичной ПЦР.

Основные результаты. Частота метилирования промотора 1А генов APC и *RASSF1A* в образцах опухолевых тканей больных КРР составила 4% и 10%, соответственно; в образцах непораженных тканей кишечника от онкобольных, в периферической крови от онкобольных и условно здоровых людей контрольной группы метилирование данных генов не было обнаружено. Частота метилирования генов *MLH1, p16* и *SEPT9* в образцах опухолевой ткани больных КРР составила 30%, 52% и 60%, в образцах гистологически нормальной периферической ткани кишки - 12,5%, 81% и 81% в периферической крови больных КРР - 4%, 31% и 58%, соответственно. В ДНК крови представителей контрольной группы метилирование генов *p16* и *SEPT9* было определено в 3% и 30% случаев, соответственно; метилирование промотора гена *MLH1* обнаружено не было.

Заключение и выводы. Статистический анализ диагностических характеристик свидетельствует о высокой специфичности тестов на метилирование генов *APC* (100,00%), *MLH1* (87,50%) и *RASSF1A* (100,00%) в ткани кишечника и генов *p16* (96,67%), *APC* (100,00%), *MLH1* (100,00%) и *RASSF1A* (100,00%) в периферической крови для диагностики КРР. Сравнительно высокий уровень чувствительности показали тесты на метилирование генов *p16* и *SEPT9* для выявления КРР в ткани кишечника - 52,00% и 60,00% и в периферической крови 30,77% и 57,69%, соответственно. Оптимальным соотношением чувствительности и специфичности обладал тест на метилирование гена *SEPT9* в крови пациента (57.69% и 70.00 %, соответственно).

При анализе кумулятивного эффекта выявлена диагностическая эффективность при обнаружении в периферической крови пациента метилирования любых двух генов из пяти изученных: степень риска КРР возрастала до 8,70 (p=0,05), чувствительность теста составляла 23,00%, специфичность - 96,67%.

Таким образом, разработка и внедрение тестов на метилирование генов, участвующих в ключевых клеточных процессах, могут повысить диагностическую эффективность существующей системы скрининга КРР.

Список используемой литературы

1. Нургазиев К.Ш., Байпеисов Д.М., Ауэзова Э.Т., Жылкайдарова А.Ж., Сейсенбаева Г.Т. Показатели онкологической службы РК за 2014 год (статистические материалы). - Алматы, 2015. - С. 76-138.

2. Robertson K.D., Jones P.A. DNA methylation: past, present and future directions // Carcinogenesis. - 2000. - Vol. 21(3). - P. 461-467.

3. Segditsas S., Sieber O.M., Rowan A., Setien F., Neale K., Phillips R.K., et al. Promoter hypermethylation leads to decreased APC mRNA expression in familial polyposis and sporadic colorectal tumours, but does not substitute for truncating mutations // Exp Mol Pathol. - 2008. - Vol. 85. - P. 201–206.

4. Dimberg J., Hong T.T., Skarstedt M., Löfgren S., Zar N., Matussek A. Analysis of APC and IGFBP7 promoter gene methylation in Swedish and Vietnamese colorectal cancer patients // Oncol Lett. - 2013. - Vol. 5(1). - P. 25-30.

5. Ding Z., Jiang T., Piao Y., Han T., Han Y., Xie X. Meta-analysis of the association between APC promoter methylation and colorectal cancer // Onco Targets Ther. - 2015. - Vol. 19(8). - P. 211-222.

6. Li X., Yao X., Wang Y., Hu F., Wang F., Jiang L., Liu Y., Wang D., Sun G., Zhao Y. MLH1 promoter methylation frequency in colorectal cancer patients and related clinicopathological and molecular features // PLoS One. - 2013. - Vol. 8(3). - e59064. doi: 10.1371.

7. Hesson L.B., Cooper W.N., Latif F. The role of RASSF1A methylation in cancer // Dis Markers. - 2007. - Vol. 23. - P. 73–87.

8. Grützmann R., Molnar B., Pilarsky C., Habermann J.K., Schlag P.M., et al. Sensitive detection of colorectal cancer in peripheral blood by Septin 9 DNA methylation assay // PLoS ONE. - 2008. - V. 3. - P. 1–8.

9. Church T.R., Wandell M., Lofton-Day C., Mongin S.J., Blumenstein B.A., Allen J.I., Roesch T., Osborn N., Snover D., Day R., Ransohoff D.F. Prospective clinical validation of an assay for methylated SEPT9 DNA in human plasma as a colorectal cancer screening tool in average risk men and women 50 years and older // Digestive Disease Week. - 2010. - P. 1-5. - LB-711d.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ МЕЖДУ ОПУХОЛЬЮ И ЕЁ МЕТАСТАЗАМИ В ПЕЧЕНИ ПРИ МЕТАСТАТИЧЕСКОМ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ

Шубин В.П., Пономаренко А.А., Шелыгин Ю.А., Кашина И.Ю., Майновская О.А., Рыбаков Е.Г., Фролов С.А., Поспехова Н.И., Цуканов А.С.

ФГБУ «ГНЦК им. А.Н. Рыжих» Минздрава России, г. Москва, Россия

Введение. Наличие в пределах одной опухоли малигнизированных клеток с различными биологическими характеристиками принято обозначать внутриопухолевой гетерогенностью. О понятии, внутриопухолевая гетерогенность известно еще с 70-х годов XX века. В журнале Science опубликована статья «The clonal evolution of tumor cell populations», в которой предполагается, что большинство новообразований возникают из одной клетки и, в результате генетической изменчивости в пределах первоначального клона, развиваются из более генетически неустойчивых субпопуляций клеток. В исследовании, Sadanandam и соавтр., показано, что из разных клеток либеркюновой крипты может развиться несколько подтипов опухолей с разным ответом на химио- и таргетную терапию. Предложена классификация колоректального рака в которую входят 6 молекулярных подтипов. «Стволовоподобный» («stem-like») подтип характеризуется высоким уровнем экспрессии гена *SFRP2*. «Воспалительный» («inflammatory») подтип – высоким уровнем экспрессии гена *RARRES*. «Транзит-усиливающий» («transit-amplifying» (TA)) подтип, который в свою очередь делится на «цетуксимаб-резистентный» (CR-TA) и «цетуксимаб-чувствительный» (CS-TA) характеризуется изменением экспрессии генов *CFTR*, *FLNA*. Причем уровень экспрессии *CFTR* повышен как при «цетуксимаб-резистентном», так и «цетуксимаб-чувствительном» подтипе, а *FLNA* повышен только при «цетуксимаб-резистентном». «Бокаловидноподобный» («goblet-like») подтип имеет высокий уровень экспрессии генов *MUC2*, *TFF3*. У «Энтероцитного» («enterocyte») подтипа биомаркеры такие же, как и при «бокаловидноподобном». Однако отличается пониженным уровнем экспрессии гена *TTF3*.

Цель и задачи. Изучить экспрессию генов (*ZEB1*, *ZEB2*, *VIM*, *CDH1*, *SFRP2*, *FOXQ1*, *TNC*, *MACC1*, *PLS3*, *CFTR*, *FLNA*, *MUC2*, *TFF3* и *RARRES3*), мутационный статус генов *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* в опухолях толстой кишки и их метастазах в печени (МТС) у пациентов с метастатическим колоректальным раком (мКРР) и определить уровень молекулярной гетерогенности.

Материалы и методы. Сбор образцов и анализ данных пациентов проводился в Государственном научном центре колопроктологии им. А.Н. Рыжих в период с 2013 по 2016 год. Критериями исключения пациентов являлись предоперационная химио- и лучевая терапия. В исследование было взято 120 образцов операционного материала от 40 пациентов с мКРР (1 – гистологически неизменённая слизистая толстой кишки; 2 – ткань КРР; 3 – ткань узла МТС). В ходе исследования выполнялось: выделение РНК, реакция обратной транскрипции, ПЦР в реальном времени, анализ первичных данных. Фрагменты генов *KRAS* (2-4 экзоны), *NRAS* (2-4 экзоны), *BRAF* (15 экзон), *PIK3CA* (9 и 20 экзоны) амплифицировали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Выявление мутаций в генах проводили на автоматическом секвенаторе по методу Сэнгера.

Основные результаты. В результате проведенного исследования, мы классифицировали опухоли и МТС по Sadanandam. В 40% (16/40) и в 48% (19/40) случаев опухоли и метастазы, соответственно, классифицировать не удалось. Из 60% (24/40) опухолей 7 имели «стволовоподобный подтип» (СтП), 1 – «воспалительный подтип» (Восп), 10 – «цетуксимаб-резистентный» подтип (ЦетРез), 6 – «цетуксимаб-чувствительный» подтип (ЦетЧувс), 5 – «бокаловидноподобный» подтип (БоклП, 1 – «энтероцитный» подтип (Энтц). При анализе данных опухоли смешанный подтип обнаружен в 7 образцах.

В МТС «СтП» обнаружен в 8 случаях, «Восп» в 1 случае, «ЦетРез» в 11 случаях, «ЦетЧувс» в 4 случаях, «БоклП» в 2 случаях. «Энтц.» подтип в МТС не обнаружен. Смешанный подтип имели 5 МТС.

Совпадение подтипа опухолей и их метастазов в печени среди неклассифицированных образцов по опухоли – 11 из 16 (69%), среди классифицированных – 11 из 24 (46%).

Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) обнаружен в 1 опухоли и 7 метастазах у 8 пациентов.

Мутаций в генах *NRAS* и *BRAF* среди 40 образцов опухолей и синхронных МТС не обнаружено. Общая частота мутаций во всех образцах опухолей гена *KRAS* составила 18/40 (45%), гена *PIK3CA* – 9/40 (23%) и совпала с частотой мутаций этих же генов в соответствующих МТС. В связи с этим, мы провели анализ распределения частоты и типов мутаций только по совмещенным данным опухолей и метастазов. Среди 11 неклассифицированных образцов частота мутаций в гене *KRAS* составила 4/11 (36%) и в гене *PIK3CA* - 3/11 (27%). Среди классифицированных образцов частота мутаций в *KRAS* составила 14/29 (48%) и *PIK3CA* 6/29 (21%). Среди 8 ЭМП-позитивных образцов частота мутаций в гене *KRAS* составила 6/8 (75%) и *PIK3CA* 1/8 (13%). Самая высокая частота мутаций в гене *KRAS* 6/8 (75%) обнаружена среди ЭМП-позитивных образцов, однако статистически достоверных отличий нет, что обусловлено размером выборки.

Заключение. Применение классификации по Sadanandam на мКРР позволило классифицировать опухоли и их МТС в печени, но не для всех случаев. Совпадение между подтипами опухолей и их МТС среди классифи-

цированных образцов составило 54%. Неклассифицированные опухоли и МТС совпали в 31% образцов. Наличие эпителиально-мезенхимального перехода характерно для МТС в печени. Полученные данные указывают на высокую молекулярную гетерогенность опухоли и её МТС на экспрессионном уровне и низкую на мутационном. Полученные данные могут быть использованы для оптимизации лечения метастатического колоректального рака.

Список используемой литературы.

1. Sadanandam A, Lyssiotis CA, Homicsko K, Collisson EA, Gibb WJ, Wullschleger S, Ostos LC, Lannon WA, Grotzinger C, Del Rio M, Lhermitte B, Olshen AB, Wiedenmann B, Cantley LC, Gray JW, Hanahan D. A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. Nat Med. 2013 May;19(5):619-25.

2. Shelygin Y.A., Pospekhova N.I., Shubin V.P., Kashnikov V.N., Frolov S.A., Sushkov O.I., Achkasov S.I., Tsukanov A.S. Epithelial-Mesenchymal Transition and Somatic Alteration in Colorectal Cancer with and without Peritoneal Carcinomatosis BioMed Research International. 2014. T. 2014. C. 629496.

ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ГЕКСОКИНАЗ И ЕНОЛАЗ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Кудрявцева А.В., Пудова Е.А., Дмитриев А.А., Федорова М.С., Садритдинова А.Ф., Краснов Г.С., Снежкина А.В.

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

Введение. Одной из универсальных характеристик злокачественных новообразований является нарушение энергетического обмена [1,2]. В большинстве случаев происходит переключение с митохондриального дыхания на гликолиз, протекающий в цитоплазме, и его активация [3]. Причины и механизмы активации гликолиза в опухолевых клетках остаются до сих пор не полностью выявленными [3,4]. Некоторые гены, кодирующие ферменты гликолиза, демонстрируют опухоль-специфическую активацию или инактивацию [4,5,6]. Для разных видов рака нарушения экспрессии могут затрагивать различный набор генов.

Цель. Цель данной работы - проведение сравнительной оценки экспрессии генов, кодирующих семейства ферментов гексокиназ и енолаз при раке молочной железы.

Материалы и методы. Проанализированы 30 парных образцов больных РМЖ I-III стадий. Для оценки изменений экспрессии генов проводили количественную ПЦР в режиме реального времени с использованием наборов праймеров и зондов TaqMan Assays (Thermo Fisher Scientific, США). Каждую реакцию проводили в трех технических повторностях на приборе Applied Biosystems 7500 RealTime PCR System (Thermo Fisher Scientific, США). В качестве контрольного гена использовали *B2M*. Для математической обработки данных ПЦР-РВ применяли программу «АТГ» («Анализ Транскрипции Генов», Свидетельство № 2008612585, 2008, Роспатент, РФ). Использовали ΔΔCt-метод и учитывали эффективности всех реакций. Достоверность наблюдаемых изменений оценивали при помощи непараметрического теста Уилкоксона. Данные считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты. Методом количественной ПЦР оценили относительный уровень мРНК генов *HK1, HK2, HK3, ENO1, ENO2, ENO3* в 30 образцах рака молочной железы. Для гена *HK1* в большинстве случае наблюдалось сохранение уровня экспрессии. Повышение уровня экспрессии до 4,5 раз выявлено в 25% образцов, понижение до 2 раз в 10% образцов. Взаимосвязь относительного уровня мРНК гена *HK1* со стадией заболевания не обнаружена. Для гена *HK2* большинстве случае также наблюдалось сохранение уровня экспрессии, в 25% образцов - понижение экспрессии до 10 раз, в 15% - повышение до 4,6 раз. Однако для гена *HK2*, как и для гена *HK1*, не выявлено корреляции относительного уровня мРНК со стадией заболевания. Для гена *HK3* профиль экспрессии при раке молочной железы значительно отличался от профилей генов HK1 и HK2. Повышение в уровня мРНК гена HK3 до 8,6 раз было обнаружено в 40% образцов и явилось преобладающим событием. Снижение уровня экспрессии до 6,3 раз наблюдалось в 15% образцов. Уровень экспрессии гена *ENO1* в большинстве случаев сохраняется, в 16% образцов повышен до 18 раз. Сохранение уровня экспрессия гена *ENO2* наблюдалось в половине образцов, повышение до 22 раз и понижение до 30 раз обнаружено в 23% и 27% образцов соответственно.

Было обнаружено, что уровень экспрессии гена *ENO3* значительно отличается от профилей генов *ENO1* и *ENO2*. Повышение уровня до 26 раз было отмечено в 42% образцов, понижение до 67 раз наблюдалось в 20,7% образцов.

Заключение. Показано, что в развитии рака молочной железы важную роль играет нарушение экспрессии генов, кодирующих ферменты семейств гексокиназ и енолаз. Наибольшие изменения экспрессии выявлены для *HK3* и *ENO3*. Их активация происходит уже на ранних стадиях развития рака.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и правительства города Москвы (грант № 15-34-70035 мол-а-мос).

Список используемой литературы

1. H. Sawayama, T. Ishimoto, H. Sugihara, et al., Int. J. Oncol. 45 (4), 1345 (2014).

2. G. S. Krasnov, A. A. Dmitriev, V. A. Lakunina, et al., Expert Opin. Ther. Targets 17 (10), 1221 (2013).

3. G. S. Krasnov, A. A. Dmitriev, A. V. Snezhkina, and A. V. Kudryavtseva, Expert Opin. Ther. Targets 17 (6), 681 (2013)

4. A. Marin-Hernandez, J. C. Gallardo-Perez, S. J. Ralph, et al., Mini Rev. Med. Chem. 9 (9), 1084 (2009).

5. R. A. Gatenby and R. J. Gillies, Int. J. Biochem. Cell Biol. 39 (7–8), 1358 (2007).

6. P. Zancan, M. Sola-Penna, C. M. Furtado, and D. Da Silva, Mol. Genet. Metab. 100 (4), 372 (2010).

АНАЛИЗ КЛИНИЧЕСКОГО ЭКЗОМА РАКА ЖЕЛУДКА

Кекеева Т.В.[1,2,3], Хашимов Л.Х.[3], Лядов В.К.[1,3], Танас А.С.[2], Андреева Ю.Ю.[3], Завалишина Л.Э.[3], Поддубная И.В.[3], Стрельников В.В.[2], Залетаев Д.В.[2,4], Франк Г.А.[3]

[1]ФГАУ Лечебно-реабилитационный центр Минздрава России, Москва, Россия
[2] ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва, Россия
[3] ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздрава России, Москва, Россия
[4]ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России, Москва, Россия

Идентификация соматических генетических изменений в опухолях несет потенциальную диагностическую и прогностическую информацию о драйверных мутациях и сведения, позволяющие более обоснованно выбрать схему химиотерапевтического лечения для пациентов. Секвенирование клинического экзома уже зарекомендовало себя как высокоэффективный метод поиска мутаций. В исследовании проведен анализ соматических опухолевых изменений в клиническом экзоме, включающем 4813 генов, у 18 пациентов с раком желудка (РЖ). Двухконцевое секвенирование парных образцов опухоли и нормальной ткани выполнено на приборе Nextseq500 набором «TruSight One Sequencing Panel» (Illumina). Обнаружены 102 различных соматических мутации, все они являлись однонуклеотидными заменами, их них 30 являлись синонимичными заменами, 66 несинонимичными и 6 нонсенс-мутациями. Проанализировано 82 новых мутации, из них 10 мутаций локализованы в генах, участвующих в патогенезе РЖ. Обнаружены соматические мутации известной клинической значимости и предположительно драйверные мутации. Дальнейшие функциональные исследования с последующим длительным наблюдением за пациентом позволят установить значимость найденных мутаций.

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ИММУННОГО ОТВЕТА И АКТИВНОСТИ СЫВОРОТОЧНОЙ ТИМИДИНКИНАЗЫ В ДЕБЮТЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ И МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ

Назарова Е.Л., Шардаков В.И., Наговицина А.С., Зотина Е.Н., Докшина И.А., Крюкова М.Г.

ФГБУН «Кировский НИИ гематологии и переливания крови ФМБА России», Киров, Россия

Введение. Имеющиеся немногочисленные данные о маркерах пролиферативной активности опухолей лимфатической системы акцентируют внимание на изучении внутриклеточного фермента тимидинкиназы (ТК), который характеризует функциональные свойства клеток, особенно при их переходе из фазы покоя в фазу деления. Исследования последних лет показали, что повышенная активность сывороточной ТК обладает прогностическим значением, поскольку коррелирует с высоким риском прогрессирования злокачественных новообразований. Это связано с тем, что ТК не присутствует в здоровых, неделящихся клетках, поскольку в них имеется специальный механизм разрушения белка, в котором клетки больше не нуждаются. При злокачественных новообразованиях повышение активности фермента коррелирует с прогрессирующим течением и продвинутыми стадиями болезни, а также у пациентов с более коротким периодом беспрогрессивной выживаемости. Интересны результаты, полученные C. Magnac и соавт. (2003), согласно которым, существует высоко корреляционная связь при хроническом лимфолейкозе между активностью ТК и вариантом мутационного статуса генов IgVH.

Цель и задачи. Целью исследования являлась оценка связи мутационного статуса генов иммунного ответа с активностью ТК в сыворотке больных множественной миеломой (ММ) и хроническим лимфолейкозом/лимфомой из малых лимфоцитов (ХЛЛ/ЛМЛ) в момент постановки диагноза.

Для реализации поставленной цели проводился анализ полиморфизма генов в 20 локусах 13 генов иммунного ответа (*TLR2, 3, 4, 6, 9, IL1β, IL2, IL6, IL10, IL17A, CD14, TNFa, FCGR2A)* и уровня сывороточной ТК у больных с впервые выявленными ММ и ХЛЛ/ЛМЛ.

Материалы и методы. В первые двое суток стационарного наблюдения, после подтверждения диагноза у 21 больного ММ и ХЛЛ/ЛМЛ проводили забор венозной крови. Генотипирование полиморфных участков генов иммунного ответа осуществляли методом полимеразной цепной реакции с аллель-специфичными праймерами (НПФ «Литех», г. Москва) комплекта реагентов «SNP-экспресс», на амплификаторе «Терцик» (ООО «ДНК технология», г. Москва) и с электрофоретической детекцией продуктов реакции в агарозном геле. Активность ТК в сыворотке периферической крови определяли методом радиоферментного анализа с использованием комплекта реагентов производства «Immunotech» (Чехия) на радиоиммунохимической установке «АРИАН» (Россия). Распределение генотипов по исследуемому полиморфному локусу проверяли на соответствие равновесию Харди-Вайнберга с помощью точного теста Фишера. Для сравнения частот аллелей между различными группами использовали критерий χ^2 Пирсона с поправкой Йэйтса на непрерывность. Дополнительно оценивали показатель отношения шансов – odds ratio (OR) с вычислением границ 95%-го доверительного интервала (95%CI). Нормальность распределения количественных показателей определяли с использованием критерия Колмогорова-Смирнова. В случае нормального распределения выборки рассчитывали среднюю арифметическую (M), при его отсутствии - медиану (Me), верхний и нижний квартили (Q1 и Q3), а также применяли методы сравнения выборок (U - критерий Манна-Уитни). Для расчета результатов использовали па-

кеты программ MS Office Excel 2003 STATISTICA V.12, а также «Калькулятор для расчета статистики в исследованиях «случай-контроль» (http:gen-exp.ru/calculator_or.php). Статистически значимыми считали различия при p<0,05.

Основные результаты. Были выделены две группы пациентов в зависимости от величины активности ТК в сыворотке периферической крови - 7 Ед/л, т.к. в здоровом организме данный фермент присутствует в незначительных количествах и обычно не превышает указанный критический уровень [Е.Н. Зотина, 2015]. В первую вошли четверо (19,0%) больных (медиана ТК - 4,74 Ед/л; 4,76-6,78), вторую составили 17 (81,0%) обследованных (медиана ТК - 20,47 Ед/л; 16,78-26,27). Найдено, что с повышением активности ТК в сыворотке периферической крови ассоциировано наличие в генотипе больных мутантных аллелей Т гена *TLR4* в позиции Thr399Ile (OR=8,17; 95%CI: 0,88-76,15; χ^2=4,24; p=0,04) и мутантного гомозиготного гаплотипа АА в полиморфном локусе G-197A гена *IL17A* по сравнению с присутствием аллелей «дикого» типа (OR=16,00; 95%CI: 0,96-267,05; χ^2=5,15; p=0,02).

Заключение/выводы. Таким образом, присутствие мутантных аллелей в интроне гена *IL17A* (G-197A) и в третьем экзоне гена *TLR4* (Thr399Ile) может быть отражением высокой пролиферативной активности опухолевых клеток при ХЛЛ/ЛМЛ и ММ, а также являться суррогатным маркером прогностически неблагоприятного течения данных заболеваний наряду с повышенной активностью сывороточной ТК уже в дебюте опухолевого процесса.

АНАЛИЗ ЧАСТОТЫ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ У ПАЦИЕНТОВ С ПЛОСКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ РОТОВОЙ ПОЛОСТИ

Голуб Е.В., Полькин В.В., Михайлова Г.Ф., Медведев В.С.

МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, Обнинск, РФ

Введение. Широко распространено мнение, что онкогенез полости рта это результат кумулятивных цитогенетических изменений, вызывающих постепенный переход от нормальной дисплазии слизистой оболочки к инвазивной карциноме. В процессе этого перерождения происходят численные и структурные цитогенетические изменения, которые включают нарушение числа хромосом и генов. Проявление анеуплоидии при плоскоклеточном раке полости рта довольно высоко и наблюдается до 80% случаев. Причем доля не диплоидных клеток увеличивается со степенью тяжести гистологического диагноза (Bockmuhl, 2002; Pektas, 2006). В контрольных образцах пороговое значение анеуплоидных клеток в среднем определили как 1,1% (Abraham Hirshberg, 2007). В патогенезе плоскоклеточного рака ротовой полости принимают участие такие онкогены как EGFR, ERBB2, CCND1, VEGFA, MYC. Увеличение частоты этих генов в клетке способствует аномальной пролиферации. Игнорируя контрольные точки клеточного митоза, они предотвращают апоптоз, что приводит к выживаемости клеток с нарушениями.

Цель и задачи. Целью исследования было выявление анеуплоидии и нарушений частоты генов EGFR и CCND1 в опухолевых клетках при плоскоклеточном раке ротовой полости.

Материалы и методы. Исследование проведено методом I-FISH. Использовали зонды фирмы Kreatech на локусы 7p12 (ген EGFR) и 11q13 (ген CCND1) и на центромеры (CEP) хромосом 7, 11 для определения их плоидности. Опухолевые клетки снимали щеточкой до начала терапии и помещали в раствор PBS. В дальнейшем суспензию клеток проводили через фиксатор (метанол+ледяная уксусная кислота в соотношении 3:1). Осадок наносили на предметное стекло и окрашивали по методике, рекомендованной фирмой Kreatech. Обследовали 20 пациентов с диагнозом плоскоклеточный рак ротовой полости различной степени тяжести и места локализации. У 7 из них проведено молекулярно-цитогенетическое исследование образцов ткани со стороны, противоположной опухоли (внутренний контроль). В качестве чистого контроля проанализированы образцы слизистой 3-х здоровых человек.

Результаты. При исследовании 3-х контрольных образцов выявлено до 1,5% клеток с увеличением копий генов EGFR и CCND1. В образцах внутреннего контроля частота клеток с нарушением числа генов EGFR и CCND1 варьировала в диапазоне от 1,0% – 8,3% и от 1,5% – 7,0%, соответственно. Причем отмечалось в основном повышение копийности указанных генов. В образцах опухолевой ткани всех пациентов, частота клеток с отличием от дуального числа генов наблюдалась достоверно выше (p <0,01) контрольного уровня, варьируя в диапазонах от 5,0% – 71,5% для гена EGFR и от 5,5% – 73,0% для гена CCND1. При этом не выявлено четкой зависимости частоты клеток с нарушением копийности генов от стадии опухоли. Основным нарушением было увеличение числа копий исследованных генов. У 4-х пациентов с различной стадией опухоли обнаружены клетки с высокой амплификацией генов. У 3-х из них выявлено 5%, 6% и 72% клеток с амплификацией только гена CCND1. Еще у одного наблюдалось 18% клеток с амплификацией гена CCND1 и 3% – с амплификацией гена EGFR.

Во всех исследованных образцах выявлены также клетки с потерей второго гена EGFR и CCND1. В образцах чистого контроля частота этих клеток не превышала 1,5%. В более широком диапазоне варьировала частота клеток с потерей генов в образцах внутреннего контроля – от 0 до 6,8% для EGFR и от 0 до 6,5% для CCND1. Частота аналогичных клеток в опухолевой ткани варьировала в диапазоне от 0 – 4,4% с отсутствием гена EGFR и от 0 – 3,4% с отсутствием гена CCND1, что отдельных случаях достоверно (p <0,01) превышало контрольный уровень.

При анализе плоидности хромосом 7 и 11 в чистых контрольных образцах слизистой ткани ротовой полости наблюдались только клетки с потерей второй центромеры, частота которых не превышала 0,5% (CEP11). В образцах внутреннего контроля клетки с потерей второй центромеры не превышали 1,5% для EGFR и 2,5% для CCND1. В опухолевых образцах выявлены клетки как с потерей, так и с

повышением числа центромер. Частота клеток с потерей CEP7 и CEP11 варьировала в диапазоне от 0 – 5% и от 0 – 2,6%, соответственно, а с повышенным числом варьировала в диапазоне от 3% – 71% и от 0,5 – 71,5%, соответственно.

Заключение. Таким образом, полученные результаты показывают, что большая вариабельность данных по всем позициям требует дополнительных исследований и индивидуального подхода для каждого пациента. Несмотря на то, что анеуплоидия свидетельствует о нестабильности генома, более показательным маркером при патогенезе плоскоклеточного рака ротовой полости, очевидно, является увеличение копийности генов EGFR и CCND1.

КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПАПИЛЛЯРНОГО РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ НАЛИЧИИ МУТАЦИИ В «ГОРЯЧЕЙ ТОЧКЕ» 15 ЭКЗОНА ГЕНА *BRAF*

Маньковская С.В., Фридман М.В.

Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь
Минский городской клинический онкологический диспансер, Беларусь

Папиллярный рак щитовидной железы (ПРЩЖ) относится к наиболее распространенным злокачественным опухолям эндокринной системы. В последние десятилетия отмечается увеличение количества случаев данного заболевания во многих странах, что обуславливает повышенный интерес к изучению фундаментальных и прикладных аспектов этой патологии. Известно, что мутация *T1799A* в «горячей точке» 15 экзона гена *BRAF* (*BRAF*^{T1799A}) играет важную роль в патогенезе папиллярной тиреоидной карциномы.

Задача исследования. Оценить частоту мутации *T1799A* в гене *BRAF* у пациентов, страдающих ПРЩЖ, и проанализировать клинические и морфологические характеристики карциномы в зависимости от мутационного статуса исследуемого гена.

Материалы и методы. После получения добровольного информированного согласия в исследование включено 90 пациентов (34 мужчин и 56 женщин, соотношение по полу м:ж = 1:1,6), находившихся на лечении по поводу ПРЩЖ в период с 2000 по 2008 гг. Средний возраст в этой группе составил 26,8±14,2 лет. Поиск мутации в «горячей точке» 15 экзона гена *BRAF* в ДНК, выделенной из удаленной опухолевой ткани, проводился с помощью метода прямого секвенирования по Сэнгеру. Для сравнения по распределению качественных признаков применяли двусторонний точный тест Фишера или тест Пирсона-Фишера, а для количественных – тест Манна–Уитни. Результаты сравнения считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Основные результаты. Мутация *BRAF*^{T1799A} была выявлена в 28 (31,1%) наблюдениях. Сравнительный анализ клинических и морфологических характеристик у пациентов с различным статусом гена *BRAF* показал **отсутствие** связи вышеуказанного молекулярного нарушения с полом, локализацией опухоли, сопутствующей фоновой патологией, наличием метастазов в лимфатических узлах шеи и отдаленных органах (Таблица).

Таблица. Клинико-морфологическая характеристика папиллярной тиреоидной карциномы при различном структурном состоянии 15 экзона гена *BRAF* в опухолевых клетках

Характеристики	ПРЩЖ		p
	Наличие *BRAF*^{T1799A} n=28 (100%)	Отсутствие *BRAF*^{T1799A} n=62 (100%)	
Возраст на момент операции, (средний±SD), лет	37,8±13,8	21,8±11,3	**< 0,0001**[a]
Мужской пол	8 (28,6)	26 (41,9)	0,7477[b]
Размер опухолевого узла*, мм			0,0726[a]
медиана	10,0	14,5	**0,0180**[b]
≤10	16 (57,1)	18 (29,0)	
≥11	12 (42,9)	44 (71,0)	
Локализация*			0,2339[c]
под капсулой	13 (46,4)	40 (64,5)	
внутри доли	12 (42,9)	19 (30,7)	
в перешейке	3 (10,7)	3 (4,8)	
Мультифокальный рост	8 (28,6)	6 (9,8)	**0,0302**[b]
Стадия pT3-T4	13 (46,4)	38 (61,3)	0,2512[b]

Характеристики	ПРЩЖ		p
	Наличие *BRAF*^{T1799A} n=28 (100%)	Отсутствие *BRAF*^{T1799A} n=62 (100%)	
при размере опухолевого узла ≤10 мм	8	9	**0,0188**[b]
Регионарные метастазы, N1	19 (67,8)	50 (80,6)	0,1919[b]
Отдаленные метастазы, M1	0	8 (9,7)	0,0538[b]
Доминирующая архитектоника			**< 0,0001**[c]
папиллярная	24 (85,7)	21 (33,9)	
фолликулярная	4 (14,3)	26 (41,9)	
солидная	0	15 (24,2)	
Вариант карциномы			**0,0029**[c]
классический	20 (71,4)	26 (41,9)	
фолликулярный	2 (7,2)	12 (19,5)	
диффузно-склеротический	0	10 (16,1)	
высококлеточный	3 (10,7)	2 (3,2)	
солидный	0	10 (16,1)	
онкоцитарный	3 (10,7)	2 (3,2)	
Особенности стромы			0,0874[c]
рассеянные очаги фиброза	0	9 (14,5)	
склероз междольковых перегородок	11 (39,3)	20 (32,3)	
массивные отложения в центре опухоли	6 (21,4)	21 (33,9)	
Инвазия кровеносных сосудов	0	10 (16,1)	**0,0277**[b]
Инвазия лимфатических сосудов	14 (50,0)	49 (79,0)	**0,0118**[b]
Фоновая патология	8 (28,6)	11 (17,7)	0,2723[b]
аутоиммунный тиреоидит	2	8	
фолликулярная аденома	4	0	
узловой зоб	2	3	

Примечание 1 – * при многофокусном росте в расчет принимались значения для опухолевого узла наибольшего размера.
Примечание 2 – [a] тест Манна-Уитни; [b] тест Фишера; [c] тест Пирсона-Фишера.

Установлено, что пациенты с *BRAF-позитивным* раком были старше, чем пациенты с *BRAF-негативным* ($p < 0,0001$), у них чаще наблюдался мультифокальный рост опухоли ($p = 0,0302$) и размер опухоли был меньше (микрокарцинома чаще выявлялась у пациентов с *BRAF-позитивным* раком, чем с *BRAF-негативным* (57,1% и 29,0% соответственно; $p = 0,0180$)), но с более высокой частотой экстратиреоидного распространения ($p = 0,0188$).

Кроме того, обнаружены некоторые существенные различия в архитектонике папиллярной карциномы с различным статусом гена *BRAF*. Активирующая мутация в гене *BRAF* чаще выявлялась при классическом ПРЩЖ и отсутствовала при диффузно-склеротическом или солидном ($p = 0,0029$) вариантах строения. Обратим внимание также на отсутствие инвазии кровеносных сосудов и более низкую частоту инвазии лимфатических сосудов при *BRAF-позитивном* раке по сравнению с *BRAF-негативным* ($p = 0,0277$ и $p = 0,0118$).

Выводы. *BRAF-позитивные* карциномы демонстрируют некоторые признаки агрессивного биологического поведение, например, наклонность к мультифокальному росту и инвазию за пределы капсулы щитовидной железы при малых размерах опухолевого узла (≤ 10 мм). Дальнейшее изучение взаимосвязи мутации *BRAF*^{T1799A} с клинико-морфологическими характеристиками ПРЩЖ позволит четче установить диагностическое и прогностическое значение данного молекулярного события.

ДНК-МАРКЕРЫ В КРОВИ ПРИ РАКЕ ЛЕГКОГО: ИЗМЕНЕНИЕ СТАТУСА МЕТИЛИРОВАНИЯ LINE-1 В ОТВЕТ НА ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ ЛЕЧЕНИЕ

Пономарева А.А.[1,3], Добродеев А.Ю.[1], Бондарь А.А.[2], Чердынцева Н.В.[1,4], Завьялов А.А.[1], Тузиков С.А.[1], Власов В.В.[2], Лактионов П.П.[2,5], Рыкова Е.Ю.[2,6]

[1] *Томский НИМЦ, Томск, Россия*
[2] *ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия*
[3] *ТПУ, Томск, Россия*
[4] *ТГУ, Томск, Россия*
[5] *НИИ патологии кровообращения им. академика Е.Н. Мешалкина, Новосибирск, Россия*
[6] *НГТУ, Новосибирск, Россия*

Введение. Одним из важнейших механизмов эпигенетической регуляции, в том числе процессов развития онкозаболеваний, является метилирование ДНК. В некоторых случаях изменение статуса метилирования предшествует генетическим мутациям и определяет развитие молекулярных событий при канцерогенезе. Показано, что гипометилирование ретротраспозонов LINE-1 ассоциировано с развитием онкологического процесса. При раке легкого (РЛ) в ткани опухоли выявлены изменения уровня метилирования LINE-1 в зависимости от прогноза заболевания. Установлено, что при раке в циркулирующей ДНК (цирДНК) плазмы и цирДНК, связанной с поверхностью клеток крови (скп-цирДНК), накапливаются фрагменты опухоле-специфичных аберрантно метилированных ДНК, которые могут выступать в качестве потенциальных онкомаркеров.

Цель. Анализ уровня метилирования ретротранспозонов LINE-1 в цирДНК крови больных РЛ до и после терапии на этапах динамического наблюдения.

Материалы и методы. В исследование включено 13 больных плоскоклеточным раком легкого (ПКРЛ) и 9 больных аденокарциномой (АК) со стадией опухолевого процесса ($T_{1-3}N_{0-3}M_0$), проходивших лечение на базе клиники Томского НИИ онкологии в возрасте 48-65 лет. Все больные получали комбинированное лечение в составе 2 курсов неоадъювантной химиотерапии по схеме: паклитаксел 175 мг/м^2 в/в 1 день + карбоплатин AUC 6 в/в 1 день, с интервалом в 3 недели. Вторым этапом выполнялось хирургическое вмешательство (резекция легкого или пневмонэктомия). Выделяли 2 группы пациентов: с частичной регрессией и со стабилизацией опухолевого процесса после проведенной химиотерапии. Период послеоперационного мониторинга пациентов, с целью выявления рецидивов или отдаленных метастазов, был не менее 5 лет. Образцы венозной крови забирались до лечения, на 30 сутки после проведения химиотерапии и на 15 сутки после резекции опухоли. ЦирДНК выделяли из плазмы крови, скп-цирДНК выделяли из фракции, полученной последовательной обработкой клеток крови фосфатным буфером и раствором трипсина. Концентрацию метилированных фрагментов LINE-1 района 1 (LINE met) определяли методом количественной метил-специфичной ПЦР. Для нормирования данных по метилированию оценивали концентрацию всех фрагментов LINE-1 района 2 (LINE Ind) независимо от метилирования методом количественной ПЦР.

Основные результаты. Ранее было показано, что фракция скп-цирДНК является информативным источником материала для диагностики РЛ, поэтому в настоящей работе определяли уровень метилирования LINE-1 повторов в составе скп-цирДНК у пациентов на этапах динамического наблюдения (после 2-х курсов неоадъювантной химиотерапии и последующего хирургического вмешательства). Показана корреляция концентрации метилированных фрагментов LINE met и фрагментов LINE Ind в составе скп-цирДНК до лечения ($r = 0,54$), после химиотерапии ($r = 0,72$), после операции ($r = 0,83$) ($p < 0,05$, коэффициент ранговой корреляции Спирмена). Показано, что в общей группе больных РЛ уровень метилирования LINE-1 повторов, определенный как отношение концентрации LINE met относительно LINE Ind (LINE met/LINE Ind), статистически значимо возрастает на этапах наблюдения после химиотерапии ($p < 0,05$, парный t-тест) и после операции по сравнению с уровнем до лечения ($p < 0,05$, парный t-тест).

Таблица 1. Сравнение показателей индекса метилирования LINE-1 в скп-цирДНК крови больных РЛ до и после проведенного противоопухолевого лечения в зависимости от гистологического типа опухоли

Гистотип	до леч. против после х/т*	p	после х/т против после опер.*	p	до леч. против после опер.*	p
АК	24±7	0,095	49±13	0,535	24±7	0,123
	49±13		37±8		37±8	
ПКРЛ	17±3	0,333	27±6	0,078	17±3	0,049
	27±6		57±15		57±15	

* - индекс метилирования LINE-1 (%), определяемый в крови больных РЛ до лечения, после химиотерапии и после операции, представлены средние значения и стандартная ошибка, различия оценивались с использованием парного t-теста, p - уровень значимости; х/т – химиотерапия.

При анализе связи между индексом метилирования LINE-1 в скп-цирДНК крови и гистологическим типом опухоли установлено, что тренды увеличения уровня метилирования после лечения больных АК отличаются от больных ПКРЛ (табл. 1). В случае ПКРЛ изменения индекса метилирования LINE-1 происходят практически линейно в ряду [до лечения – после химиотерапии – после операции] (17% – 27% - 57%), а в случае АК наиболее значимое изменение происходит уже на этапе лечения химическими препаратами, тогда как операция не приводит к увеличению индекса метилирования LINE-1 (24% - 49% - 37%) (табл. 1). Полученные данные могут быть обусловлены тем, что данные гистологические типы (ПКРЛ и АК) существенно различаются по патогенезу и клиническому поведению опухоли (Lockwood et al., 2012). Ранее установлено, что опухоли при АК и ПКРЛ характеризуются специфическими для каждого гистотипа изменениями копийности генов и паттерна метилирования ДНК (Davidson et al., 2013). Таким образом, выявленные в настоящей работе тренды изменений метилирования LINE-1 в цирДНК при ПКРЛ и АК говорят об особенностях эпигенетических изменений при определенном гистотипе опухоли в зависимости от характера используемого противоопухолевого лечения. Эти закономерности в дальнейшем могут быть интересны при разработке методов анализа молекулярно-генетических маркеров с целью оценки эффективности терапии РЛ.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о перспективности исследований характера динамики изменений уровня метилирования LINE-1 повторов в ответ на противоопухолевое лечение при различных гистологических типах РЛ.

Работа поддержана грантом № 2014-208 по программе II.1П фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий», в рамках программы «Постдок в Томском политехническом университете».

ОСОБЕННОСТИ АЛЛЕЛЬНОГО ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ФЕРМЕНТОВ МЕТИОНИНОВОГО И ФОЛАТНОГО ЦИКЛОВ У БОЛЬНЫХ МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ И ОСТРЫМ МИЕЛОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

Сидорова Ж.Ю., Кострома И.И., Дрижун Ю.С., Свитина С.П., Керус Е.В., Щеглова К.А., Грицаев С.В., Капустин С.И.

ФГБУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

Введение. Аберрантное метилирование промоторных областей некоторых генов, участвующих в регуляции процессов клеточной дифференцировки и пролиферации, играет важную роль в патогенезе онкогематологических заболеваний. Ферменты метионинового и фолатного циклов задействованы в процессе метилирования ДНК, обеспечивая синтез метаболитов, выступающих в качестве доноров метильных групп. В этой связи, представляется актуальным изучение взаимосвязи статуса метилирования ДНК и полиморфизма генов ферментов метионинового и фолатного циклов при различных гемобластозах, в частности, у больных миелодиспластическим синдромом (МДС) и острым миелоидным лейкозом (ОМЛ).

Цель. Изучить особенности распределения аллелей и генотипов основных ферментов фолатного и метионинового метаболических циклов у больных МДС и ОМЛ.

Материалы и методы. В качестве материала исследования использовали образцы геномной ДНК, полученные от 50 больных МДС (23 мужчины и 27 женщин, средний возраст 61,3 года) и 75 больных ОМЛ (27 мужчин и 48 женщин, средний возраст 51,2 года). Контрольную группу (КГ) составил 121 донор крови (73 мужчины и 48 женщин, средний возраст 54,1 года), Идентификацию полиморфизма генов метилентетрагидрофолат редуктазы (MTHFR, C677T и A1298C), метионин синтазы (MTR, A2756G), редуктазы метионин синтазы (MTRR, A66G) и метилентетрагидрофолат дегидрогеназы (MTHFD, G1958A) осуществляли с помощью ПЦР и последующего рестрикционного анализа. Статистическая обработка результатов проводилась по точному методу Фишера, с использованием показателя "отношения шансов" (OR – odds ratio) и p-значения.

Результаты. Носительство аллели MTHFR 677T значительно чаще встречалось у мужчин с МДС, чем у мужчин из КГ (76.2% против 47.9% соответственно, OR=3.1, 95%CI: 1.1-8.7, p=0.033) и женщин с МДС (76.2% против 44.4% соответственно, OR=4.0, 95%CI: 1.1-14.1, p=0.047). В то же время, в группе больных ОМЛ существенных различий по частоте встречаемости (ЧВ) этой аллели между мужчинами и женщинами не наблюдалось (48.1% против 56.2%). В группе здоровых лиц доля носителей аллели MTHFR 677T была практически равной у мужчин (47.9%) и женщин (47.8%). Также было выявлено различие в ЧВ генотипа MTHFR 1298AC между группами больных МДС и ОМЛ (33.3% против 55.7% соответственно, OR=0.4, 95%CI: 0.2-0.9, p=0.025). В контроле доля лиц с указанным генотипом составила 43.8%. Генотип MTHFR 1298CC встречался у женщин в группе больных МДС в 14.8% случаев, в КГ – в 8.3%, и в группе больных ОМЛ – в 4.2%. Одновременное носительство аллели 677T и генотипа 1298AC встречалось у пациентов с ОМЛ в 2 раза чаще, чем у больных МДС (32.0% против 14.0% соответственно, OR=2.9, 95%CI: 1.1-7.4, p=0.034).

Генотип MTR 2756 GG не был обнаружен ни у одного пациента с ОМЛ, тогда как в КГ он встречался у 8 человек (0.0% против 6.6% соответственно, OR =0.09, 95%CI: 0.01-1.60, p=0.025). Среди больных МДС доля лиц с указанным генотипом составила 4.2%.

Сочетание в генотипе вариантов MTHFD 1958GG и MTRR 66GG значительно чаще обнаруживалось у пациентов с МДС, чем в контроле (14.6% против 4.1% соответственно, OR=4.0, 95%CI: 1.2-13.2, p=0.04). В группе больных ОМЛ данное сочетание встречалось в 2 раза чаще,

чем в КГ (8.5% против 4.1% соответственно, OR=0.5, 95%CI: 0.1-1.6, p=0.33).

Выводы. Анализ аллельного полиморфизма генов ключевых ферментов метионинового и фолатного циклов в группах больных МДС и ОМЛ выявил ряд интересных особенностей, свидетельствующих о непосредственном участии указанных генов в лейкозогенезе. Исследования в данном направлении представляются перспективными с целью дальнейшего выяснения молекулярных механизмов развития указанных заболеваний.

АНАЛИЗ МУТАЦИЙ ГЕНОВ *BRAF* И *NRAS* ПРИ МЕТАСТАТИЧЕСКОЙ МЕЛАНОМЕ КОЖИ

Шинкаркина А.П., Конова М.В., Новиков Н.Ю., Двинских Н.Ю., Мозеров С.А.

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, Обнинск, Россия

Введение

Исключительная агрессивность меланомы и высокая склонность к метастазированию приводит к высокой летальности при данном заболевании. Значительные успехи в понимании молекулярных механизмов патогенеза меланомы и открытие активирующих мутаций в онкогене *BRAF* способствовало появлению специфических ингибиторов *BRAF* и реальному прогрессу в лечении пациентов с метастатической меланомой.

Основную роль в патогенезе меланомы играет MAPK (RAS-RAF-MEK-ERK) сигнальный путь, который гиперактивирован в большинстве случаев меланомы кожи в результате мутации в гене *BRAF*. Среди мутаций *BRAF* 80-90% составляет мутация c.1799T→G (p.V600E) в 15-м экзоне, приводящая к замене валина на глутаминовую кислоту в 600 кодоне гена [Rubinstein et al.2010]. Однако к настоящему времени выявлены и другие мутации в гене *BRAF* - V600K, V600/R/D/M, D594V, L597R/S/Q, K601E, наличие которых важно при назначении таргетной терапии [Dahlman et al. 2012; Lovly at al. 2012].

Особая важность достоверной диагностики статуса гена BRAF связана с избирательным воздействием низкомолекулярных ингибиторов именно на мутированный *BRAF* и возможностью патологической активации MAPK каскада при действии на опухолевые клетки с «диким» типом гена.

Второй по частоте драйверной мутацией при меланоме кожи является мутация *NRAS*, активирующая сигнальные пути RAF–MEK–ERK, Ral–GDS, PI3K–AKT–mTOR и PLC–PKC. В настоящее время активно изучаются возможности лечения пациентов с *NRAS* мутированными меланомами: использование ингибиторов MEK и PI3K-AKT, а также применение иммунной терапии [Douglas et al. 2015].

Надежная диагностика мутационного статуса опухоли, лежащая в основе назначения персонифицированного лечения, возможна при использовании современных чувствительных и специфичных молекулярно-генетических методов.

Цель исследования – оценить с помощью различных молекулярно-генетических методов частоту и спектр мутаций генов *BRAF* и *NRAS* у пациентов с метастатической меланомой кожи.

Материалы и методы исследования

Проведено исследование геномной ДНК 69 пациентов с морфологически подтвержденным диагнозом меланома кожи в возрасте от 24 до 78 лет, получавших лечение в МРНЦ им. А.Ф. Цыба-филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России. ДНК выделяли из парафиновых блоков, содержащих не менее 20% опухолевых клеток, с помощью наборов «QIAamp DNA FFPE Tissue Kit» (Qiagen, Германия). Для очистки ДНК, выделенной из ткани меланомы с большим содержанием меланина, применяли сорбентный метод с использованием набора АмплиПраймДНК-сорб-В («ИнтерЛабСервис», Россия).

Для секвенирования по Сэнгеру проводили ПЦР целевых участков исследуемых экзонов генов *BRAF* и *NRAS* с праймерами, фланкирующими данные экзоны. Для очистки ПЦР продуктов использовали наборы ''Clean Standard" (''Евроген", Россия). Реакцию синтеза меченых фрагментов по Сэнгеру проводили BigDye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) по протоколу производителя с последующей очисткой продуктов с помощью BigDye xTerminator Purification Kit (Applied Biosystems, США) и их прямым секвенированием на генетическом анализаторе AB 3500 (Applied Biosystems, США). Для анализа секвенированных последовательностей использовали программы Sequencing Analysis v 5.1 и Chromas v.2.31.

Аллель-специфическую ПЦР в реальном времени для скрининга мутации V600E проводили на детектирующем амплификаторе StepOnePlus System (Applied Biosystems, США) с помощью набора TaqMan Mutation Detection Assay (Applied Biosystems, США) согласно инструкции производителя с использованием внутреннего контроля TaqMan Mutation Detection IPC Reagent Kit (Applied Biosystems, США), комбинации праймеров/зонда для нормального Hs00000172_rf и мутантной аллели – Hs00000111_mu и зондов, меченных флуоресцентным красителем FAM. Анализ полученных кривых флуоресценции и детекцию мутации проводили в интегрированном с прибором программном обеспечении согласно рекомендациям производителя оборудования и наборов реагентов.

Для выявления *BRAF* мутаций в 600 и 601 кодонах и мутаций 3-го экзона гена *NRAS* применяли мутационно-специфическую ПЦР в режиме ''реального времени" с использованием наборов ''Insider BRAF" и ''Insider NRAS" компании ''Евроген", Россия. При проведении реакции с использованием набора ''Insider" в каждой реакции амплифицировали 2 фрагмента ДНК – целевой фрагмент и экзогенный внутренний контроль для оценки степени ингибирования ПЦР и выявления истинно отрицательных результатов анализа. Детекция таргетного фрагмента шла по каналу FAM. ПЦР-продукты секвенировали для идентификации типа мутации.

Для анализа мутаций и их патогенетического значения использовали ресурсы HGMDhttp://www.hgmd.cf.ac.uk),Cosmic(http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic), MyCancerGenome (https://www.mycancergenome.org).

Основные результаты и обсуждение

При анализе соматических мутаций в опухолевых клетках большое значение имеет возможность выявления мутантной аллели на фоне большого количества клеток нормальной ткани. В нашем исследовании для выявления наиболее часто встречающейся мутации гена BRAF - V600E мы использовали конкурентную аллель-специфическую Taqman ПЦР, в которой за счет комбинации аллель-специфических Taqman зондов и аллель-специфических MGB блокаторов для ингибирования амплификации дикой аллели возможно выявить до 0,1 % мутантной аллели. Среди обследованных данным методом мутация V600E выявлена у 36 пациентов (52,2 % случаев).

Пациентам, негативным по V600E мутации был проведен анализ с помощью мутационно-специфической ПЦР в реальном времени с последующим секвенированием для обнаружения возможных редких мутаций в 600 и 601 кодонах гена. В исследуемой группе у 4-х пациентов (5,8%) была выявлена мутация c.1798_1799delinsAA (p.V600K) и одного (1,4%) - мутация c.1798_1799delinsAG (p.V600R). Наличие мутации V600K, как и V600E, связано с чувствительностью опухоли к ингибиторам BRAF вемурафенибу или дабрафенибу. Пациенты с V600R мутациями демонстрировали более интенсивный ответ на терапию данными препаратами, в сравнении с имеющими другие V600 мутации [Klein et al.2013], а также были чувствительны к терапии MEK ингибитором траметенибом [Kim et al.2013].

Методом прямого секвенирования у 3-х (4,3%) обследованных пациентов нами была обнаружена мутация c.1789_1790delCTinsTC, замена серина на лейцин в 597 кодоне гена *BRAF* (p.L597S). Известно, что наличие этой мутации ассоциировано с чувствительностью к MEK ингибиторам (Dahlman et al. 2012).

Образцы опухолей с «диким» типом *BRAF* (25 случаев) были протестированы на наличие мутаций во 2-м экзоне гена *NRAS* с помощью секвенирования по Сэнгеру и 3-м экзоне – с помощью мутационно-специфической ПЦР. В данной группе выявлено 3 пациента (12%), имеющих мутацию NRAS c.182A>G (p.Q61R) и один (4%) – с мутацией c.181C>A (p.Q61K). Отсутствие мутаций во 2-м экзоне, возможно, связано с недостаточной чувствительностью метода секвенирования, применяемого для их обнаружения. *NRAS* мутации в 3-м экзоне *NRAS* описаны на более поздних стадиях развития меланомы и предполагается их особая роль в метастазировании опухоли [Fedorenko et al., 2013]. В ряде работ сообщается об эффективности MEK ингибиторов для *NRAS*-мутированных меланом [Asciero et al. 2013; Grimaldi et al. 2014]. Кроме того, оценка *NRAS* статуса важна как предиктивный фактор ответа меланомы на терапию интерлейкинами [Johnoson et al. 2013].

Выводы

При метастатической меланоме кожи с помощью аллель-специфической, мутационно-специфической ПЦР в реальном времени и прямого секвенирования по Сэнгеру у 64 % пациентов (44 из 69) обнаружены мутации гена *BRAF* и у 16% (4 из 25) мутации в 3-м экзоне гена *NRAS*.

Редкие мутации гена *BRAF*, тестируемые с использованием секвенирования, выявлены в 25% случаев (у 8 из 44 пациентов).

Для более полной характеристики статуса мутаций генов *BRAF* и *NRAS* при отборе пациентов для персонифицированной лекарственной терапии необходимо комбинировать ПЦР в реальном времени и секвенирование.

АБЕРРАНТНОЕ МЕТИЛИРОВАНИЕ РЯДА ГЕНОВ ХРОМОСОМЫ 3(3P), ВКЛЮЧАЮЩЕЕСЯ В ПАТОГЕНЕЗ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Рябчиков Д.А.[1], Челышева Д.С.[3], Логинов В.И.[2], Бурденый А.М.[2], Пронина И.В.[2], Брага Э.А.[2], Чхиквадзе Н.В.[1], Воротников И.В.[1], Казубская Т.П.[1], Сельчук В.Ю.[3]

[1]ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» МЗ России, Москва, Россия

[2]Институт общей патологии и патофизиологии, РАМН, Москва

[3]Государственный медико-стоматологический университет, Москва, Россия

Диагностика и лечение рака молочной железы (РМЖ) остается сложной задачей, РМЖ – лидирующая причина смерти среди гинекологических раков в мире. Эпигенетические изменения считаются одним из наиболее перспективных инструментов для ранней диагностики рака.

Цель исследования: изучить метилирование генов хромосомы 3 (3p): *RHOA, GPX1, USP4, DAG1, MGMT* и *RASSF1A*, *RARbeta2*, *SEMA3B* для разработки критериев диагностики и прогноза РМЖ.

Материалы и методы. Метилирование определялось метилчувствительным рестрикционным анализом (МЧРА), гиперметилированные образцы подтверждались бисульфитным секвенированием. Дополнительный контроль включал 10 образцов тканей молочной железы, полученных от доноров без онкологических заболеваний в анамнезе.

Результаты. Метилирование генов *RHOA, GPX1, DAG1* и *USP4* в первичных опухолях выявлялось с частотой от 12% до 30%. В образцах морфологически нормальной ткани тех же пациенток метилирование наблюдалось с частотой от 9% до 12%. Метилирование генов *RASSF1A, RARβ2, SEMA3B* было значительно выше: 78% (32/41), 46% (26/56), 35% (22/65), соответственно. Эти гены метилировались в опухоли значительно чаще, чем в морфологически нормальной ткани. При исследовании контрольной ДНК от онкологически здоровых доноров, метилирования перечисленных генов обнаружено не было. Метилирование генов *DAG1* и *USP4* коррелировало с размером опухоли и ($P = 0.0008$) и метастазами в регионарные лимфоузлы и отдаленными метастазами ($P = 0.0141$). Аберрантное метилирование генов *RARβ2* и *SEMA3B* ассоциировалось со степенью дифференцировки опухоли и со стадией заболевания. Гены RASSF1A

и MGMT метилировались более часто в низкодифференцированных опухолях (P=0,0008) и в трижды негативном РМЖ (33% (5/15), 40% (6/15), соответственно). Однако в трижды негативном РМЖ, наиболее часто выявлялось метилирование промоторного региона гена *RHOA* (57%).

Заключение. Изученные гены расширяют профиль эпигенетических изменений в генах хромосомы 3(3p), позволяют понять роль эпигенетических изменений при РМЖ. Полученные данные могут быть использованы для формирования диагностической панели, включающей гены наиболее часто метилирующиеся при РМЖ. Аберрантное метилирование генов *RHOA, GPX1, USP4, RASSF1A, RARβ2, SEMA3B, MGMT* может быть индикатором прогрессии первичной опухоли на разных стадиях РМЖ и это открывает возможности в будущей деметилирущей терапии для разработки ингибиторов метилирования ДНК.

Ключевые слова. Рак молочной железы, аберрантное метилирование, гены хромосомы 3 (3p).

Эта работа поддерживалась грантом Российского Научного Фонда (РНФ) # 14-15-00654.

ВОЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ВЫСОКОТЕХНОЛОГИЧНЫХ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В КЛИНИЧЕСКОЙ ОНКОЛОГИИ

Немцова М.В.

ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России, Москва

В последнее время большое значение начинают приобретать молекулярногенетические маркеры, основанные на использовании ДНК и РНК-технологий. Они представляют собой генетические и эпигенетические повреждения, выявляемые в геноме опухолевой клетки, потому что нестабильность генома является основным свойством опухолей. Генетическая нестабильность приводит к изменению экспрессии генов, которые регулируют клеточный цикл, отвечают за проведение ростового сигналинга, определяют или модулируют метастатическую и инвазивную активность клеток.

Последние годы характеризуются значительным технологическим прорывом, особенно в области геномных и компьютерных технологий, что привело к изменению и значительному расширению наших знаний о геноме опухолевой клетки. Появление высокотехнологичных полногеномных методов исследования и интеграция их в общедоступные базы данных позволяет расширить взгляд на канцерогенез, объяснить разделение опухолей по гистологическим типам, дифференцировать генные сети, определяющие основные этапы опухолевого патогенеза и механизмы лекарственной устойчивости.

Использование технологии микрочипов позволило значительно расширить наши представления о роли экспрессионных, эпигенетических и структурных изменений, происходящих в процессах канцерогенеза различных опухолевых типов. Исследование профилей генной экспрессии при определенных типах и подтипах опухолей позволяет идентифицировать дополнительные маркеры, связанные с изменением клинического течения, появлением инвазии и метастазирования, а также внести дополнение в морфологическую классификацию. Исследование профилей генной экспрессии в опухолях с использованием технологии микрочипов, позволяет одновременно изучать экспрессию нескольких тысяч генов, и определять гены, со специфической экспрессией, характерной для определенного типа опухоли, которые получили название генетической подписи.

К полногеномным методам исследования, позволяющим провести специфическое для опухоли генетическое профилирование, кроме исследования экспрессионных микрочипов, можно отнести и полногеномную гибридизацию (CGH). В результате полногеномного исследования копийности хромосомных локусов удалось выявить хромосомные районы, которые стандартно подвергаются перестройкам, с потерей или появлением дополнительного хромосомного материала, и являются специфичными для различных клинических и гистологических опухолевых подтипов.

Еще одной актуальной задачей является исследование нарушение метилирования/деметилирования ДНК в опухолевой клетке, что приводит к нарушению эпигенетической регуляции экспрессии генов, связанному с канцерогенезом. В результате деметилирования происходит активация генов, транскрипционно инактивированных в нормальных тканях, или, напротив, гиперметилирование CpG островков является механизмом инактивации генов-супрессоров практически во всех опухолях человека. На сегодняшний день, после применения метилированных микрочипов стало известно о тысячах генах, абберантно метилированных/деметилированных в опухолях различного типа. Также значимым достижением последних лет является открытие новых эпигенетичесикх регуляторов генной экспрессии – пула микро-РНК. Определенный спектр этих молекул может маркировать опухоли разного типа, и определять их клинические особенности, поэтому микро-РНК являются объектом изучения с помощью полногеномных методов исследования.

Предметом полногеномного исследования может выступать аллельный дисбаланс, изменение паттерна экспрессии генов или микроРНК, а также распределение однонуклеотидных полиморфизмов у пациентов и здоровых индивидов с целью определения аллелей, ассоциированных повышенным риском развития опухолей. Эти стратегии основаны на выявлении различий между опухолевой и нормальной контрольной ДНК или РНК, или между опухолями различных клинических и морфологических типов. Исследование молекулярно-генетических маркеров представляет собой обширное поле научно-исследовательской деятельности и имеет принципиальное значение для клиники.

Другим революционным методом, позволившим направить молекулярно- генетические достижения в область клинического применения является секвенирование нового поколения (NGS – Next Generation Sequencing), с помощью которого в одной пробирке можно анализи-

ровать от нескольких десятков до нескольких сотен генов, имеющих повышенную частоту мутаций в опухолях.

Исследование мутаций в опухолевом геноме имеет как научный, так и практический выход, позволяя выявлять наиболее характерные изменения и перестройки в опухоли для изучения основных этапов ее патогенеза и использовать их в качестве маркера, ассоциированного с клиническим течением. С другой стороны, стратегия мутационного профилирования опухолей с последующей верификацией выявленных мутаций для определения их наследственного характера имеет значительный клинический выход. Определение герминальных мутаций позволяет модифицировать клинические рекомендации, потому что повышается риск развития повторной опухоли. Кроме того, наличие наследственных мутаций требует генетической консультации пациентов и их семей с целью выявления бессимптомных носителей для своевременной диагностики возможных опухолей.

Применение полногеномных методов исследования значительно расширило информацию о генетической и эпигенетической природе канцерогенеза. В результате появились дополнительные типы опухолевых маркеров, что позволяет перейти от стратегии тестирования единичных генов, ассоциированных с канцерогенезом к интегральной модели канцерогенеза, с определением генных сетей и поэтапным тестированием каждого этапа, для определения наиболее значимого в образовании опухолей определенного типа.

ДИАГНОСТИКА НАСЛЕДСТВЕННЫХ ФОРМ ЗАБОЛЕВАНИЯ САРКОМАМИ И ПЕРВИЧНО-МНОЖЕСТВЕННЫМИ НЕОПЛАЗИЯМИ У ДЕТЕЙ

Казубская Т.П.[1], Козлова В.М.[1], Стрельников В.В.[2], Поспехова Н.И.[3], Кондратьева Т.Т.[1], Михайлова С.М.[1], Соколова И.Н.[1], Трофимов Е.И.[4]

[1]ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» МЗ России, Москва, Россия
[2]ФГБУ «Медико-генетический научный центр» РАМН, Москва, Россия
[3]ФГБУ «ГНЦ колопроктологии им. А.Н. Рыжих», Москва, Россия
[4]Федеральный научно-клинический центр оториноларингологии ФМБА, Москва, Россия

Саркомы костей и мягких тканей это высоко гетерогенная группа опухолей, редко встречающаяся у детей и взрослых. Однако они часто являются одним из компонентов наследственного синдрома Ли-Фраумени и его варианта Ли-Фраумени-подобного синдрома. Герминальная (наследуемая) мутация в гене *TP53* (17p13.1) ассоциирует с синдромом Ли-Фраумени и предрасполагает к возникновению разных типов сарком. В идентификации этих синдромов стандартной клинической четкости не существует и при появлении в семье единичного случая саркомы или других редких опухолей установить синдром без адекватного молекулярного анализа не всегда возможно.

Цель исследования: определить показания и показать возможности практического применения разных молекулярных технологий в медико-генетическом консультировании для диагностики орфанных синдромов ассоциированных с разными типами сарком и первично-множественными неоплазиями у детей.

Материалы и методы. Четверо детей с редкими неоплазиями в возрасте 2,5 года, 3 года 4 месяца, 4 года, 8 лет 7 месяцев лечились в НИИДО РОНЦ им. Н.Н. Блохина с различными типами сарком и другими неоплазиями, возникавшими у них в разных органах, в разные периоды жизни между 2000-2015 г.г. Скрининг мутаций проводился с использованием секвенирования нового поколения (NGS), тест-системы MLPA (мультиплексной лигазной пробозависимой амплификации) и секвенирования по Сэнгеру. Материалом для молекулярных исследований была периферическая венозная кровь.

Результаты. У ребенка 3-х лет впервые диагностирована паравертебральная эмбриональная опухоль, в 10 лет диагностирована ПЕКома печени, остеосаркома в 10,5 лет. Для идентификации наследственного характера малигнизации использована онкопанель из 409 высоко- и низкопенетрантных генов. У ребенка и его отца обнаружена герминальная мутация в гене *TP53,* экзон 7c.C742T (p.R248W), (OMIM 191170.0001). Неожиданной находкой была обнаруженная у ребенка мутация в гене *PPARG*, ассоциирующая с риском ожирения и канцерогенезом, унаследованная от здоровой матери с признаками ожирения. У второго ребенка в 2,5 года обнаружена редкая атипичная тератоидно-рабдоидная опухоль III желудочка мозга (АТРО). Молекулярное тестирование ДНК гена *TP53* методом секвенирования по Сэнгеру у ребенка и его матери выявило две миссенс-мутации в экзоне 6 [(c.619G>A p.D207N) и c.644G>T (p.S215I)]. Клиническая значимость выявленных мутаций (D207N и S215I) пока не ясна, мать ребенка оказалась клинически здоровым носителем мутации и имеет высокий риск развития неоплазий в течение жизни. У третьего ребенка в 7 лет 9 месяцев диагностирована хориоидкарцинома правого бокового желудочка мозга. Мутация в гене *TP53* обнаружена в экзоне 4 c.C328T (p.R110C), аналогичные мутации выявлены у матери ребенка и ее младшей сестры 4-х лет, которые были здоровы. Обнаруженные мутации показали неполную пенетрантность. У четвертого ребенка в 4 года диагностирована первая опухоль - эмбриональная рабдомиосаркома левой орбиты, вторая - В-клеточная диффузная лимфома кишечника обнаружена в 9 лет, в 12 лет - остеосаркома ключицы и эмбриональная рабдомиосаркома в области шеи в 15 лет. Исследование ДНК гена *TP53* методом NGS и по Сэнгеру мутаций не выявило. Методом MLPA выявлена делеции экзона 10: c.(1195+1_1196-1)_(1302+1_1303-1) del, p.(Ile332Profs Ter14), которая явилась причиной агрессивного течения заболевания у ребенка. Выявленные генотипы стали причиной разной тяжести проявления заболевания у детей. У всех детей диагностирован синдром Ли-Фраумени.

Заключение. Основанием для тестирования мутаций в гене *TP5*, у детей является ранний возраст развития сарком, опухоли мозга и первично-множественные неоплазии. Дети, у которых неоплазия излечена, из-за высокого риска вторых первичных неоплазий, должны оставаться под наблюдением онколога не менее 30 лет от момента диагностики первой опухоли. Неполная пенетрантность является важным признаком мутаций в гене *TP53* и диктует необходимость тестирования родственников из таких семей. Все носители выявленных мутаций *TP53* должны находиться под активным врачебным наблюдением в течение жизни. Для ранней диагностики неоплазии у здоровых носителей патологических мутаций необходимы осведомленность и клинический контроль врачей разных специальностей. Раннее выявление мутаций у детей с неоплазиями помогает вовремя идентифицировать синдромы, планировать тактику ведения больного.

Ключевые слова. Саркома, первично-множественные неоплазии, синдром Ли-Фраумени, мутации *TP53*.

ДИСБАЛАНС АДГЕЗИОННОЙ И ТРАНСКРИПЦИОННОЙ ФУНКЦИЙ β-КАТЕНИНА В КЛЕТКАХ ТИРЕОИДНОГО ЭПИТЕЛИЯ ПРИ УЗЛОВОЙ ПАТОЛОГИИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Исаева А.В., Зима А.П., Васильева О.А., Саприна Т.В., Прохоренко Т.С., Березкина И.С., Касоян К.Т., Шабалова И.П., Новицкий В.В.

ФГБОУ ВО «СибГМУ» Минздрава России, Томск, Россия
Томский НИМЦ, Томск, Россия
ФГБОУ ДПО «РМАНПО» Минздрава России, Москва, Россия

Введение. Узловые образования щитовидной железы среди заболеваний эндокринной системы являются одной из наиболее частых диагностируемых патологий у взрослых. Они встречаются в общей популяции с частотой 4-7% [Welker M.J.O. et al., 2003; Maia F.F.R. et al., 2012]. Рак щитовидной железы, несмотря на свое минимальное представительство среди узловых образований щитовидной железы, занимает лидирующую позицию среди злокачественных эндокринных опухолей [Maia F.F.R. et al., 2012]. Особенно актуальным и важным вопросом, как для пациента, так и для врача является определение риска малигнизации выявленного узлового образования щитовидной железы. Интерес представляет тот факт, что большая часть из известных молекулярных событий при опухолевой трансформации тиреоидного эпителия связаны с работой канонического Wnt сигнального пути, главным кофактором которого является многофункциональный белок β-катенин [Valkenburg K.C. et al., 2011; Zeller E. et al., 2013]. Нарушения адгезионной и транскрипционной функции β-катенина выявлены при различных вариантах неоплазий. Это определяет актуальность исследования функционального статуса β-катенина в клетках тиреоидного эпителия узловых образований щитовидной железы доброкачественной и злокачественной природы.

Цель исследования: установить роль дисбаланса адгезионной и транскрипционной/сигнальной функций β-катенина в механизмах опухолевой трансформации клеток тиреоидного эпителия.

Задачи исследования:

1. Оценить экспрессию мРНК гена CTNNB1 и белка β-катенина в клетках тиреоидного эпителия при узловой патологии щитовидной железы (коллоидный узловой зоб, аутоиммунный тиреоидит, фолликулярная аденома, папиллярный рак).

2. Дать сравнительный анализ экспрессии мРНК гена CDH1 и белка E-кадгерина в клетках тиреоидного эпителия при различных вариантах узловой патологии щитовидной железы.

3. Оценить уровень экспрессии мРНК генов-мишеней β-катенина (CCND1, MYC) в клетках тиреоидного эпителия при различных вариантах узловой патологии щитовидной железы.

4. Выявить особенности и общие закономерности изменения адгезионной и транскрипционной/сигнальной функций β-катенина при доброкачественных и злокачественных вариантах узловой патологии щитовидной железы.

Материалы и методы. В исследование были включены 88 пациентов (77 женщин и 11 мужчин, средний возраст - 55 лет) с узловыми образованиями щитовидной железы различной природы: 33 пациента с коллоидным узловым зобом, 13 пациентов с диагнозом фолликулярная аденома, 29 пациентов с папиллярным раком и 13 пациентов с аутоиммунным тиреоидитом. Материалом служили биоптаты узловых образований щитовидной железы, полученные путем тонкоигольной аспирационной биопсии под контролем УЗИ у пациентов с узловой патологией щитовидной железы.

Методы исследования. На дооперационном этапе всем пациентам проводился цитологический анализ препаратов с морфологической оценкой диагноза по категориям классификации Bethesda традиционным и жидкостным методом. Для оценки экспрессии белков β-катенина и E-кадгерина в клетках эпителия щитовидной железы был использован иммуноцитохимический метод исследования с непрямым трехступенчатым принципом визуализации. Исследование проводилось на монослойных цитологических препаратах, полученных методом жидкостной цитологии. Проводилась оценка интенсивности иммунной окраски и внутриклеточной локализации белка.

Определение уровня экспрессии мРНК генов CTNNB1, CDH1, CCND1, MYC выполнялось методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Статистическую обработку полученных данных проводили в программе SPSS 13.0.

Основные результаты. Папиллярный рак щитовидной железы характеризуется снижением экспрессии мРНК гена β-катенина (CTNNB1) (1,41 (1,05-1,84) отн. ед.), по сравнению с выраженностью значения данного показателя у пациентов с коллоидным узловым зобом (4,5

(2,4-5,52) отн. ед.), аутоиммунным тиреоидитом (9,65 (8,42-12,26) отн. ед.), а также фолликулярной аденомой (10,00 (8,62-12,95) отн. ед.). При злокачественном новообразовании щитовидной железы в эпителиальных клетках происходит накопление белка β-катенина преимущественно цитоплазматического и/или ядерного пула, при коллоидном узловом зобе β-катенин локализуется на мембране клетки, при аутоиммунном тиреодите и фолликулярной аденоме - на мембране и в цитоплазме клетки. У пациентов с папиллярным раком щитовидной железы имеет место снижение экспрессии мРНК гена адгезионного белка Е-кадгерина (CDH1) (2,06 (1,11-3,58) отн. ед.), взаимодействующего с β-катенином, по сравнению со значением данного показателя у пациентов с фолликулярной аденомой (25,50 (22,60-34,00) отн. ед.) и аутоиммунным тиреоидитом (10,98 (9,44-14,94) отн. ед.). При этом мембранная экспрессия белка Е-кадгерина характеризуется слабоположительной реакцией, аналогично с эпителиальными клетками при аутоиммунном тиреоидите. Экспрессия мРНК генов-мишеней β-катенина (CCND1, MYC), являющихся маркерами его транскрипционной активности, наиболее значима у больных папиллярным раком щитовидной железы.

Заключение. Механизмы опухолевой трансформации клеток тиреоидного эпителия сопряжены с дисбалансом адгезионной и транскрипционной/сигнальной функций β-катенина. Напротив, при коллоидном узловом зобе реализуется адгезионная функция β-катенина, при фолликулярной аденоме имеет место баланс его адгезионной и транскрипционной функций, при аутоиммунном тиреоидите - активация сигнальной функции и реализация слабой адгезионной функции. Полученные результаты указывают на то, что переключение функции β-катенина от адгезионной к транскрипционной/сигнальной может служить молекулярной платформой опухолевой трансформации клеток тиреоидного эпителия.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации, НШ-7906.2016.7.

Список используемой литературы

1. Maia F.F.R., Zantut-Wittmann D.E. Thyroid nodule management: clinical, ultrasound and cytopathological parameters for predicting malignancy. // Clinics. – 2012. – Vol. 67(8). – P. 945-954.

2. Valkenburg K.C., Graveel C.R., Zylstra-Diegel C.R. et al. Wnt/β-catenin Signaling in Normal and Cancer Stem Cells. // Cancers. – 2011. – Vol. 3. – P. 2050-2079.

3. Welker M.J., Orlov D. Thyroid nodules // Am Fam Physician. – 2003. – Vol. 1:67(3). – P. 559-566.

4. Zeller E., Hammer K., Kirschnick M. Mechanisms of RAS/β-catenin interactions. // Arch Toxicol. – 2013. – Vol. 87. – P. 611-632.

НОВЫЙ ЭФФЕКТИВНЫЙ СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ СВОБОДНО ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ ДНК ИЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ И МОЧИ

Ткачев Г.А., Левина Т.А., Кирьянов С.А.

ООО «НекстБио», Москва, Россия

Введение. В настоящее время для диагностики и неинвазивного мониторинга онкологических заболеваний все более актуальным становится использование внеклеточной свободно-циркулирующей ДНК (вкДНК), выделенной из жидкостных биоптатов (плазмы, сыворотки, крови и мочи). Известно, что количество вкДНК в норме и патологии существенно отличаются, что обусловлено тем, что основным источником вкДНК при норме является апоптозная деградация ДНК, а при патологии - некрозная. Одной из характеристик вкДНК являются профили внеклеточной ДНК по размерам фрагментов. В частности для плазмы крови типичным размерным профилем основного пула вкДНК является 150-170 п.о., для мочи – 270-300 п.о. Характеристикой эффективности выделения вкДНК в отсутствии контаминации геномной ДНК является коэффициент интегральности. Существующие методы пока не позволяют выделять вкДНК с достаточной эффективностью из малых объемов плазмы, тем более из мочи. Современные коммерческие наборы выделения вкДНК плохо адаптированы для применения в лабораторной диагностике и зачастую весьма дороги. Таким образом, крайне актуальной является разработка высокоэффективной и впоследствии стандартизированной методики выделения вкДНК из минимальных объемов плазмы и мочи.

Цель. Разработать эффективный способ выделения внеклеточной ДНК из минимально достаточного количества плазмы крови и мочи.

Материалы и методы. Были использованы образцы плазмы крови и мочи 10 условно-здоровых доноров в трех повторностях в диапазоне объемов 0.5-1.0-3.0 мл для плазмы, 3.0-5.0-7.5 мл - для мочи. Перед выделением, для обработки образцов применялся специальный буферный раствор позволяющий сохранить интактными клетки, и уменьшить загрязнение геномной ДНК. Выделения вкДНК проводили с использованием модифицированного метода выделения путем сорбции на магнитных частицах. В качестве референсного метода использовался набор PME free-circulating DNA Extraction Kit с использование полимера для малых фрагментов ДНК, на сорбционных колонках ("Analytik Jena", Германия). Расчет общего выхода вкДНК (концентрация нг/мл образца) проводился количественным определением бета-глобина методом ПЦР в реальном времени, индекс интегральности ДНК оценивался по расчетному соотношению ΔCт между Alu240 и Alu130 последовательностями в Alu-ПЦР. Для определения размерности ДНК использовался "Agilent 2100 Bioanalyzer"

Результаты. Минимально достаточные количество биологического материала для выделения вкДНК (более 10 нг/мл) было определено как 3 мл для мочи, и 1 мл – для плазмы. Выделение вкДНК предложенным методом из мочи обеспечивает существенно увеличение общего количества вкДНК, чем таковое при выделении референсным набором (18 нг/мл против 0,6 нг/мл), индекс

интегральности примерно равен 2.0, размерный профиль основного пула вкДНК ~ 240 п.о., что соответствует вкДНК выделенной из мочи, как показано в Таблице. При выделении вкДНК предложенным методом из плазмы крови общее количество вкДНК было выше, чем таковое при выделении референсным набором (35 нг/мл против 22нг/мл). Также выше индекс интегральности для нашего метода и ближе к ожидаемому размеру ДНК-фрагментов.

Таблица. Сравнение 2 систем выделения вкДНК

	Количество вкДНК по глобину, (нг/мл)	Индекс интегральности (Δ Alu 240 /130)	Размер ДНК - фрагментов
1	0,6 (0,4-0,9)	2.0 (1,5-2,5)	180 (170-190)
1a	18 (14-24)	2,1 (1,9-2,2)	240 (220-300)
2	22 (18-26)	1,5 (0,9-1,8)	85 (35-140)
2a	35 (30-40)	1,9 (1,8-2,1)	150 (140-170)

Данные представлены в виде: M-медиана (Q_1 – 25% квартиль; Q_3 – 75% квартиль)
1- вкДНК из мочи (PME free-circulating DNA Extraction Kit, Analytic Jena), N=10
1a - вкДНК из мочи (Предварительная обработка буфером и выделение на магнитных частицах) N=10
2 - вкДНК из плазмы крови (PME free-circulating DNA Extraction Kit, Analytic Jena), N=10
2a - вкДНК из плазмы крови(Предварительная обработка буфером и выделение на магнитных частицах) N=10

Выводы. Разработанный способ выделения внеклеточной ДНК продемонстрировал эффективность выделения внеклеточной ДНК из относительно малых объемов биологических образцов мочи и плазмы. Перспективность применения и возможность стандартизации требует дальнейших исследований.

ПРОФИЛЬ ЭКСПРЕССИИ микроРНК ПРИ МЕЛАНОМЕ КОЖИ

Якимова М.В., Смирнов С.Ю., Пашкевич А.М., Усович Т.О., Субоч Е.И.

ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова», Минск, Республика Беларусь

Введение. Меланома кожи занимает лидирующее положение среди новообразований с непрогнозируемым течением, высоким уровнем смертности и низкой эффективностью терапии диссеминированных форм. На сегодняшний день ранняя диагностика является основной составляющей успешной борьбы с данной патологией.

Эпигенетические регуляторные механизмы играют ключевую роль в прогрессии опухолей. Особая роль при этом принадлежит некодирующим РНК (микроРНК), паттерн экспрессии которых и их прогностическая значимость при меланоме исследованы недостаточно, что обуславливает актуальность и перспективность изучения данной проблемы.

Цель и задачи. Изучить различия в профиле экспрессии микроРНК miR-21, miR-181c, miR-200b, miR-214, miR-221, miR-222, miR-182 и miR-15b при меланоцитарных невусах и меланоме кожи.

Материалы и методы. Исследовано 30 образцов меланомы кожи (I-II стадии) и 10 образцов меланоцитарных невусов, заключенных в парафиновые блоки. Молекулярно-генетическое тестирование выполняли методом полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени» на амплификаторе «C1000 Touch Thermal Cycler» CFX96» (BioRad, США). Оценку уровня экспрессии микроРНК проводили с помощью программного обеспечения REST 2009 (Qiagen). В качестве референсных генов использовали мяРНК RNU1 и RNU5.

Основные результаты. Количественные данные ПЦР получены для всех образцов. Используя значения стандартного отклонения уровня экспрессии исследованных генов (0,9-1,5 отн.ед.) и эффективности ПЦР (90-100%) в качестве референсных генов для нормализации данных выбраны RNU1 и RNU5.

В исследованных образцах меланомы кожи, в сравнении с образцами меланоцитарных невусов, выявлены повышенный уровень экспрессии микроРНК miR-21 (mean = 2,61; SEM = 0,69-10,2; $p<0,05$) и сниженный уровень экспрессии микроРНК miR-181c (mean = 0,44; SEM = 0,18-1,01; $p<0,01$) и miR-182 (mean = 0,45; SEM = 0,18-1,02; $p<0,05$). Кроме того, в образцах опухолевой ткани выявлен статистически значимый тренд к снижению уровня экспрессии супрессорной микроРНК miR-200b (mean = 0,548; SEM = 0,21-1,58; $p = 0,07$). Достоверные различия в уровнях экспрессии miR-214, miR-221, miR-222 и miR-15b в образцах меланомы и меланоцитарных невусов отсутствуют.

Выводы. Согласно полученным данным, для меланомы кожи I-II стадий, в сравнении с меланоцитарными невусами, характерна дисрегуляция уровней экспрессии микроРНК miR-21, miR-181c, miR-182 и miR-200b, что соответствует литературным данным. Выявленные различия в уровне экспрессии микроРНК требуют дальнейшего изучения с целью уточнения функциональной роли отдель-

ных молекул в механизмах развития меланомы, а также потенциального использования в качестве прогностических маркеров.

Список используемой литературы

1. Kunz M (2013) MicroRNAs in melanoma biology. Adv Exp Med Biol 774:103–120

2. Bennett PE (2013) miR in melanoma development: miRNAs and acquired hallmarks of cancer in melanoma. Physiol Genomics 45:1049–1059

3. Melnik BC (2015) MiR-21: an environmental driver of malignant melanoma? J Transl Med 13:202

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *PCA3* И *TMPRSS2:ERG* В ОСАДКЕ МОЧИ ПРИ АДЕНОКАРЦИНОМЕ И ДРУГИХ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЯХ В ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЕ

Михайленко Д.С.[1,2], Жинжило Т.А.[3], Ефремов Г.Д.[2], Григорьева М.В.[2], Сивков А.В.[2], Беляндинов М.Р.[2], Немцова М.В.[1]

[1] Институт молекулярной медицины ФГБОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России, Москва, Россия

[2] НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, Москва, Россия

[3] ФГАУ «Лечебно-реабилитационный центр» Минздрава России, Москва, Россия

Введение. Морфологическое исследование биоптатов при подозрении на рак предстательной железы (РПЖ) зачастую представляет собой сложную задачу вследствие гетерогенности и мультифокальности опухолей. В то же время, опухолевые клетки слущиваются в просвет мочевыносящих путей и присутствуют в осадке мочи, в них могут быть определены мутации и изменения экспрессии генов, характерные для первичной опухоли.

Цель исследования – определение экспрессии генов *PCA3* и *TMPRSS2:ERG* в осадке мочи при доброкачественной гиперплазии (ДГПЖ), интраэпителиальной неоплазии (ПИН) и РПЖ для выяснения диагностической значимости уровней экспрессии указанных генов как маркеров РПЖ.

Материалы и методы. В исследование вошли 110 пациентов, из них 51 пациент с ДГПЖ и/или простатитом (контрольная группа), 59 пациентов – больные РПЖ. После массажа простаты из первой порции мочи выделяли тотальную РНК с помощью набора «РИБО-золь-В» (Интерлабсервис), проводили обратную транскрипцию со случайными гексамерами, затем анализировали экспрессию генов методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) и определяли показатель deltaCt, равный Ct(PCA3) – Ct(KLK3).

Результаты. Медианы уровня deltaCt при анализе осадков мочи составили 4,09 95% ДИ (2,87 : 4,79) в контроле и -0,20 95% ДИ (-0,61 : -0,38) в группе РПЖ. С помощью ROC-анализа был определен наиболее оптимальный пороговый уровень deltaCt для осадков мочи, равный 1,23. Диагностическая точность анализа экспрессии *PCA3* при выбранном пороговом уровне составила 81,8%. Чувствительность определения гиперэкспрессии *PCA3* при анализе осадков мочи составила 76,3%, специфичность 88,2. Экспрессия *TMPRSS2:ERG* отсутствовала в ДГПЖ, ПИН, но была выявлена в 59% случаев РПЖ. Показано, что deltaCt не различается у пациентов с ДГПЖ, низкой и высокой ПИН, тогда как достоверно увеличен при РПЖ относительно любой из трех вышеперечисленных групп ($p < 0,01$). Иными словами, анализ экспрессии *PCA3* и химерного онкогена *TMPRSS2:ERG* не позволяет проводить дифференциальную диагностику ДГПЖ, ПИН низкой и высокой степени.

Заключение. Таким образом, гиперэкспрессия *PCA3* и экспрессия *TMPRSS2:ERG* характерны для РПЖ. Анализ экспрессии этих генов с помощью предложенной модификации ПЦР-РВ при пороговом уровне deltaCt 1,23 позволяет с диагностической точностью 82% выявлять РПЖ по мРНК, выделенной из осадков мочи.

КОМБИНАЦИИ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

Тихонов А.А.[1], Бутвиловская В.И.[1], Савватеева Е.Н.[1], Рагимов А.А.[2], Салимов Э.Л.[2], Сидоров Д.В.[3], Черниченко М.А.[3], Рубина А.Ю.[1]

[1] ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» РАН, Москва, Россия

[2] ФГБОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» МЗ РФ, Москва, Россия

[3] МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, Москва, Россия

Введение. Одним из неинвазивных методов диагностики колоректального рака (КРР) является определение концентраций белковых онкомаркеров в сыворотке крови пациента, однако большинство онкомаркеров обладают слишком низкой специфичностью и чувствительностью. Из литературных данных известно, что антитела к онкоассоциированным гликанам обнаруживаются в сыворотках крови больных на ранних стадиях рака [1]. Большинство опухолевых маркеров не являются исключительно опухолеспецифическими, их концентрации или уровни изменяются и при других заболеваниях. Решить эту проблему позволяет подход, основанный на одновременном определении комбинации маркеров, так называемых «сигнатур».

Цель и задачи. Выявить наиболее эффективные белковые и гликановые сигнатуры онкоассоциированных серологических маркеров для диагностики колоректального рака.

Материал и методы. По технологии, разработанной в ИМБ РАН, была изготовлена серия биочипов, гелевые элементы которых содержали иммобилизованные антитела к белковым онкомаркерам и сахариды, ассоциированные с КРР.

Были исследованы сыворотки 125 пациентов: 67 сывороток здоровых доноров, 58 сывороток пациентов с КРР. Концентрации белковых онкомаркеров определяли как методом иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием тест-систем фирмы «Fujirebio Diagnostics», так и методом иммунофлуоресцентного анализа на биочипах. Одновременно с определением концентрации белковых онкомаркеров, на биочипах с иммобилизованными гликанами определяли уровень антител к каждому из гликанов методом «сэндвич» иммунофлуоресцентного анализа.

Основные результаты. Определение содержания онкомаркеров на биочипе для группы пациентов с КРР позволило выявить повышение уровня РЭА у 40% пациентов, уровня СА 19-9 у 29%, СА 242 у 22%, АФП у 9%. Концентрация ПСА была выше нормы у 4% больных, СА 72-4 у 4% и ХГЧ у 1%. Ни у кого из исследуемой выборки пациентов не были повышены онкомаркеры SCCA, HCE и CA 125. Для оценки предсказательной способности были построены ROC-кривые: у классического метода определения КРР по уровню РЭА и СА 19-9 площадь под кривой (AUC) составила 0.591 ($p<0.05$). При использовании четырех маркеров, которые были повышены у наибольшего числа пациентов – РЭА, СА 19-9, СА 242 и АФП, площадь под ROC-кривой была равна 0.649 ($p<0.05$). Были определены уровни антител против гликанов $SiaT_n$, T_n, TF, Le^c, Le^y, $SiaLe^A$. Значения AUC для каждого из шести гликанов при выявлении КРР позволили выявить сигнатуру, состоящую из трех антител к гликанам, а именно к T_n, TF, $SiaLe^A$, которая обладала хорошей предсказательной способностью ($AUC = 0.735$, $p<0.01$).

Выводы. Чувствительность определения КРР при использовании сигнатуры «4 онкомаркера+3 гликана» составила 81,0%, что в полтора раза выше чувствительности серологического метода определения КРР по концентрации РЭА и СА 19-9 (55,2%). Доля верно определенных диагнозов возросла с 79,8% до 82,4%. Результаты, полученные в ходе данной работы, позволяют рекомендовать метод анализа, определяющий сигнатуру из онкомаркеров РЭА, СА 19-19, СА 242, АФП и антител к гликанам T_n, TF, $SiaLe^A$ для диагностики колоректального рака.

Работа выполнена при поддержке Программы ФНИ государственных академий на 2013 - 2020 годы (№ подтемы 0103-2014-003).

Список используемой литературы: [1] Fuster M.M., Esko J.D. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. Nat. Rev. Cancer 2005;5(7):526-542.

ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ РЯДА ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ С РИСКОМ РАЗВИТИЯ РАКА ЖЕЛУДКА В РЕСПУБЛИКЕ БАШКОРТОСТАН

Юсупова Л.Ф.[1], Ямангулова Н.Р.[1], Нургалиева А.Х.[1], Мунасыпов Ф.Р.[3], Хуснутдинов Ш.М.[3], Хуснутдинова Э.К.[1,2]

[1]ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет», Уфа, Россия
[2]Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, Уфа, Россия
[3]ГБУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер», Уфа, Россия

Введение

Рак желудка (РЖ) остается одной из лидирующих причин смерти от онкологических заболеваний, занимая четвертое место в структуре онкологической заболеваемости в мире. При этом злокачественные новообразования желудка находятся на втором месте в структуре онкологической смертности у обоих полов, уступая по этому показателю лишь злокачественным новообразованиям легкого [5]. В Российской Федерации РЖ занимает шестое место среди всех злокачественных опухолей по заболеваемости и второе - по смертности [2].

К наиболее известным факторам риска развития данной патологии следует отнести высокое потребление соли, низкое потребление свежих овощей и фруктов, курение, инфицирование бактерией *Helicobacter pylori*, генетический статус и др. [1].

РЖ развивается в несколько этапов. Хроническое воспаление с замедленной пролиферацией является общепризнанным фактором риска развития рака, включая РЖ [3; 4]. Хорошо известно, что инфекция *Helicobacter pylori* вызывает воспаление (хронический гастрит), которое, как полагают, прогрессирует в предраковые поражения и, в конце концов, ведет к инвазийному РЖ. Хроническое воспаление развивается у генетически восприимчивых индивидов с дефектами в защитных механизмах слизистой оболочки желудка или нарушением регуляции иммунных реакций цитокинами [4]. Генетические вариации в генах цитокинов могут влиять на внутренние индивидуальные ответы организма и восприимчивость к болезни. Гены, кодирующие про- и противовоспалительные цитокины часто рассматриваются при многих гастродуоденальных заболеваниях. Хотя связь между воспалением и РЖ хорошо установлена, механизмы, вовлеченные в этот процесс, еще остаются неясными.

Про- и противовоспалительные цитокины модулируют воспалительную реакцию в слизистой оболочке желудка. Провоспалительный интерлейкин-8 *(IL-8)* является основным медиатором, индуцирующим хемотаксис, активирует воспалительные клетки путем миграции нейтрофилов, мононуклеарных фагоцитов и тучных клеток [4]. Интерлейкин-1β *(IL-1β)* известен как мощный провоспалительный цитокин, а также как мощный ингибитор желудочной секреции. С другой стороны, интерлейкин-10 *(IL-10)* является цитокином с выраженным противовоспали-

тельным эффектом. *IL-10* снижает активность макрофагов, является мощным фактором для подавления воспалительных и опухолевых процессов путем ингибирования продукции IFN-γ и антиген-специфической Т-клеточной активации [6]. *IL-10* участвует в гуморальном компоненте иммунного ответа, увеличение его концентрации в крови пациентов с опухолями – неблагоприятный признак, характерный для усиления опухолевого роста.

Баланс между про- *(IL-1β, 8)* и противовоспалительными *(IL-10)* цитокинами может влиять на степень воспаления, которое является потенциальным фактором в развитии гастрита и РЖ [6].

Цель и задачи

Целью данной работы стал поиск ассоциаций полиморфных вариантов генов *IL1β, IL8, IL10* с риском развития РЖ.

В соответствии с поставленной целью были выдвинуты следующие задачи: анализ частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов *rs4073* гена *IL8, rs1143634* гена *IL-1β* и *rs1800872* гена *IL10* у больных РЖ и здоровых доноров; анализ ассоциаций исследованных локусов с риском развития РЖ, с учетом этнической и гендерной принадлежности анализируемых групп.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили образцы ДНК 221 пациента с клинически установленным диагнозом «рак желудка» и 272 здоровых доноров без признаков патологии желудочно-кишечного тракта. ДНК была выделена из лейкоцитов периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции. Генотипирование проводилось с помощью метода ПЦР-ПДРФ.

Основные результаты

По итогам ассоциативного анализа распределения частот аллелей и генотипов исследованных локусов с риском развития РЖ, с учетом этнической и гендерной принадлежности анализируемых групп, были получены статистически значимые результаты для гена *IL1β*.

В распределении частот аллелей и генотипов полиморфного варианта *rs1143634* гена *IL1β* среди здоровых индивидов из РБ выявлены гендерные различия: у мужчин гораздо реже (в 45,0% случаев), чем у женщин (в 62,50% случаев) обнаруживался генотип *CC* (χ^2=5,8; p=0,02). Аллель *C* и генотип *CC* являются для мужчин маркерами повышенного риска развития изучаемой патологии (χ^2=7,39; p=0,007; OR=1,69; 95%CI 1,17-2,44 и χ^2=7,83; p=0,005; OR=1,96; 95%CI 1,24-3,09, соответственно), а маркерами пониженного риска для этой же группы испытуемых – аллель *T* и генотип *CT* (χ^2=7,39; p=0,007; OR=0,59; 95%CI 0,41-0,86 и χ^2=4,75; p=0,029; OR=0,58; 95%CI 0,37-0,93, соответственно).

Проведенный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного локуса *rs4073* гена *IL8* и *rs1800872* гена *IL10* не выявил статистически значимых различий между группами больных РЖ и здоровых доноров из РБ.

Выводы

Таким образом, показано, что полиморфный вариант *rs1143634* гена *IL1β* может вносить вклад в структуру генетической предрасположенности мужчин, проживающих в РБ, к развитию РЖ.

Список используемой литературы

1. Имянитов ЕН. Эпидемиология и биология РЖ. Практическая онкология. 2009;10(1):1-7.

2. Каприн АД, Старинский ВВ, Петрова ГВ. Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность) – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России. – 2017. – 250 с.

3. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? Lancet. 2001 Feb 17;357(9255):539-545.

4. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. Nature. 2002 Dec 19-26;420(6917):860-867.

5. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. Int J Cancer. 2010 Dec 15;127(12):2893-2917.

6. Howell WM, Rose-Zerilli MJ. Interleukin-10 polymorphisms, cancer susceptibility and prognosis. Fam Cancer. 2006;5(2):143-149.

АНАЛИЗ ВЗАИМОСВЯЗИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СЕМЕЙСТВА GST И РАННЕГО ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ У ПАЦИЕНТОК С ОТЕЧНО-ИНФИЛЬТРАТИВНЫМ И ПЕРВИЧНО-ДИССЕМИНИРОВАННЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Третьяк И.В.[1], Костюк С.А.[1], Руденкова Т.В.[1], Демидчик Ю.Е.[1], Симирский В.В.[2]

[1] ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск, РБ

[2] УП «Хозрасчетное опытное производство Института биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси», Минск, РБ

Введение. Экспрессия гена представляет собой процесс преобразования генетической информации, закодированной в ДНК, в конечный продукт-белок. Количественный анализ уровня экспрессии генов можно проводить путем измерения количества промежуточного продукта, т.е. мРНК.

Глутатион-S-трансферазы (GST) находятся в центре внимания при характеристике лекарственно-устойчивых клеток опухоли. Глутатион-S-трансферазы - группа мультифункциональных димерных белков, которые действуют как связывающие белки или ферменты в ходе осуществления многих процессов биотрансформации. Полагается, что GST участвуют в развитии лекарственной устойчивости с помощью прямого детоксифицирующего действия, а также как ингибитор MAP (митоген активированные белки) киназного пути [1]. Актуальность проведенного исследования обусловлена необходимостью изучения молекулярных механизмов, способствующих формированию лекарственной устойчивости, оказывающих влияние на течение опухолевого процесса.

Материалы и методы. Определение экспрессии генов GSTT1, GSTM1, GSTP1 выполнено в образцах из парафин-фиксированных срезов опухолевой ткани 37 пациенток с отечно-инфильтративной формой рака молочной железы (РМЖ), у которых проводилась химиотерапия с включением антрациклинов на 1-ом этапе специального лечения, а также 74 пациенток с IV стадией РМЖ, у которых проводилась цитостатическая терапия с включением антрациклинов как часть специального лечения.

В ходе исследования количественное определение экспрессии генов семейства GST производили путем определения количества их мРНК с использованием метода обратно-транскрипционной ПЦР (ОТ-ПЦР) и ПЦР в режиме реального времени на основе специально подобранных оригинальных пар праймеров, зондов для каждого гена и программ амплификации. Выделение мРНК из парафин-фиксированных срезов образцов опухолевой ткани пациентов производилось с использованием набора реагентов «RecoverAll Total Nucleic acid isolation kit» (Ambion, США) согласно инструкции производителя. Обратную транскрипцию проводили с использованием набора SuperScript III reverse transcriptase, dNTP и Ribonuclease inhibitor (Invitrogen, США) согласно инструкции производителя. Для количественной оценки значений мРНК таргетных генов параллельно определяли значения мРНК для референсного гена HGUS, принадлежащего к «генам домашнего хозяйства» (house keeping genes), Для количественного выражения экспрессии исследуемых генов семейства GST проводили расчет уровня нормализованной экспрессии таргетного гена в процентном выражении по отношению к референсному [2].

Результаты. В связи с высоким процентом отсутствия экспрессии гена GSTM1 (63,3%) у пациенток с отечно-инфильтративным и первично-диссеминированным РМЖ, при статистической обработке данный ген рассматривали как номинальный (оценивали абсолютное и относительное количество пациентов с наличием /отсутствием экспрессии данных генов).

На основании данных полученных при исследовании материала пациенток, страдающих первично-диссеминированным раком молочной железы, проведен многофакторный анализ ассоциации экспрессии генов GST и выживаемости без прогрессирования заболевания у пациенток, страдающих первично-диссеминированным РМЖ (таблица 1). Установлено, что длительность до прогрессирования заболевания у пациенток с первично-диссеминированным РМЖ, получавших цитостатическую терапию с включением антрациклинов, ассоциирована с отсутствием экспрессии гена GSTM1 (p=0,024), а также со степенью вовлечения в метастатический процесс регионарных лимфатических узлов (cN2-3 против cN0-1) (p=0,010).

Таблица 1. Многофакторный анализ выживаемости без прогрессирования у пациенток с первично-диссеминированным РМЖ с учетом экспрессии GSTM1 и степени поражения регионарных лимфатических узлов

Переменная	Статистические параметры		
	B	ОР (95% ДИ ОР)	p
cN2-3 против cN0-1	0,698	2,0 (1,2-3,4)	0,010
GSTM1 = 0	0,610	1,8 (1,1-3,1)	0,024

Выделены факторы риска раннего прогрессирования заболевания у пациенток с первично-диссеминированным РМЖ, получавших цитостатическую терапию с включением антрациклинов: отсутствие экспрессии гена GSTM1 и поражение регионарных лимфатических узлов cN2-3. Группа риска позднего прогрессирования включала пациенток с отсутствием или наличием только одного из факторов риска.

Выявлены статистически значимые различия в выживаемости без прогрессирования заболевания в группах риска раннего/позднего прогрессирования (ОР 2,44 (95% ДИ 1,40-4,24), p=0,002). Медиана длительности до прогрессирования заболевания у пациенток с первично-диссеминированным раком молочной железы, получавших цитостатическую терапию с включением антрациклинов, в группе риска позднего прогрессирования составила 10 месяцев (95% ДИ 7-20 месяцев). В группе пациенток риска раннего прогрессирования медиана длительности до прогрессирования заболевания 5 месяцев (95% ДИ 3-8 месяцев).

Заключение. В ходе исследования получены данные о связи между отсутствием экспрессии гена GSTM1 и выживаемостью без прогрессирования заболевания, а также риском прогрессирования при проведении полихимиотерапии (ПХТ) с включением антрациклинов у пациенток с III или IV стадией РМЖ. Вероятность прогрессирования (отсутствие контроля над опухолью) при проведении ПХТ с включением антрациклинов у пациенток с отечно-инфильтративным и первично-диссеминированным раком молочной железы ассоциирована с отсутствием экспрессии гена GSTM1 (ОШ 3,8 (95% ДИ 1,2-13,1), p=0,026), экспрессией гена GSTT1 менее 25% (ОШ 5,4 (95% ДИ 1,6-22,9), p=0,012 степенью распространения опухолевого процесса (M1) (ОШ 17,4 (95% ДИ 4,0-124,1), p<0,001). Чувствительность модели: 0,92 (95% ДИ 0,81-1,00), специфичность 0,58 (95% ДИ 0,46 – 0,69), эффективность 0,67 (0,57- 0,76).

Точный молекулярный механизм, объясняющий данное явление остается неясным, можно было ожидать, что отсутствие экспрессии гена GSTM1, а соответственно снижение ферментативной деятельности приведет к лучшему ответу на химиотерапию. Однако имеется ряд сообщений, что при нулевых генотипах GSTT1 / GSTM1 отмечен худший ответ на химиотерапию при различных локализациях неопластического процесса: раке яичников, раке молочной железы.

Список использованной литературы

1. Glutathion S transferase pi indicates chemotherapy

resistance in breast cancer / F. Su [et al.] // The J. Surg. Res. – 2003. – Vol. 113, № 1. – P. 102–108.

2. Разработка методики определения уровней экспрессии некоторых генов семейств ABC и GST в образцах из парафин-фиксированных срезов опухолевой ткани молочной железы / С. А. Костюк, Т. В. Руденкова, Ю. Е. Демидчик, И. Ю.Третьяк // Мед. новости. – 2014. – № 12. – С. 55–58.

НАРУШЕНИЯ ГЕНОВ ТЯЖЕЛЫХ ЦЕПЕЙ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЦИТАРНЫМ ЛЕЙКОЗОМ, ВЫЯВЛЯЕМЫЕ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ IN SITU ГИБРИДИЗАЦИИ КЛЕТОК

Шкаврова Т.Г., Михайлова Г.Ф., Голуб Е.В., Цепенко В.В.

МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, Обнинск, Россия

Введение. В настоящее время при хроническом лимфоцитарном лейкозе (ХЛЛ) маркерными аберрациями хромосом считаются del17p13, del11q22, del13q14 и трисомия хромосомы 12. Прогностическое значение этих нарушений хорошо изучено (Van Dyke DL, 2016). Однако, на основании только этих цитогенетических нарушений, не всегда представляется возможным достаточно точно спрогнозировать течение заболевания, поэтому и ведется поиск новых маркеров, позволяющих усовершенствовать используемую молекулярно-цитогенетическую панель. Аберрации с вовлечением генов тяжелых цепей иммуноглобулинов (IGH) часто встречаются при В-клеточных неходжкинских лимфомах. По данным зарубежной литературы при ХЛЛ транслокации, с участием генов IGH, наблюдаются у 2-26% больных (DE Braekeleer M. et al., 2016). Авторами было высказано предположение, что в дополнение к маркерным перестройкам, транслокации с вовлечением генов IGH могут быть значимыми и больные, у которых они выявлены, не могут относиться к группе низкого риска. Идентификация участвующих в транслокациях генов-партнеров может иметь огромное значение как для прогноза течения заболевания, так и для лучшего понимания молекулярных механизмов патогенеза ХЛЛ. У больных ХЛЛ делеции в локусе 14q32, где расположен ген IGH, встречаются чаще, чем транслокации. У исследователей нет единого мнения о прогностической значимости этого нарушения. Некоторые авторы (Fink S. et al., 2005; Wlodarska I. et al., 2007) предполагают, что делеции в локусе 14q32 являются результатом потери участка ДНК, который сопровождает соматическую VDJ-рекомбинацию и, следовательно, del14q32 могут быть физиологическим событием, а не частью онкогенного процесса В-лимфоцитов. Однако, в работе (Quintero-Rivera F. et al, 2009) показано, что делеции в локусе 14q32 отсутствуют у лиц не страдающих ХЛЛ, а также в клетках костного мозга, которые не подвергаются воздействию антигена, поэтому вряд ли они могут быть результатом физиологической перестройки В-клеток при воздействии антигена.

Цель и задачи. Изучить нарушения генов тяжелых цепей иммуноглобулинов (IGH), а также их взаимосвязь с маркерными нарушениями у больных ХЛЛ методом интерфазной in situ гибридизации (I-FISH).

Материалы и методы. Исследование выполнено на архивных образцах нестимулированных лимфоцитов методом I-FISH. В исследование включены 103 больных ХЛЛ, а также 15 клинически здоровых доноров в качестве контрольной группы. Для выявления маркерных нарушений при ХЛЛ были использованы коммерческие прямомеченные ДНК-зонды LSI p53, LSI ATM, LSI DLEU, LSI 13q34, Cep 12, (Vysis, США). Для выявления перестроек с вовлечением гена IGH (14q32) была использована двухцветная локус-специфичная проба на разрыв (Dual Color, Break Apart, флуорохромы SpectrumOrange/SpectrumGreen). При использовании данной пробы в отсутствие нарушений видны 2 слитных сигнала, при транслокации – 1 слитный (1F) и 2 раздельных (1 оранжевый (1O), 1 зеленый (1G)). При делеции 1 зеленый сигнал отсутствует или имеется его маленькая часть (dim G), т.е. (1F, 1O) или (1F, 1O, dim G), что свидетельствует о полной или частичной потери региона IGHV. Анализ препаратов проводили на флуоресцентном микроскопе AxioImager A-2 (Carl Zeiss, Германия). В каждом случае анализировали 200–600 интерфазных клеток.

При определении границ нормы для каждой из проб анализировали 1000 интерфазных ядер от каждого из 15 здоровых доноров. Граница нормальных значений: для трисомии хромосомы 12<5%, del17p13<8%, del11q23<6%, del13q14<6%, del13q34<8%, del14q32<9%, t(14;?)<7%.

Основные результаты. В группе больных ХЛЛ выявлено, что нарушения генов (транслокации и/или делеции) IGH имеют 68 из 103 (66%) обследованных.

Транслокации выявлены у 32% (33 из 103) обследованных больных. Частота клеток с транслокациями у больных ХЛЛ колебалась от 7 до 98%. У 27% (28 из 103) больных она не превышала 23%. Транслокации обнаружены у 38% (6 из 16) пациентов с del17p13, у 35% (7 из 20) пациентов с del11q23, у 36% (4 из 11) пациентов с трисомией хромосомы 12, у 23% (9 из 40) пациентов с del13q14 (как единственной), у 50% (4 из 8) пациентов с множественными нарушениями кариотипа и у 25% (2 из 8) пациентов с нормальным кариотипом. Различия по количеству лиц с транслокациями в группе больных с неблагоприятным прогнозом течения заболевания, т.е. имеющих del17p13, del11q22 и множественные нарушения кариотипа, и в группе больных с благоприятным прогнозом, т.е. имеющих del13q14 (как единственное нарушение) и нормальный кариотип, не были значимыми, но имелась тенденция к различию (χ^2=3,44; 0,1>p>0,05).

Делеции с потерей в регионе IGHV, выявлены у 56% (58 из 103) больных ХЛЛ. Частота клеток с этим нарушением колебалась от 9 до 100%. У 41% (42 из 103) больных ХЛЛ del14q32 была клоновой, т.к. встречалась более чем в 25% проанализированных клеток. Делеции обнаружены у 63% (10 из 16) пациентов с del17p13, у 85%

(17 из 20) пациентов с del11q23, у 55% (6 из 11) пациентов с трисомией хромосомы 12, у 43% (17 из 40) пациентов с del13q14 (как единственной), у 75% (6 из 8) пациентов с множественными нарушениями кариотипа и у 25% (2 из 8) пациентов с нормальным кариотипом. Лица с делециями в локусе 14q32 в группе больных с неблагоприятным прогнозом встречались достоверно ($p<0,01$) чаще, чем в группе больных с благоприятным прогнозом (75% vs 40%).

В данном исследовании, кроме транслокаций и делеций, мы не обнаружили других нарушений с вовлечением локуса 14q32, причем делеции достоверно ($p<0,01$) преобладали.

Выводы. У больных ХЛЛ преобладающим нарушения генов IGH являются делеции с потерей вариабельного региона тяжелых цепей иммуноглобулинов. Они могут быть независимым прогностическим фактором, практическую значимость которого еще предстоит оценить.

РОЛЬ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В ПРОГНОЗЕ В-КЛЕТОЧНОГО ХРОНИЧЕСКОГО ЛИМФОЛЕЙКОЗА

Каримов Х.Я., Эгамова С.К., Маликова Н.Н., Бобоев К.Т.

Научно-исследовательский институт гематологии и перелевания крови МЗ РУз, Ташкент, Узбекистан

На протяжении последних десятилетий стандартные цитогенетические исследования широко применялись для изучения различных новообразований. Получен огромный фактический материал, важный для понимания механизмов малигнизации и прогрессии опухолей, а также для их диагностики и прогнозирования. Последнее относится, главным образом, к лейкозам и лимфомам. Одними из важнейших факторов прогноза клинического течения В- клеточного хронического лимфолейкоза (В-ХЛЛ) являются цитогенетические нарушения. К настоящему времени выявлены наиболее часто встречающиеся при данном заболевании аберрации.

Цель исследования. Определить прогностическое значение цитогенетических нарушений при хроническом В- клеточном лимфолейкозе.

Материалы и методы исследования. Было исследовано 50 больных с хроническим лимфолейкозом. В качестве биоматериала была взята периферическая кровь. Стандартное цитогенетическое исследование (СЦИ) осуществляли G-дифференциальную окраску хромосом. Хромосомный анализ проводили под иммерсионным объективом (увеличение 1,30x100). По возможности анализировали 20 метафаз. Кариотип описывали в соответствии с Международной цитогенетической номенклатурой ISCN, 2009.

Результаты исследования и обсуждение. Цитогенетическими исследованиями, проведенными у 50 пациентов, в 60% случаев (30 больных) были выявлены хромосомные изменения и в 40% случаев (20 больных) нарушения хромосом обнаружены не были. Стандартное цитогенетическое исследование выявило del 17p13 – в 2-х случаях (6,8%), del 11q22 – в 3-х случаях (10%), del 13q14 – в 14 случаях (46,6%), трисомию хромосомы 12 – в 4-х случаях (13,3%), транслокации t(11;14)(13q32) – в 4-х случаях (13,3%) и t(14;19)(32;13.1) – в 3-х случаях (10%). Выявленные нами цитогенетические нарушения имеют разное прогностическое значение: к благоприятным факторам прогноза относятся отсутствие цитогенетически выявляемых хромосомных нарушений и del(13q14), к факторам «промежуточного» прогноза – трисомия хромосомы 12 и del(11q22), к неблагоприятным прогностическим факторам –del(17p13). Было отмечено, что ассоциация носительства цитогенетически нормального кариотипа и благоприятного прогноза у больных соответствует данным литературы: течение основного заболевания у обследованных больных носило благоприятный характер. Однако, по нашим данным, прогноз у больных с del(13q14) хуже, чем без цитогенетических нарушений, что было подтверждено данными клинико-лабораторного обследования.

Заключение. Цитогенетические аберрации являются одними из наиболее важных факторов прогноза В-ХЛЛ. Результаты показывают, что наиболее широко спектр цитогенетических нарушений, возникающих при В-ХЛЛ, позволяет оценить только СЦИ. Цитогенетическое исследование, проводимое у больных В-ХЛЛ стандартным методом, позволяет отнести пациентов к определенным группам риска течения основного заболевания на основании оценки факторов прогноза В-ХЛЛ уже на ранних стадиях развития опухоли. Раннее выявление таких больных является актуальным, поскольку появились методы лечения, позволяющие получать полные и продолжительные ремиссии у большинства пациентов при их своевременном применении в том объеме воздействия, который соответствует объективному состоянию больного.

СОМАТИЧЕСКИЕ МУТАЦИИ ГЕНА *KRAS* У ПАЦИЕНТОВ С НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО, ПРОЖИВАЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ БЕЛАРУСИ

Щаюк А.Н.[1], Михаленко Е.П.[1], Крупнова Э.В.[1], Шепетько М.Н.[2], Чеботарёва Н.В.[1]

[1] Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

[2] Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Введение. Рак легкого (РЛ) является одним из самых распространенных злокачественных новообразований. Группа немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) включает примерно 85% от всех раков легкого. Ключевым процессом в патогенезе любых злокачественных новообразований, в том числе и НМРЛ, является ангиогенез. НМРЛ является гетерогенным по гистологическому диагнозу, аденокарцинома (АК) и плоскоклеточный рак лег-

кого (ПКРЛ) являются наиболее часто встречающимися типами. Известно, что пути патогенеза данных гистологических типов отличаются и их ангиогенез осуществляется путем активации двух различных тирозинкиназных каскадов. За последние годы достигнуты значительные успехи в изучении сигнальных путей, контролирующих ангиогенез в опухолевых клетках. Протоонкоген *KRAS*, кодирующий одноименный белок, является основным компонентом данных сигнальных путей. Согласно литературным данным, мутации в гене *KRAS* ассоциированы со снижением выживаемости у пациентов с аденокарциномой и плоскоклеточным раком легкого, а также неэффективностью терапии тирозинкиназными ингибиторами [1,2,3]. Поэтому изучение молекулярно-генетических индивидуальных особенностей опухоли имеют большое значение для прогнозирования течения заболевания и обеспечения персонифицированного подхода в лечении пациентов. Целью данного исследования является изучение мутаций гена *KRAS* при различных типах немелкоклеточного рака легкого (АК и ПКРЛ).

Материалы и методы. Объектом исследования явились 220 пациентов с диагнозом НМРЛ, при исследовании мутаций 2 экзона гена *KRAS* использовали ДНК, выделенную из опухолевой и неопухолевой ткани легкого 97 пациентов, у которых было проведено хирургическое лечение. После проведения операции установлен гистологический диагноз: 51 пациент имел плоскоклеточный рак, а у 46 пациентов – аденокарцинома легкого. Для определения мутаций в 12-м и 13-м кодонах 2 экзона гена *KRAS* использовали метод ПЦР с последующим секвенированием и анализом полученных результатов путем капиллярного фореза с помощью автоматического генетического анализатора Applied Biosystems 3500 DNA Analyzer.

Основные результаты. Впервые для популяции пациентов с НМРЛ, проживающих на территории Беларуси, была показана частота мутаций 2 экзона гена *KRAS*. Анализ полученных результатов секвенирования выявил три типа мутаций: замена глицина на аспарагиновую кислоту в 12 кодоне (p.G12D), замена глицина на цистеин в 12 кодоне (p.G12C) и замена глицина на цистеин в 13 кодоне (p.G13C). В общей исследуемой группе пациентов с немелкоклеточным раком легкого частота встречаемости мутаций во 2 экзоне гена *KRAS* составила 4,1%. Мутации обнаружены только у мужчин (5,7% от общего числа пациентов мужского пола). Выявлено, что среди носителей мутаций 75% курящих. Мутации гена *KRAS* в 4 раза чаще встречаются у мужчин с аденокарциномой (10,7%), чем у мужчин с плоскоклеточным раком легкого (2,4%), однако достоверной значимости различий выявлено не было, так как группа пациентов с мутациями немногочисленна. Это связано с тем, что белок KRas играет важную роль в нисходящем сигнальном пути RAS/RAF/MAPK и передает сигнал от EGFR внутрь клетки, что приводит к выживанию, активации пролиферации клеток и стимуляции ангиогенеза. Данный путь преимущественно активируется при аденокарциноме.

Выводы. Таким образом в исследуемой группе пациентов мутации гена *KRAS* играют важную роль в патогенезе такого гистологического типа НМРЛ как аденокарцинома.

Список используемой литературы

1. Molecular Epidemiology of EGFR and KRAS Mutations in 3,026 Lung Adenocarcinomas: Higher Susceptibility of Women to Smoking-Related KRAS-Mutant Cancers / S.Dogan [et al.] // Clin Cancer Res Nov. – 2012. – Vol.18, №22. – P.6169-6177.

2. Sculier, J. Nonsmall cell lung cancer / J. Sculier // Eur. Respir. Rev. – 2013. – Vol.1, 22, №127. – P.33-36.

3. Мутации *EGFR* и *KRAS*, важные для таргетной терапии немелкоклеточного рака легкого / Н.Н. Мазуренко [и др.] // Молекулярная медицина. – 2013. – №6. – С.55-59.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ *FLT1* И *KDR* В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МУТАЦИОННОГО СТАТУСА ГЕНА *VHL*

Жинжило Т.А.[1], Михайленко Д.С.[2,3], Колпаков А.В.[4], Кекеева Т.В.[1,5], Стрельников В.В.[5], Немцова М.В.[2], Кушлинский Н.Е.[6]

[1]ФГАУ «Лечебно-реабилитационный центр» Минздрава России, Москва, Россия
[2]Институт молекулярной медицины ФГБОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России, Москва, Россия
[3]НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, Москва, Россия
[4]ГБУЗ «Тамбовская областная клиническая больница им. В.Д. Бабенко», Тамбов, Россия
[5]ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва, Россия
[6]ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

Введение. Рак почки (РП) – лидирующее по темпу прироста заболеваемости злокачественное новообразование мочеполовой системы. Ежегодно в мире регистрируют до 200 тысяч новых случаев РП. Светлоклеточная карцинома (СК) – самая распространенная морфологическая форма РП, на ее долю приходится 75% всех случаев заболевания. Наиболее характерным молекулярно-генетическим нарушением при СК является мутация гена *VHL*. Ген *VHL* состоит из 3 экзонов и кодирует ключевой компонент мультипротеинового убиквитин-лигазного комплекса, подавляющий экспрессию ряда генов. Среди его генов-мишеней – *PDGFB, VEGFA, KIT*, играющие ключевую роль в пролиферации опухолевых клеток. Кроме того, развитие СК характеризуется изменением экспрессии таких генов как *CA9*, *VIM*, *MCAM*, *VEGFR1 (FLT1)* и *VEGFR2 (KDR/FLK1)* и некоторых других. Описаны ассоциации между экспрессией тирозинкиназных рецепторов FLT1 / KDR и ответом на терапию моноклональными антителами против VEGF (бевацузимаб) / мультикиназным ингибитором сунитинибом, соответственно. Имеются противоречивые

данные о том, существует ли выраженная корреляция между точковыми мутациями *VHL* и гиперэкспрессией его конкретных генов-мишеней.

Цель работы. Анализ мутаций *VHL* и определение экспрессии генов *FLT1* и *KDR* в СК почки для поиска гено-фенотипических корреляций, которые могут иметь прогностическое значение.

Материалы и методы. Исследована выборка 59 парных образцов СК, состоящих из опухолевой и прилегающей к ней морфологически не измененной ткани. Геномную ДНК выделяли с помощью набора Ампли-Прайм ДНК-сорб-В (Интерлабсервис, Россия). Экзоны *VHL* амплифицировали в ходе ПЦР и затем секвенировали по Сэнгеру с помощью набора «BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit» на 24-х капиллярном генетическом анализаторе 3500xl (Applied Biosystems, США). Суммарную РНК выделяли из гомогенатов ткани с помощью набора "РИБО-золь-В" (Интерлабсервис, Россия). Обратную транскрипцию проводили с использованием набора "Реверта-L" (Интерлабсервис, Россия). Анализ экспрессии генов *FLT1* и *KDR* выполнен методом ПЦР в реальном времени на детектирующем термоциклере StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США). Для исследования экспрессии генов использовали праймеры/зонды TagMan: FLT1 № Hs01052961_m1, KDR № Hs00911700_m1 и эндогенный контроль GAPDH № Hs02786624_g1 (Applied Biosystems).

Результаты. Мутации *VHL* выявлены в 52,5% (31/59) образцов СКП и являются соматическими, т.к. отсутствовали в прилегающей почечной паренхиме. В 1 экзоне обнаружено 54,8% (17/31) мутаций, 29% (9/31) – во втором и 16,1% (5/31) мутаций приходилось на 3 экзон гена *VHL*. Среди мутаций 41,9% (13/31) представлены однонуклеотидными заменами, 32,3% (10/31) – делециями, 16,1% (5/31) – инсерциями, остальные 6,4% (2/31) – комплексные мутации. В 61,3% (19/31) случаев мутации привели к сдвигу рамки считывания и формированию новых стоп-кодонов. Среди однонуклеотидных замен выявлено 15,4% (2/13) нонсенс-мутаций и 1 мутация сайта сплайсинга (6,6%). Экспрессия мРНК генов *FLT1* и *KDR* была обнаружена во всех парных образцах. Повышение экспрессии гена *FLT1* в группе образцов с мутацией гена *VHL* варьировало от 0,001 до 1824,8 (медиана 213,17), а в группе без мутаций – от 0,027 до 457,82 (медиана 5,37). С помощью U-критерия Манна-Уитни показаны достоверные различия между уровнями экспрессии гена *FLT1* в исследуемых группах ($p<0,05$). Для уровня экспрессии гена *KDR* ассоциации с мутационным статусом *VHL* не выявлено.

Заключение. Получены данные об ассоциации между уровнем экспрессии гена *VEGFR1 (FLT1)* и наличием мутации в гене *VHL* при СК, тогда как аналогичной ассоциации для другого гена-мишени – *VEGFR2* (*KDR*) – не выявлено. Таким образом, полученные нами предварительные результаты могут свидетельствовать о мутациях *VHL* как о косвенных предикторах гиперэкспрессии лишь определенных его мишеней, что может иметь значение для оценки эффективности таргетных препаратов против РП, назначаемых пациентам с распространенными формами СК.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ БИОТРАНСФОРМАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ И ФОЛАТНОГО ЦИКЛА У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ

Мякошина Л.А., Поляков А.С., Колюбаева С.Н., Киссель А.В., Викторова Н.А., Титова А.А., Иванов А.М.

Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «ВМедА им. С.М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия

Введение. Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) является наиболее распространенным лейкозом среди взрослого населения Европы и Северной Америки и составляет около 30% от всех лейкозов. Заболевание характеризуется гетерогенным течением. У одних больных болезнь протекает благоприятно, и их продолжительность жизни не отличается от средней по популяции. У других наблюдается резистентность к проводимой терапии, и продолжительность жизни короткая. Установлено, что при наличии цитогенетического маркера del(13)(q) прогрессирование опухоли идет более медленно, в то время как при выявлении маркеров del(11)(q), del(17)(p) быстрее, что приводит к более неблагоприятному прогнозу. Трисомия по хромосоме 12 имеет промежуточное значение, однако в ряде случаев может трансформироваться, также как и ХЛЛ с del(11)(q), в злокачественную лимфому. Необходимо отметить, что для прогноза важно не только процентное содержание маркерных хромосом, но и появление в ходе эволюции опухолевых клеток с дополнительными хромосомными повреждениями. К настоящему времени выявлены десятки генов, полиморфные варианты которых ассоциированы с канцерогенным риском различных опухолей. Однако данных о роли полиморфизма в онкогенезе ХЛЛ немного. Связано это с тем, что одни и те же полиморфные варианты ряда генов могут иметь противоположный эффект (проонкогенный или защитный) в зависимости от этнической принадлежности, тканевой специфичности и факторов внешней среды. Считается, что ХЛЛ является единственным гематологическим заболеванием, участие радиации в патогенезе которого пока не доказано. Увеличение числа больных ХЛЛ после аварии на Чернобыльской АС выявлено спустя много лет, и только используя математические модели, удалось впервые ассоциировать патогенез ХЛЛ с воздействием радиации. Наши результаты наблюдений за контингентом лиц, подвергавшихся воздействию ионизирующей радиации и страдавших ХЛЛ, подтверждают факты возникновения этого заболевания вследствие облучения. При любом токсическом воздействии, ксенобиотики должны подвергнуться метаболизму, в котором участвуют гены семейства цитохрома Р450. При наличии полиморфных вариантов этих генов процесс не завершается, либо совсем не происходит, что вызывает накопление токсинов. Что касается генов, участвующих в метаболизме фолатов,

то показано значение их в ответе пациентов на химиотерапию, в частности при ХЛЛ.

Цель. Изучение полиморфизма некоторых генов семейства цитохрома Р450 и генов, ассоциированных с нарушением метаболизма фолатов у больных ХЛЛ.

Материал и методика. Обследовано 38 больных ХЛЛ, средний возраст которых 63 года, 65 % из них - мужчины. Забор периферической крови осуществляли в пробирки с ЭДТА. Исследовали полиморфизмы следующих генов: цитохрома Р450 (*CYP2C9*:430C>T, rs1799853),(*CYP 2*C9:A>C,rs1057910),(*CYP*4F2C:C>T,rs2108622);*VKORC*1:(16 39G>A),rs99232231),*MTHFR*:(1298A>C,rs1801131);*MTHFR* :(677C>T,rs1801133);*MTR:*((2756A>G,rs1805087);*MTRR*:(66 A>G,rs1801394). Выделение ДНК и приготовление реакционных смесей проводили с помощью наборов фирмы «ДНК-Технология, Россия». Амплификацию ДНК и получение результатов осуществляли с помощью прибора DT-lite той же фирмы. Выявление цитогенетических маркеров осуществляли методом FISH, используя наборы фирмы ABBOTT, ув.90x10 (микроскоп Eclipse 90i, Nikon, Япония). Для оценки достоверности результатов использовали метод хи-квадрат и точный критерий Фишера.

Результаты. Распределение однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) генов цитохрома Р450 в группе больных ХЛЛ не отличалось от средне-популяционного значения. Выявлено увеличение ОНП гена VCORC1(табл.1) по сравнению со средне-популяционными значениями более чем в 2 раза.

Табл. 1. Распределение полиморфных вариантов генов *VCORC1* и *MTRR* у больных ХЛЛ

Ген	Генотипы, % (в скобках количество пациентов)					
	GG	GA	AA	AA_	AG	GG
VKORC1	29,7(11)	62,2(23)	8,1(3)			
MTRR				21,1(8)	42,1(16)	36,8(14)

Известно, что процентное содержание ОНП в среднеазиатских популяциях выше, чем в европейских, однако среди исследованных пациентов были только европейцы. Изучение ОНП генов фолатного цикла пациентов с ХЛЛ показало увеличение ОНП во всех генах, при этом самый высокий уровень ОНП наблюдался в гене *MTRR* и составил 78,9%. Соотношение гетерозиготных и гомозиготных вариантов ОНП этого гена статистически не различались (42,1 и 36,8%). При сравнении ОНП групп больных ХЛЛ с делецией 13q (более благоприятный прогноз и больных с неблагоприятным прогнозом (с del(17)(p),+12, del(11)(q)), показано, что процент ОНП *MTRR* гена на 20% выше значения во второй группе (табл.2).

Табл. 2. Распределение полиморфных вариантов генов *MTRR* у пациентов с ХЛЛ

Генотипы, % (в скобках количество пациентов)					
с благоприятным прогнозом			с неблагоприятным прогнозом		
AA	AG	GG	AA	AG	GG
10,5(4)	23,7(9)	5,3(2)	7,9(3)	18,4(7)	31,4(13)

Однако число гомозиготных форм ОНП при неблагоприятных прогнозах течения ХЛЛ значительно превышает их число в группе с более благоприятным прогнозом.

Заключение. Исследование ОНП в генах, ассоциированных с нарушением фолатного цикла у больных ХЛЛ, показало достоверное увеличение этого показателя по сравнению со средними по популяции независимо от выявленных прогностических цитогенетических маркеров. Однако при разделении пациентов на группы с благоприятным и неблагоприятным прогнозом (по цитогенетическим маркерам) в группе с неблагоприятным прогнозом значительно увеличивается доля ОНП. Кроме того, повышается число гомозиготных форм ОНП, составляя более 62% от доли всех точечных мутаций (ОНП) в гене *MTRR* у пациентов с неблагоприятным прогнозом при ХЛЛ.

Список литературы

1. Del Giudice I., Rossi D., Chiaretti S. et al. NOTCH1 mutations in +12 chronic lymphocytic leukemia (CLL) conferan unfavorable prognosis, induce a distinctive transcriptional profiling and refine the intermediate prognosis of +12 CLL. Haematologica. 2012. 97(3):437-41.

2. Austen B., Skowronska A., Baker C. et al. Mutation status of the residual ATM allele is an important determinant of the cellular response to chemotherapy and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia contain in gan11qdeletion.J.Clin.Oncology. 2007. 25:5448-7.

3. Овесян В.А., Росин В.А., Загоскина Т.П. и др. Возможная ассоциация полиморфизма генов ферментов трансформации ксенобиотиков с особенностями клинического течения хронического лимфолейкоза//Клин. Онкогематология.- 2012.-Т.-5, №3. Р.186-192.

Раздел 4. ИНФЕКЦИИ С ВОЗДУШНО-КАПЕЛЬНЫМ, КОНТАКТНО-БЫТОВЫМ МЕХАНИЗМОМ ПЕРЕДАЧИ ВОЗБУДИТЕЛЯ И ИХ ОСЛОЖНЕНИЯ

АНТИГЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ИММУННЫХ КОМПЛЕКСОВ В КРОВИ ДЕТЕЙ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Горина Л.Г.[1], Гончарова С.А.[1], Раковская И.В.[1], Бархатова О.И.[1], Крылова Н.А.[2]

[1]ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ, Москва, Российская Федерация

[2]Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва, Российская Федерация

Введение. Вопрос о значении антигенемии в патологии инфекционных заболеваний человека остается актуальным и в настоящее время. До сих пор остаются до конца не изученными механизмы персистенции бактериальных антигенов в макроорганизме и механизмы, обеспечивающие их длительное хранение. Ранее в наших публикациях (Горина Л.Г. и др., 2014) было показано, что циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК) представляют собой своеобразное депо сохранения не только антигенов и ДНК микоплазм, но и атипичных клеток микроорганизмов. В последние годы накопились многочисленные литературные данные, свидетельствующие об определенной роли ЦИК в патогенезе микоплазменных инфекций. По данным, приведенным в отечественных и зарубежных публикациях, при бронхиальной астме (БА) процент выявления *Mycoplasma pneumoniae (M. pneumoniae)* колеблется в пределах от 16% до 72%. Общность антигенных структур *M. pneumoniae* с глицерофосфолипидами тканей и I–антигеном мембран эритроцитов человека могут приводить к образованию перекрестно-реагирующих аутоантител и развитию иммунопатологических процессов при БА. В последнее время у больных с БА, наряду с *M. pneumoniae,* выявляется и *Mycoplasma hominis (M. hominis*).

Цель и задачи настоящего исследования. Уточнение роли длительно персистирующих антигенов и ДНК клеток *M. pneumoniae* и *M. hominis* в свободном состоянии и в составе циркулирующих иммунных комплексов в крови детей, больных БА.

Материалы и методы. Из клиники детских болезней I МГМУ имени И.М. Сеченова были получены 126 проб сыворотки крови детей, больных бронхиальной астмой (БА), в возрасте от 1 до 14 лет. В работе использовали *M. pneumoniae (FH)* и *M. hominis(H-34),* которые выращивали на жидкой среде, приготовленной по обычной методике, используемой для культивирования микоплазм. Антисыворотки к антигенам указанных видов микоплазм получали путём иммунизации кроликов фракциями цитоплазматических мембран клеток. Для идентификации в крови антигенов микоплазм в свободном состоянии использовали реакцию агрегат-гемагглютинации (РАГА), выявление антигенов в составе ЦИК в пробах сыворотки крови пациентов проводили методом прямой иммунофлюоресценции (РИФ), ДНК микоплазм - методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с диагностическими наборами ИнтерЛабСервис «АмплиСенсMycoplasmahominis–Eph», «АмплиСенс*Mycoplasmapneumoniae*–Eph», «МИККОМ–Eph» (для выявления ДНК *Mycoplasmaspecies (spp*). Общие ЦИК выделяли из сыворотки крови путем преципитации их 3,5% полиэтиленгликолем (6000 Da).

Основные результаты. При исследовании в РАГА 126 проб сыворотки крови, полученных от детей с БА, антигены *M.pneumoniae* в свободном состоянии были обнаружены в 73% случаев. Частота выявления антигенов *M. hominis* в сыворотке крови детей с БА составила 50%. Исследование специфических ЦИК, выделенных из сыворотки крови, показало, что в их составе содержатся как антигены, так и ДНК клеток *M. pneumoniae* и *M. hominis.* В составе ЦИК в РИФ в 55,5% случаев были обнаружены антигены *M. pneumoniae,* а в 46,8% **-** антигены *M. hominis.*

ДНК *M.pneumoniae* и *M.hominis* в образцах крови в свободном состоянии была выявлена в ПЦР в 7,14% и 16,6% случаев, в составе ЦИК, выделенных из сыворотки крови, в 26,98% и 46,8% соответственно. В качестве дополнительного исследования был использован качественный молекулярно-генетический метод выявления ДНК микроорганизмов рода *Mycoplasma* в исследуемом материале. С этой целью ЦИК, выделенные из сыворотки крови детей с БА (n- 53), были исследованы на присутствие ДНК микоплазм. В 31 образце были обнаружены ДНК *Mycoplasma spp,* что дополнительно подтверждает персистенцию ДНК в составе иммунных комплексов. После проведения этиотропного лечения у 16 детей удалось вторично проверить присутствие микоплазм в крови и в составе ЦИК (в основном, через 1,5 месяца, 3 и 6 месяцев). До лечения антигены *M.* pneumoniae и *M. hominis* были обнаружены в крови в 100% и 81,25% соответственно, после проведения этиотропного лечения - в 81,25%. В составе ЦИК в РИФ антигены обоих видов микоплазм были выявлены в 68,75 % (первый срок) и в 81,25% при повторном обследовании. ДНК M. pneumoniae и M. hominis в крови была обнаружена в 25% и 43,75% , а во втором сроке в 25% и 31,25% соответственно. В составе ЦИК ДНК клеток этих видов микоплазм была идентифицирована в 56,35 % и 43,75% случаев, при повторном обследовании – в 31,25% и 43,75% соответственно. Следует особо отметить, что через 6 месяцев после лечения (5 больных) и в одном случае через 1 год АГ и ДНК микоплазм были обнаружена в сыворотке крови или в ЦИК.

Заключение /выводы. Выявление специфических ЦИК и дифференциация их состава дает ценную информацию о длительности персистенции АГ и ДНК микоплазм у детей, больных БА. Для определения тактики ведения пациентов с длительной антигенемией, совершенствования методов контроля терапии и прогнозирования течения БА необходим комплексный подход к лабораторной диагностике микоплазменной инфекции.

ВЫЯВЛЕНИЕ МУТАЦИЙ УСТОЙЧИВОСТИ К МАКРОЛИДАМ В ГЕНЕ 23S рРНК *Mycoplasma pneumoniae* У ГОСПИТАЛИЗИРОВАННЫХ ВОЕННОСЛУЖАЩИХ С ПНЕВМОНИЕЙ

Эйдельштейн И.А.[1], Романов А.В.[1], Эйдельштейн М.В.[1], Зайцев А.А.[2], Раковская И.В.[3], Антипушина Д.Н.[2], Путков С.Б.[2], Акимова С.В[2], Бархатова О.И.[3], Козлов Р.С.[1]

[1] НИИ антимикробной химиотерапии ГБОУ ВПО СГМУ, Смоленск, Россия
[2] ФГКУ «Главный военный клинический госпиталь им. Н.Н. Бурденко», Москва, Россия
[3] ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи РАМН, Москва, Россия

Введение

В Вооруженных силах РФ болезни органов дыхания ежегодно сохраняют ведущие позиции в структуре инфекционных болезней и составляют более 80% всех случаев заболеваний. Для военно-медицинской службы одной из значимых респираторных патологий является внебольничная пневмония (ВП), которая характеризуется эпидемическим распространением среди личного состава, прежде всего, среди новобранцев, в осенне-зимний период. В этиологической структуре ВП около 15-20% приходится на долю *Mycoplasma pneumoniae* (MPN). Макролиды являются антибиотиками выбора для лечения заболеваний, вызванных MPN, однако публикации последних лет свидетельствуют о нарастании вторичной устойчивости к препаратам данной группы у клинических штаммов микоплазм, описаны случаи рецидива пневмонии или длительного ее течения на фоне терапии антибиотиками, известны также факты формирования устойчивости к азитромицину в процессе терапии. В ряде стран Европы, Азии и Северной Америки зарегистрированы локальные вспышки пневмоний, вызванных устойчивыми к макролидам штаммами MPN.

Основным механизмом формирования резистентности к макролидным антибиотикам является наличие мутаций в генах 23S рРНК, приводящее к конформационным изменениям пептидилтрансферазного центра и, соответственно, к снижению аффинности макролидов. В РФ до настоящего времени исследования чувствительности MPN к антибактериальным препаратам с использованием международно-принятых методов и интерпретационных стандартов не проводились. Отсутствуют также данные оценки распространенности мутаций устойчивости к макролидам у клинических изолятов MPN, что в значительной степени связано с отсутствием коммерческих молекулярно-диагностических систем для выявления значимых мутаций, а также с трудоемкостью классических методов амплификации и секвенирования генов 23S рРНК.

Цель и задачи

Настоящее исследование посвящено применению нового метода определения мутаций, ассоциированных с устойчивостью к макролидам у MPN для анализа клинических образцов, полученных от 28 пациентов с пневмонией.

Материалы и методы

Образцы мокроты (n=15) и соскобы с задней стенки глотки (n=13) были получены от 28 пациентов с рентгенологически подтвержденной пневмонией, находящихся на лечении в пульмонологическом отделении военного госпиталя, в период с 2014 по 2016 гг. В лаборатории госпиталя был исследован клинический материал на наличие ДНК *M. pneumoniae* с использованием коммерческого набора реагентов «АмплиСенс® *Mycoplasma pneumoniae*/*Chlamydophila pneumoniae*-FL» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия) на основе технологии ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Выделение ДНК проводили с использованием набора «Рибо-Преп» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия). Наличие мутаций в гене 23S рРНК определяли в лаборатории НИИАХ с использованием модифицированной методики ПЦР-РВ с эффектом гашения флуоресценции зонда праймером. Данный метод обеспечивает возможность выявления любых нуклеотидных замен в позициях 2063, 2064 и 2617 в гене 23S рРНК MPN (2058, 2059 и 2611 согласно нумерации для *E. coli*) с помощью анализа кривых плавления зондов непосредственно после проведения амплификации в мультиплексном формате (с использованием Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия)). При выявлении с помощью ПЦР-РВ отличной от контрольного образца температуры плавления зонда, свидетельствующей о наличии мутаций в гене 23S рРНК, проводили секвенирование внутреннего фрагмента гена длиной 747 п.н. с помощью наборов BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit и генетического анализатора Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies, CA, USA).

Основные результаты

Использованная в данном исследовании технология ПЦР-РВ обеспечивает возможность выявления различных (как известных, так и неизвестных) мутаций в области связывания олигонуклеотидных зондов и основана на эффекте переноса энергии флюоресценции между зондом и одним из праймеров. Контрольные образцы ДНК MPN, несущие мутации A2063G и A2064G, дают неразличимые пики, но хорошо дифференцируются от образцов «дикого типа» по температуре плавления зонда Mpn2063-Pb2 на 10°C. Разница в температуре плавления зонда Mpn2617-Pb для мутантного образца C2617G по сравнению с образцом дикого типа составила 8,5°C. Контрольный образец, имеющий замену в позиции A2064C, имел ΔTm=3°C, по сравнению с контрольным пиком A2063G/A2064G, и ΔTm=8°C по сравнению с образцом дикого типа. Таким образом, значимые мутации в позициях A2063G/A2064G и A2064C хорошо дифференцируются при скрининговом анализе и визуально отличаются от образцов «дикого типа».

Разработанный метод был использован для анализа 28 клинических образцов, содержащих ДНК MPN. Специфические последовательности 23S рРНК были выявлены в 25 образцах (относительная чувствительность 89,2%). Ни в одном образце не выявлено мутаций в позиции 2617. Два образца продемонстрировали характерное снижение температуры плавления зонда (ΔTm=10°C), сви-

детельствующее о наличии мутации в позиции 2063/2064 23S рРНК. Последующий анализ с использованием секвенирования подтвердил наличие однонуклеотидной транзиции, в области связывания зонда A→G в позиции 2063 для одного образца и A→G в позиции 2064 для другого. Известно, что данные мутации приводят к нарушению связывания макролидных антибиотиков с консервативным участком-петлей V домена 23S рРНК и, тем самым, к формированию устойчивости к препаратам данной группы у различных видов грамотрицательных микроорганизмов. В связи с тем, что MPN имеет один рибосомный оперон в геноме, подобные мутации являются доминантными, и резистентность в результате таких замен будет выявляться значительно чаще по сравнению с другими группами бактерий, где рибосомный оперон представлен несколькими копиями. Таким образом, роль замен A→G в позиции 2063 и A→G в позиции 2064 23S рРНК в формировании устойчивости MPN к макролидным антибиотикам является однозначно установленной.

Заключение. В ходе проведенного молекулярно-генетического скрининга образцов, выделенных от военнослужащих с внебольничной пневмонией, содержащих ДНК MPN, нами впервые выявлено два случая наличия типичных мутаций в 23S рРНК, связанных с резистентностью к макролидам. Факт обнаружения двух различных мутаций свидетельствует о возможности независимого формирования «классических» механизмов устойчивости к антибиотикам макролидного ряда у MPN. Разработанный нами подход может быть использован для быстрого выявления мутаций и прогнозирования возможной устойчивости респираторных микоплазм к этим антибиотикам, а также является дополнительным инструментом в тактике подбора адекватной терапии, особенно в случаях возникновения вспышек в организованных коллективах.

СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ И СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ РЕСПИРАТОРНОЙ АДЕНОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Агеева М.Р.[1], Яцышина С.Б.[1], Львов Н.И.[2]

[1]ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия
[2]ФГБОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ, Санкт-Петербург, Россия

Введение. В этиологической структуре спорадических ОРЗ аденовирусная инфекция составляет от 0,8% до 27%. Однако аденовирус человека является одним из основных этиологических факторов групповых заболеваний ОРВИ в организованных детских и воинских коллективах, вызывая в ряде случаев тяжёлую респираторную инфекцию, в том числе с летальными исходами. В настоящее время для лабораторной диагностики аденовирусной инфекции широко используют методы иммуноферментного анализа (ИФА) для обнаружения антител (АТ) к антигенам аденовируса и ПЦР для обнаружения его ДНК.

Целью исследования было оценить диагностическую значимость обнаружения специфических антител классов M, A, G к аденовирусу в парных и одиночных сыворотках методом ИФА для диагностики респираторной аденовирусной инфекции по сравнению с выявлением ДНК аденовируса видов B, C, E в респираторном тракте методом ПЦР.

Материалы и методы. Для оценки диагностической чувствительности выявления АТ к аденовирусу методом ИФА использовали собранный во время вспышек ОРЗ материал от 80 военнослужащих с признаками аденовирусной инфекции: мазки из носоглотки и парные сыворотки на 1-10 день заболевания (первая) и на 6-30 день (вторая).

Для оценки диагностической специфичности исследовали образцы мокроты и одиночные сыворотки от 43 взрослых больных ОРЗ и одиночные сыворотки от 90 условно-здоровых детей. Обнаружение ДНК аденовирусов в респираторных образцах методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени проводили с применением набора реагентов «АмплиСенс ОРВИ-скрин-FL» (Adv B,C,E) (ЦНИИЭ, Москва). С помощью секвенирования участка гена гексона устанавливали принадлежность обнаруженных аденовирусов к определенному типу. В сыворотках крови определяли АТ к Adv классов M, A, G с помощью наборов «Anti-Adenovirus ELISA (IgG/IgM/IgA)» («Euroimmun», Германия).

Исследование сывороток (одиночных и парных) проводили одновременно (в одном опыте). Для диагностики острой инфекции диагностически значимым считали обнаружение IgM и IgA по меньшей мере в одной из сывороток, и увеличение количества IgG в 2 и более раз во второй сыворотке по сравнению с первой.

Основные результаты. У 80 военнослужащих с признаками аденовирусной инфекции в респираторном тракте методом ПЦР обнаружена ДНК аденовирусов 4, 7 и 55 типов, а методом ИФА обнаружены диагностические концентрации специфических к аденовирусу IgM в 0%, IgA – в 36,25%, Ig G – в 98,75% случаев. По данным производителя тест-системы IgG обнаруживаются у 64,3% здоровых взрослых. В этой связи диагностическое значение может иметь только динамика количества IgG. При этом диагностическое повышение количества IgG во второй сыворотке по сравнению с первой было зарегистрировано только у 32,5% обследованных больных аденовирусной инфекцией. По сравнению с обнаружением ДНК аденовируса методом ПЦР диагностическая чувствительность выявления Ig A, M, G к аденовирусу составила 57,5%.

У 43 взрослых больных ОРЗ, у которых методом ПЦР ДНК аденовируса не была обнаружена, была установлена другая вирусная или бактериальная этиология заболевания, в одиночных сыворотках диагностические

титры IgG против аденовируса определялись в 81% случаев, IgA – в 2%, а IgM отсутствовали. В группе условно-здоровых детей диагностические титры Ig G к аденовирусу выявлены в сыворотках в 56,6% случаев, Ig A – в 6,7%, IgM – в 3,3%.

Заключение. Для диагностики острой респираторной аденовирусной инфекции взрослых нецелесообразно определение специфических АТ методом ИФА в связи с его низкой (57,5%) диагностической чувствительностью выявления Ig A, M, G к аденовирусу по сравнению с обнаружением ДНК аденовируса в ПЦР.

Использование ИФА в одиночных сыворотках при диагностике респираторной аденовирусной инфекции у детей может приводить к ложноположительным результатам, поскольку у 10% условно-здоровых детей выявляются IgM и IgA.

Исследование только одиночных сывороток для определения IgG может приводить к гипердиагностике аденовирусной инфекции, так как IgG обнаруживаются у 56,6% условно-здоровых детей и у 81% взрослых, больных ОРЗ другой этиологии.

РОЛЬ АДЕНОВИРУСОВ В ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ

Агеева М.Р., Яцышина С.Б., Петухова Е.В., Паркина Н.В., Шипулина О.Ю.

ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение. По современной классификации выделяют 68 типов аденовируса человека, относящихся к 7 видам (A-G). В зависимости от вида и типа вируса могут поражаться различные ткани и органы, аденовирусная инфекция характеризуется различными клиническими проявлениями от инаппарантной до тяжелых форм инфекции с летальным исходом. С острыми респираторными заболеваниями ассоциированы аденовирусы видов B, C, E, с кератоконъюнктивитами – D, с гастроэнтеритами – F, с гастритами – G. Аденовирусы A обнаруживаются в фекалиях здоровых людей и редко вызывают заболевания. Однако у иммунокомпрометированных пациентов все виды аденовирусов человека могут вызывать тяжёлые, включая генерализованные формы инфекции. Аденовирусная инфекция встречается в виде спорадических случаев, семейных очагов и является одной из наиболее частых причин вспышек ОРВИ во вновь сформированных изолированных коллективах [1].

Целью исследования было определить роль различных аденовирусов в возникновении острых форм заболеваний у разных групп пациентов и уровень носительства аденовирусов в разных локусах биологического материала.

Материалы и методы. Исследованы назофарингеальные мазки, мокрота и эндотрахеальные аспираты от 5224 больных ОРЗ (4471 госпитализированных детей и наблюдавшихся на амбулаторном приеме 623 детей и 140 взрослых) и назофарингеальные мазки 652 условно-здоровых детей и 96 взрослых, собранные за 2004-2016 годы.

Также изучались образцы от иммунокомпрометированных пациентов: БАЛ и мокрота больных пневмонией 138 взрослых ВИЧ-инфицированных пациентов (стадия СПИД). Отдельно исследовались аденовирусы, вызвавшие 6 вспышек ОРЗ у военнослужащих за 2010-2015 гг. и аденовирусы, найденные в аутопсийном материале умерших от пневмонии.

Для оценки уровня носительства аденовирусов в кишечнике и на конъюнктиве проверены образцы фекалий от 126 здоровых взрослых и 202 детей и мазки с конъюнктивы от 97 условно-здоровых детей.

Обнаружение ДНК аденовирусов B,C,E в образцах проводили методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени с применением набора реагентов «АмплиСенс ОРВИ-скрин-FL» (ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии», Москва). ДНК Adv выявляли также с помощью лабораторной методики референс-центра по мониторингу за инфекциями верхних и нижних дыхательных путей ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора для обнаружения аденовирусов всех типов. С помощью секвенирования участка гена гексона устанавливали принадлежность обнаруженных аденовирусов к определенному виду и типу.

Основные результаты. Аденовирусы обнаружены в респираторных образцах у 4% больных ОРЗ взрослых и у 7% больных детей (при этом у 4% в ассоциации с другими возбудителями ОРВИ).

Респираторная Adv инфекция проявлялась в различных клинических формах, в большинстве случаев обнаружения Adv был поставлен диагноз ОРВИ, реже бронхит (8,9%), пневмония (7,2%) и ангина (7%). Чаще встречались аденовирусы видов B и C (45,4 и 44,3 % моноинфекций), реже вида E (9,2%). Наиболее распространены были типы 3 и 2, (32,6% и 23,5% моноинфекций), реже выявлялись типы 7 (11,2%), 6 (11,2%) и 4 (9,2%).

Чёткой зависимости между типом аденовируса и клинической картиной заболевания установлено не было. Аденовирусы типов 2 (вид C) и 3 (вид B) обнаруживались при разнообразных диагнозах. Однако при отитах чаще обнаруживался серотип 2, при пневмониях – типы 3 и 7 (вид B), при ангинах – тип 3. В группе пациентов, у которых наряду с ОРВИ присутствовали симптомы острой кишечной инфекции, также преобладал тип 3. У больных ОРВИ с симптомами поражения ЖКТ аденовирусы в респираторном тракте выявлялись достоверно чаще, чем у других больных ($p<0,025$) (подробнее с результатами можно ознакомиться в «Журнале микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии». 2015, № 5, стр. 50-57).

Вспышки аденовирусной инфекции у военнослужащих были вызваны типами 7 и 4 (вид E).

В аутопсийном материале умерших от пневмонии найдены аденовирусы серотипов 7 и 5 (вид C).

У 2,9% ВИЧ-инфицированных пациентов, больных пневмонией выявлены аденовирусы типов 2, 3 и 55 (вид B).

Аденовирусы выявлялись у условно-здоровых детей в 0,46% случаев в респираторном тракте (типы 1 и 2), в 1% - на конъюнктиве (тип 7), в 5% - в кишечнике (типы 1, 2, 5, 6). У здоровых взрослых аденовирусы в респираторном тракте найдены в 0%, а в кишечнике – в 2,4% (типы 5, 38 и 27(вид D)).

Заключение. Всего идентифицировано 11 типов 4х видов аденовирусов. Респираторные инфекции вызывали 9 типов видов B,C,E, при этом большая часть ОРЗ тяжёлого течения, а также вспышек у военнослужащих была связана с типом 7.

Доля пневмоний, вызванных аденовирусом, у ВИЧ-инфицированных была сопоставима с долей аденовирусной инфекции в структуре спорадической заболеваемости ОРЗ взрослых.

Показаны низкие уровни носительства аденовирусов на конъюнктиве у детей, а также в респираторном тракте, как у взрослых, так и у детей. Тогда как уровень носительства в кишечнике составил 2,4% у взрослых и 5% у детей. Все типы вируса, выявленные в ходе данной работы у здоровых носителей в кишечнике и в респираторном тракте, по данным ряда исследований могут вызывать тяжёлые инфекции у иммунокомпрометированных пациентов, включая пневмонии, гепатиты и диссеменированную болезнь[2,3]. При этом аденовирусы вида D, выявленные в кишечнике, но не обнаруженные в респираторном тракте носителей и иммунокомпетентных больных ОРЗ, иногда являются причиной пневмонии у ВИЧ-инфицированных пациентов [2]. Таким образом, не исключено, что предшествующее вторичному иммунодефициту, носительство аденовирусов, прежде всего в кишечнике, может являться фактором риска развития тяжёлых инфекций.

Литература

1. Chmielewicz B. et al. Respiratory disease caused by a species B2 adenovirus in a military camp in Turkey. J Med Virol 2005; 77 (2): 232 – 237.

2. Hierholzer J.C. Adenoviruses in the immunocompromised host. CMR. 1992, 5(3): 262-274.

3. Echavarria M. Adenoviruses in immunocompromised hosts. CMR. 2008, 21(4): 704-715.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ НА БАЗЕ БУЗ ВО «ВОРОНЕЖСКИЙ ОБЛАСТНОЙ КЛИНИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ПРОФИЛАКТИКИ И БОРЬБЫ СО СПИД»

Донская М.А., Попович Ю.С., Ситник Т.Н.

БУЗ ВО «Воронежский областной клинический центр профилактики и борьбы со СПИД», Воронеж

Введение. Диагностические исследования на грипп и ОРВИ согласно СП 3.1.2.3117-13 «Профилактика гриппа и других острых респираторных вирусных инфекций» возложены на медицинские организации (МО). Ранее все объемы исследований проводились в ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Воронежской области» и ограничивались финансированием. На базе БУЗ ВО «ВОКЦПиБС» диагностика гриппа и ОРВИ методом ПЦР для государственных МО была внедрена с мая 2013 года с функциями централизации (субсидии из областного бюджета). Квоты на исследования рассчитывались согласно СП 3.1.2.3317-13 для обязательных контингентов (госпитализированных с тяжелыми и необычными формами заболевания; лиц с высоким риском неблагоприятного исхода гриппа и ОРВИ) на основании средних статистических данных за предыдущие годы и прогноза ситуации.

Цель работы: изучение и анализ эпидемиологической ситуации гриппа и других ОРВИ у жителей Воронежской области.

Материалы и методы исследования. Материалом для исследования служили мазки из носоглотки, забранные у больных в ранние сроки болезни. Для повышения качества исследований, МО получали пробирки с транспортной средой для респираторных мазков и зонды. Исследования выполнялись методом ОТ-ПЦР. Выявление РНК вирусов проводили с использованием мультиплексной тест-системы «АмплиСенс ОРВИ-скрин FL» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора № ФСР 2011/11258), «АмплиСенс® Influenza virus A/B-FL» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора № ФСР 2009/05010).

Результаты и обсуждение: В эпидсезон 2013-2014 гг. с низкой интенсивностью эпидпроцесса и пиком в марте (1443,2 на 100 тыс. нас.) от 790 больных получены 187 положительных результатов (подтверждение 23,7%). Структура представлена вирусами *гриппа* – 38,0% *грипп А* и 8,6% *грипп В; РС-вирусами* – 32,1%, *риновирусами* – 7,5%, *метапневмовирусами* – 3,7%, *аденовирусами* групп *B, C, E* – 6,4%, *парагриппа 1-4 типов* – 3,7%.

Эпидсезон 2014-2015 г.г. отмечен более высокими уровнями заболеваемости в феврале-марте (15792,4 и 15688,6 на 100 тыс. нас.). Обследовано 1289 больных с 554 (43,0%) положительными результатами; преобладали вирусы *гриппа* – 29,8 % *грипп А* и 19,3% *грипп В; РС-вирусы* – 11,9%, *риновирусы* – 12,8%, *метапневмовирусы* – 10,6%, *аденовирусы* групп *B, C, E* – 7,0%, *парагриппа 1-4 типов* – 5,1%, *корона-* 0,7% и *бокавирусы* – 2,7%.

В сезоне 2015-2016 г.г. высокая интенсивность эпидпроцесса отмечена с января и увеличилось число тяжелых форм.

С сентября 2015 по март 2016 включительно из 1928 обследованных обнаружены ДНК и РНК вирусов у 879 (45,6%). Доля вирусов *гриппа А* (*A/H1*-swine) - 62,2 %, 1 случай *гриппа В;* и 37,8 % пришлось на все вирусы ОРВИ (*РС-вирусы* - 8,4%, *риновирусы* -12,6%, *метапневмовирусы* - 0,5%, *аденовирусы* групп *B, C, E* - 3,8%, *парагриппа 1-4 типов* 8,2%, *корона-* 1,7%, *бокавирусы* 2,6%.)

Заключение. Диагностика респираторных инфекций на базе БУЗ ВО «ВОКЦПиБС» улучшает этиологическую расшифровку, ускоряет назначение противовирусной терапии. Доказана экономическая эффективность в снижении стоимости исследований для бюджета области.

ВАЛИДАЦИЯ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ПЦР-ДИАГНОСТИКИ ДИФТЕРИИ

Яцышина С.Б.[1], Елькина М.А.[1], Селезнева Т.С.[1], Щелокова В.Г.[2], Коновалова К.А.[2], Вайтович М.А.[3], Краус О.А.[3], Липатова Л.А.[4], Белоусова Л.В.[4], Куземцева С.В.[5], Кобяков А.И.[5]

[1]ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия
[2]ФБУЗ «ЦГиЭ в Самарской области», Самара, Россия
[3]ФБУЗ «ЦГиЭ в Омской области», Омск, Россия
[4]ФБУЗ «ЦГиЭ в Ленинградской области», Санкт-Петербург, Россия
[5]ФБУЗ «ЦГИЭ в Республике Башкортостан», Уфа, Россия

Введение. Дифтерия – инфекционное заболевание, возбудителями которого являются продуцирующие дифтерийный токсин (ДТ) штаммы *C.diphtheriae*. В развитых странах благодаря вакцинации эпидемическая ситуация находится под контролем. Однако в развивающихся странах, таких как Индия, Индонезия, Иран, Непал, Пакистан, Гана, Бразилия и др., дифтерия до сих пор является эндемичным заболеванием, протекающим в разных клинических формах. В странах Европы сообщается о случаях заболевания дифтерией среди иммигрантов. В результате иммунизации формируется защита только против токсина, то есть вакцинация не препятствует колонизации верхних дыхательных путей человека штаммами *C.diphtheriae*, не продуцирующими ДТ. В этих условиях возможна передача гена tox бактериофагами от токсигенных не токсигенным *C.diphtheriae*, и накопление их в популяции, что может сопровождаться развитием вспышек дифтерии. Отказ от вакцинации или нарушение схем вакцинации могут привести к значительному подъему заболеваемости, как это произошло в 1990-х годах в России и других странах бывшего СССР. ДТ по своим свойствам относится к сильнодействующим ядам, под воздействием которого нарушается синтез белка во всех органах больного, приводя к структурным и функциональным нарушениям: демиелинизации нервных волокон, парезам и параличам, изменениям миокарда. *C.pseudotuberculosis*, является патогеном рогатого скота и лошадей, обитает на слизистой оболочке верхних дыхательных путей человека (de Mattos Guaraldi A. Springer Netherlands.2014;P.15-37) и тоже может продуцировать ДТ при приобретении гена tox. *C.ulcerans* способны продуцировать подобный дифтерийному токсин, вызывая заболевание, сходное с дифтерией гортани (Tiwari T.S. Clin Infect Dis.2008;46(3):395-401), и кожную форму (de Mattos Guaraldi A.). Несмотря на иммунологическую идентичность токсинов *C.diphtheriae* и *C.ulcerans*, последовательности генов tox гомологичны только на 95% (Sing A. J Clin Microbiol. 2011;49:2485-98). В этой связи идентификация ДТ *C.diphtheriae* и токсина *C.ulcerans* является обязательным условием диагностики и мониторинга дифтерии. Однако поскольку *C.diphtheriae* имеет особое эпидемиологическое и клиническое значение, обязательно необходимо идентифицировать *C.diphtheriae* среди других видов токсигенных коринебактерий. ПЦР является одним из наиболее чувствительных и быстрых методов идентификации гена ДТ, также показано 100% соответствие результатов ПЦР для видовой идентификации потенциально токсигенных коринебактерий (*C.diphtheriae, C.ulcerans* и *C.pseudotuberculosis*) и стандартных биохимических тестов (Torres L. Mem Inst Oswaldo Cruz., 2013;108(3):272–9). Таким образом, необходимо внедрять в клиническую и эпидемиологическую практику быстрые диагностические тесты на основе ПЦР, позволяющие не только обнаруживать ген, кодирующий ДТ, но и идентифицировать *C.diphtheriae*, а также диагностировать сходное по клинической картине с дифтерией гортани заболевание, вызываемое токсигенными *C.ulcerans*.

Целью данной работы была оценка аналитических и диагностических характеристик набора реагентов «АмплиСенс Corynebacterium diphtheriae / tox-genes-FL» (ЦНИИЭ Роспотребнадзора) для определения ДНК *C.diphtheriae* и обнаружения генов, кодирующих токсины *C.diphtheriae* и *C.ulcerans* в биологическом материале (мазки со слизистой оболочки носоглотки, мазки со слизистой оболочки ротоглотки, мазки с пораженных участков, культуры микроорганизмов) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

Материалы и методы. В качестве 3-х диагностических мишеней в наборе использованы участки гена RpoB (идентификация *C.diphtheriae*), ген tox *C.diphtheriae* и ген tox *C.ulcerans.* Тест позволяет также обнаруживать внутренний контроль, использующийся с этапа экстракции ДНК, и детектирующийся в качестве четвертой мишени. Оценка аналитической чувствительности набора реагентов проводилась при исследовании образцов биологического материала (мазки из носоглотки и ротоглотки), искусственно контаминированных разведениями стандартных образцов предприятия (СОП), представляющих собой плазмидные векторы, несущие фрагменты ДНК *C.diphtheriae* и ДНК *C.ulcerans*.

Основные результаты. Специфическая активность оценивалась при тестировании ДНК 20 штаммов *C.diphtheriae* биоваров Mitis и Gravis и клинических изолятов 1975, 1979, 1981, 1984 и 2012 годов *C.diphtheriae* с различным фенотипом по токсигенности (из коллекции ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора и ФБУЗ ЦГиЭ), а также контрольного штамма *C.ulcerans* №675, несущего ген токсина. Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании ДНК следующих микроорганизмов: *C.pseudodiphtheriticum, C.pseudotuberculosis, C.xerosis, C.urealiticum, C.amycolatum, C.jeikeium, Streptococcus spp., M.catarrhalis, S.aureus, S.saprophiticus, H.influenzae, P.mirabilis, K.pneumoniae, P.aeruginosa, Mycobacteria tuberculosis 27294 105, Neisseria flava, Neisseria sicca, Neisseria mucosa, E. coli ATCC, M.pneumoniae, C.pneumoniae, B.pertussis, B.parapertussis, B.bronchiseptica, Legionella pneumophila, Sh.flexneri, Sh.sonnei, S.enteritidis, Y.enterocolitica*, а также геномной ДНК человека. При тестировании образцов ДНК

вышеперечисленных микроорганизмов и ДНК человека неспецифических реакций выявлено не было. Аналитическая чувствительность набора реагентов составила $1x10^3$ ГЭ/мл (копий/мл). Диагностическую чувствительность набора реагентов определяли тестированием модельных образцов биологического материала здоровых людей, содержащих разведения ДНК штаммов *C.diphtheriae* и *C.ulcerans*, а также СОП в известных концентрациях. Значение диагностической чувствительности набора, находящееся в зависимости от числа исследованных образцов, составило 98-100% для каждой мишени. Диагностическую специфичность набора реагентов определяли при исследовании 38 образцов от 20 человек, подлежавших профилактическому обследованию, и 140 образцов от 83 человек с диагнозами ангина, хронический тонзиллит, паратонзиллярный абсцесс, скарлатина, ларинготрахеит, в которых стандартным бактериологическим исследованием не были обнаружены коринебактерии. При ПЦР-исследовании положительных (либо сомнительных результатов) получено не было, значение диагностической специфичности набора, находящееся в зависимости от числа исследованных образцов, составило 98 -100% для каждой диагностической мишени.

Выводы. Доказаны высокие аналитические и диагностические характеристики набора реагентов при исследовании штаммов бактерий и модельных образцов клинического материала. После регистрации набор может быть использован в целях быстрого исключения или постановки предварительного диагноза, для профилактического обследования или по эпидемическим показаниям в качестве скрининга с последующим выделением культуры из ПЦР-положительных образцов с подтверждением токсигенности разрешенными стандартными тестами, а также с целью дополнительной идентификации вида *C.diphtheriae* при проведении культуральных исследований.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА ГРИППА A/H1N1pdm09 И A/H3N2

Трушакова С.В.[1], Абрамов Д.Д.[2], Краснослободцев К.Г.[1], Мукашева Е.А.[1], Гарина Е.О.[1], Колобухина Л.В.[1], Бурцева Е.И.[1]

[1]ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия
[2]ООО «НПО ДНК-Технология»

Введение

Вирусы гриппа А и В ежегодно вызывают подъемы заболеваемости среди людей. При этом особую важность представляет дифференциация вирусов гриппа типа А, которые имеют наибольшую опасность с эпидемиологической точки зрения, в связи с высокой изменчивостью его белков. Определение типа и субтипа вируса гриппа крайне необходимо для расшифровки этиологии эпидемий, оценки эффективности гриппозных вакцин и чувствительности противогриппозных препаратов. Классическое типирование и субтипирование вирусов гриппа проводят на основе антигенных свойств поверхностных гликопротеинов вируса в реакции торможения гемагглютинации с использованием сывороток крови со специфическими антителами к вирусу гриппа. Это достаточно длительный и трудоемкий метод с применением уникальных труднодоступных реагентов. Применение метода ПЦР позволяет упростить и ускорить процесс субтипирования вирусов гриппа.

Цель

Целью данной работы являлось проведение испытаний набора реагентов для выявления РНК вируса гриппа A(H3N2) и A(H1N1)pdm09 методом ПЦР в режиме реального времени, разработанного ООО «НПО ДНК-технология».

Материалы и методы

В качестве исследуемого материала использовали панель из образцов:

- эталонный штамм вируса гриппа A(H1N1)pdm09: A/California/7/2009;
- эталонный штамм вируса гриппа A(H3N2): A/Perth/16/2009;
- эпидемические штаммы вируса гриппа A(H1N1)pdm09: A/IIV-Vladimir/64/2016, A/IIV-Moscow/71/2016, A/IIV-Orenburg/74/2016;
- эпидемические штаммы вирусов гриппа A(H3N2): A/Томск/04/2013, A/Томск/05/2013;
- образцы секционного материала (n=1) от пациентов с подтвержденным вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 в эпидсезон 2015-2016 гг.;
- носоглоточные смывы (n=29) от пациентов, госпитализированных в ИКБ 1 в эпидсезон 2016-2017 гг.;
- образцы зашифрованной панели WHO UK 2015, содержащие вирусы гриппа A(H1N1)pdm09, A(H3N2), A(H7N9), A(H5N1) и вирусы гриппа В.

РНК вируса гриппа выделяли при помощи наборов реагентов ООО «НПО ДНК-технология», ФБУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора и ZR Viral RNA Kit (Zymo Research, USA). Обратную транскрипцию проводили с использованием праймеров, входящих в наборы «Реверта-L». Полученные результаты сравнивали с данными тестирования указанных выше образцов наборами «АмплиСенс *Influenza virus A/B*» и «АмплиСенс *Influenza virus* А-тип» (ФБУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора). ПЦР-амплификацию кДНК с детекцией в режиме реального времени проводили на детектирующем амплификаторе «DT*lite* 4» (ООО «НПО ДНК-Технология») по методике, рекомендованной производителем набора.

Результаты

Как показали исследования, «Набор реагентов для выявления РНК вируса гриппа A(H1N1)&A(H3N2) методом ПЦР в режиме реального времени» успешно выявлял кДНК вирусов гриппа в эталонных и эпидемических штаммах вируса гриппа А. При сравнительном субтипировании 29 носоглоточных смывов, в которых был ранее де-

тектирован грипп А с помощью тест-системы «АмплиСенс *Influenza virus* A/B», был определен субтип вируса гриппа A(H1N1)pdm09 в двух образцах, вируса гриппа A(H3N2) – в 22 образцах. В остальных 6 пробах субтип вируса гриппа установить не удалось. Полученные результаты также были подтверждены с помощью тест-системы «АмплиСенс *Influenza virus* A-тип». Тестирование системы на панели других субтипов вирусов гриппа (штаммы вируса гриппа B, A(H7N9), A(H5N1) подтвердило специфичность системы – все образцы были отрицательными. При исследовании контрольной панели образцов ВОЗ были получены верные результаты во всех зашифрованных пробах.

Заключение

Настоящее испытание продемонстрировало, что «Набор реагентов для выявления РНК вируса гриппа A(H1N1)&A(H3N2) методом ПЦР в режиме реального времени», разработанный ООО «НПО ДНК-Технология», является специфичным тестом для субтипирования вирусов гриппа А и может эффективно применяться в эпидемиологических службах для расшифровки случаев гриппозной инфекции и для мониторинга эпидемиологической обстановки.

РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДНК *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* И *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ (ПЦР) С ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ

Елькина М.А., Яцышина С.Б., Рентеева А.Н., Томская Ю.О.

ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение. *S.pneumoniae* и *H.influenzae* могут как бессимптомно колонизировать слизистые оболочки носо- и ротоглотки человека, так и вызывать заболевания нижних дыхательных путей и генерализованные инфекции. *S.pneumoniae* является основным возбудителем внебольничной пневмонии (30-80% ВП) у всех возрастных групп [1], менингитов (5-26%) у детей [2]. *H.influenzae* является причиной 30% ОРЗ, в т. ч. ВП, бронхитов у детей до 5 лет и гнойного менингита (>50%) [3] *S.pneumoniae* и *H.influenzae* выявляют в 80% острых средних отитов (ОСО) [4]. В лабораторной диагностике этих инфекций основным является бактериологический метод. Чувствительность метода может снижаться в связи с терапией антибиотиками, неправильным хранением и транспортировкой материала. *S. pneumoniae* дает рост из материала цельной крови менее чем в 5%, мокроты – менее чем в 20% случаев ВП у детей [5]. Носительство *S.pneumoniae в* верхних дыхательных путях определяют у детей в пределах от 20 до 80%, что затрудняет этиологическую диагностику [6]. В России носительство *H.influenzae* у взрослых в эпидемический сезон может достигать 40% [3]. Таким образом, разработка быстрого и чувствительного метода количественного обнаружения *S.pneumoniae* и *H.influenzae,* позволяющего дифференцировать этиологию от носительства является актуальной задачей. Одним из таких методов является амплификация фрагментов нуклеиновых кислот. В качестве мишеней в ПЦР для идентификации *S.pneumoniae* используют гены *lytA*, *ply*, cpsA. Ген *lytA* представлен у *S.mitis, S.oralis* и *S.intermedius* [7], что снижает специфичность исследования. При амплификации гена *ply* могут наблюдаться неспецифические реакции при исследовании материала из дыхательных путей. Локусы Spn9802, Spn9828, MFP1029, MFP1048, gyrB и cpsA показывают высокую специфичность. Использование комбинации праймеров для генов *cpsA* и *lytA* позволяет дифференцировать *S. pneumoniae* и *S. pseudopneumoniae* идентичные (≈100%) нуклеотидной последовательностью 16S рРНК, однако может «пропускать» бескапсульные пневмококки. *H.influenzae* необходимо дифференцировать от *H.haemolyticus*. В отношении *H.influenzae* и *H.haemolyticus* чувствительность и специфичность ряда ПЦР-тестов, направленных на детекцию гена *hpd,* составляет 89% и 98%, гена *fucK* - 64% и 100%. При использовании одновременно двух генов-мишеней (*hpd* и *fucK*) для идентификации *H.influenzae* чувствительность и специфичность составила 92% и 98%, соответственно [8].

Цель. Целью данной работы была разработка набора реагентов для определения количества ДНК *S.pneumoniae* и *H.influenzae* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

Материалы и методы. В качестве мишеней выступали участки локуса *Spn9802 S. pneumoniae* и гена *hpd H.influenzae.* Для расчета концентрации ДНК возбудителя были использованы калибраторы, представляющие собой плазмидные векторы pGem-t, несущие участки геномов *H.influenzae* и *S.pneumoniae.* В качестве референтных методов при оценке диагностической чувствительности и специфичности набора использовались культуральные и секвенирование ДНК (ген RpoB, 16S рРНК) дискордантных образцов.

Основные результаты. Специфическая активность подтверждалась при исследовании не подвергавшихся типированию клинических изолятов *H.influenzae* и штамма тип B, изолятов *S.pneumoniae* следующих серотипов: 2, 3, 4, 6A, 6B, 7FA, 8, 9NL, 9V, 9VA, 10A, 11A, 11AD, 14, 15AF, 15B, 15BC, 18, 18ABCF, 19A, 19F, 22, 22FA, 23B, 23F, 37. Оценка аналитической специфичности набора проводилась при исследовании следующих штаммов микроорганизмов: *S.pyogenes, S.agalactiae, S.oralis, S.salivarius, S.mitis, S.anginosus, H.parainfluenzae, H.parahaemoliticus, E.coli; а также микроорганизмов родов Neisseria, Moraxella, Mycoplasma, Staphylococcus, Bordetella, Chlamydophila*. При тестировании образцов ДНК вышеперечисленных организмов и ДНК человека неспецифических реакций выявлено не было. Оценка аналитической чувствительности

(предела детекции) проводилась на образцах биологического материала (мокрота, мазки из носо- и ротоглотки, жидкость из полости среднего уха, бронхо-альвеолярный лаваж (БАЛ), кровь, аутопсийный материал, ликвор), искусственно контаминированных разведениями стандартных образцов предприятия (СОП), представляющих собой плазмидные векторы, несущие фрагменты ДНК *S.pneumoniae* и ДНК *H.influenzae*. Линейный диапазон измерения составил $5x10^3$–$1x10^8$ ГЭ/мл (копий/мл), предел детекции - $1x10^3$ ГЭ/мл для обеих бактерий. Диагностическую чувствительность и специфичность определяли при исследовании образцов от больных, а также модельных образцов, приготовленных на биологическом материале с добавлением культур бактерий. Всего было исследовано 1495 образцов (311 образцов мокроты; 193 – БАЛ; 269 – жидкости из полости среднего уха; 267 – мазков со слизистой носо- и ротоглотки; 141 – ликвора; 212 – цельной крови; 102 – аутопсийного материала). Диагностическая чувствительность и специфичность набора составила для материала разного типа 92-100% в зависимости от числа независимых реакций, при этом неспецифических реакций выявлено не было.

Заключение. Был разработан набор реагентов для количественного определения ДНК *S.pneumoniae* и *H.influenzae* в биологическом материале методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. Набор может быть использован для этиологической диагностики при исследовании материала, полученного от больных с заболеваниями верхних и нижних дыхательных путей, острым средним отитом, менингитом и другими инфекциями, вызванными *S.pneumoniae* и *H.influenzae*.

Список используемой литературы

1. Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний: Методические указания. — М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2014.— 39 с.;

2. Эпидемиология и вакцинопрофилактика инфекции, вызываемой Streptococcus pneumoniae: Методические рекомендации. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011. — 28 с.;

3. Крамарь Л.В., Хлынина Ю.О. Гемофильная инфекция у детей: проблемы и перспективы // Лекарственный вестник. – 2011. – Т. 6. - №3 (43). – С. 42-47;

4. Vergison A. Microbiology of otitis media: A moving target // Vaccine. – 2008. – S. 26. – P. - 5-10;

5. Korppi M., Leinonen M., Ruuskanen O. Pneumococcal serology in children's respiratory infections // European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. – 2008. – Vol. -27. №3. – P. - 167–175;

6. Маркелова Н.Н., Хотько Н.И. Особенности носительства *S.pneumoniae* и *H.influenzae* у детей с хроническими заболеваниями верхних дыхательных путей // Фундаментальные исследования. – 2013. №3. С. – 110-113;

7. Luznik D., Kosnik M., Tomic V. Comparison of Seeplex PneumoBacter aCE Detection assay and in-house multiplex PCR for the identification of Streptococcus pneumoniae // New Microbiologica. – 2015. – Vol. 38. - №5. - P. - 51-58;

8. Hinz R., Zautner A.E., Hagen R.M. et al. Difficult identification of Haemophilus influenzae, a typical cause of upper respiratory tract infections, in the microbiological diagnostic routine // European Journal of Microbiology and Immunology. – 2015. – Vol. 5. - №1. – P. - 62-67.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ В ДИАГНОСТИКЕ РЕСПИРАТОРНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Маркарян А.Ю.[1], Поляков В.С.[2], Артебякин С.В.[2], Вялых И.В.[1], Бурнатова Е.Н.[1], Рябухин И.В.[1], Григорьева Ю.В.[3], Мальчиков И.А.[1]

[1]-ФБУН «Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций» Роспотребнадзора, Екатеринбург, Россия
[2]-ФГУ «1026 ЦГСЭН» МО РФ, Екатеринбург, Россия
[3]-ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Екатеринбург, Россия

Введение

Острые респираторные заболевания среди населения могут быть вызваны широким спектром инфекционных агентов, что затрудняет постановку диагноза на основе одного клинического заключения, приводит к неизбежным врачебным ошибкам, неэффективнорсти проводимого лечения и развитию осложнений. Для дифференциальной диагностики такого рода заболеваний требуется их подтверждение современными лабораторными методами. Одним из таких методов является ПЦР в режиме реального времени [1, 2, 3, 4].

Целью и задачей исследований являлась оценка диагностической ценности метода полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ) при дифференциальной диагностике респираторных вирусов.

Материалы и методы

Для проведения исследований использован клинический материал (мазки со слизистой оболочки полости носа) от пациентов с симптомами ОРВИ, отобранный в период подъема заболеваемости гриппом (эпидсезон 2015-2016 гг.). Под наблюдением находилось 2 закрытых коллектива МО РФ. Средний возраст лиц первого коллектива составил 13±2,6 лет, второго - 18±1,6 лет. Критериями включения пациентов в исследование являлось обращение их в первые трое суток с момента повышения температуры тела, развития симптомов интоксикации и катарального воспаления дыхательных путей. Сбор клинических образцов проходил с соблюдением критериев хранения и транспортировки.

Выделение вирусных РНК/ДНК и синтез кДНК проводили с использованием наборов реагентов «РИ-

БО-преп» и «Реверта-L». Верификацию результатов проводили с помощью коммерческих наборов реагентов для амплификации и идентификации кДНК вируса гриппа: «АмплиСенс Influenza Virus A/B-FL» (вирусы гриппа типов А и В), «АмплиСенс Influenza virus A-тип-FL» (вирус гриппа A(HINI) и A(H3N2)), «АмплиСенс Influenza Virus A/H1-swine-FL» (пандемический вариант вируса гриппа H1N1(2009), «АмплиСенс ОРВИ-скрин-FL» (hRSV-hMpv, hAdv-hBov, Rhinovirus, Parainfluenza 1-4, Coronavirus) производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия. Для амплификации использовали прибор Rotor Gene 6000 (Corbet Research, Австралия).

Основные результаты

В первом коллективе в 18,2% исследованных образцов была обнаружена РНК вируса пандемического гриппа A/H1N1(2009), В 4,5% - респираторно-синцитиального вируса, В 13,6% - парагриппа. Таким образом, доля образцов, в которых были выявлены респираторные вирусы, составила 36,4%, сочетанных инфекций при этом не обнаружено. В остальных образцах генетический вирусный материал не выявлен.

Во втором коллективе в 8,3% анализированных образцов была обнаружена РНК вируса пандемического гриппа A/H1N1(2009). В остальных образцах (91,7%) этиологический агент заболевания не установлен.

Заключение

Дифференциальная диагностика методом ПЦР-РВ позволила в кратчайшие сроки выявить в материале от больных специфическую РНК вирусов респираторной группы. Однако проведенные исследования позволяют предположить, что даже в изолированных коллективах в период эпидемического подъема заболеваемости гриппом возможна одновременная циркуляция различных представителей респираторных вирусов, особенно в младшей возрастной группе. Учитывая довольно низкий процент выявления возбудителей (8,3-36,4%), для постановки диагноза необходимо использовать более широкий спектр диагностических тестов, направленных на выявление различных этиологических агентов, в том числе бактериальной природы.

Список используемой литературы

1. Зайцев А.А., Клочков О.И., Миронов М.Б. и др. Острые респираторные вирусные инфекции: этиология, диагностика, лечение и профилактика// Изд. Бином, Москва – 2008. – С.37.

2. Лободанов С.А., Файзулоев Е.Б., Никонова А.А. и др. Этиология ОРВИ: новые аспекты// Санитарный врач. – 2011. – №10. – С. 4952.

3. Bustin S.A., Mueller R. Real-time revers transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis// Clin. Sci. (Lond.) 2005. – Vol. 109. – №4. – P. 365-379.

4. Yanagita M, Kuwamura Y, Kinoshita S et all. Development of a Real-Time Reverse Transcription PCR Assay System for Detection of Three Subtypes of Influenza A and Influenza B Viruses //Rinsho Byori. 2015 Dec; 63(12): P.1365-70.

ВОЗРАСТАНИЕ ВИРУЛЕНТНОСТИ ПАНДЕМИЧЕСКИХ ВИРУСОВ H1N1/2009 ПРИ АДАПТАЦИИ К МЫШАМ BALB/C

Ломакина Н.Ф.[1,2], Садыкова Г.К.[2], Боравлёва Е.Ю.[1], Прилипов А.Г.[2], Гамбарян А.С.[1]

[1]ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН», Москва

[2]ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи», Москва

Продолжительная циркуляция РНК-содержащих вирусов в определенном хозяине, либо при его смене, приводит к возникновению мутаций в вирусном геноме и изменению фенотипических проявлений. Вирус гриппа H1N1pdm, возникший в 2009г и вызвавший пандемию, до сих пор выделяется в период сезонных заболеваний ОРВИ.

Чтобы оценить характер изменчивости и вирулентности вируса H1N1pdm, вирус A/Hamburg/05/2009 (Hb05) последовательно пассировали через легкие мышей в двух независимых экспериментах. Патогенность вирусов оценивали на мышах линии Balb/c по выживаемости и изменению веса. Для секвенирования вирусных геномов использовали реактивы BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits и прибор Applied Biosystems 3100 Genetic Analyzer. Структура полного генома 1094-MA представлена в GenBank (KY472231-KY472238).

Последовательное пассирование вируса на мышах и его адаптация к новому хозяину привели к резкому возрастанию вирулентности. Изначально апатогенный для мышей вирус после 10-12 пассажей при интраназальном инфицировании стал патогенным. По результатам нескольких повторов титрования на мышах, летальная инфицирующая доза исходного вируса Hb05 превышала 10^5 ТЦИД$_{50}$, в то время как для вариантов HH09-MA и 1094-MA, адаптированных к мышам (MA) в двух независимых экспериментах, летальная доза составила 10^1-10^2 и 10^1 ТЦИД$_{50}$, соответственно. Высокая вирулентность сохранялась на протяжении последующих пассажей. Секвенирование варианта HH09-MA (пассаж 17) обнаружило 8 аминокислотных мутаций относительно исходного штамма: в NA (R430Q), HA* (G158E, D225G); NP (Q4K, G16D); PB2 (V686M); PA (F35L, A651T). Анализ этих мутаций описан нами ранее. В другом варианте, 1094-MA, произошло 7 аминокислотных замен: в HA (G158E, R224K, D225G); делеция аминокислот 56-67 в NA, в NP (H289Y), PA (N92S), PB1 (M317V). Примечательно, что адаптация к мышам одного и того же исходного

* Нумерация по H3

штамма A/Hamburg/5/2009 (H1N1) в двух независимых экспериментах привела в конечном итоге к формированию высоковирулентных вариантов с отличающимся набором мутаций. Общими оказались лишь две мутации в HA G158E и D225G.

Необычным было появление делеции из 12 аминокислот в стеблевом участке нейраминидазы. Случай **уникальный** для вирусов H1N1pdm. С помощью программы BLAST (NCBI) был найден всего один штамм в GenBank со смещенной делецией в п.60-71. Причем этот штамм A/Belgium/145-MA/2009 так же был получен в результате 9 пассажей на мышах Balb/c вируса H1N1pdm, выделенного от человека.

Мы сравнили данные разных исследователей, проводивших адаптацию к мышам Balb/c вирусов H1N1/2009pdm «калифорнийской» группы - A/California/04/2009 и A/TN/1-560/09 (Ilyushina et al, 2010), A/Belgium/145-MA/2009 (GenBank KJ867559-KJ867566) - и вируса A/Hamburg/04/2009: HH04-3ma (Seyer, et al, 2012), HH09-MA и 1094-MA (Гамбарян, наст. раб.). Адаптация к новому хозяину за 3-12 пассажей приводила к усилению вирулентности и изменениям на молекулярном уровне.

Замены в адаптированных к мышам вариантах относительно исходных вирусов H1N1pdm A/Hamburg/04/2009 (A/Hb/04/09) и A/California/04/2009 (A/CA/04/09)

Вирус	HA (по H3)							NA			NP					PA						PB2			PB1	
	Антигенные сайты																									
			Sa	Sa	Sb	Ca2	Ca2																				
	42	125	158	166	186	224	225	32	del	430	4	16	77	101	289	3	35	92	295	623	651	158	677	686	317	353
A/Hb/04/09	L	K	G	K	S	R	D	T	-	R	Q	G	K	D	H	D	F	N	P	E	A	E	E	V	M	K
HH04-3ma				E			*G*	I	-								*L*									
HH09-MA**		K/N*	*E*				*G*	T(I)*	-	Q	K	D					*L*				T			M		
1094-MA**			*E*			*K*	*G*		*56-67*						*Y*		S								V	
A/CA/04/09	L	K	G	K	S	R	D	I	-	R	Q	G	K	D	H	D	F	N	P	E	A	E	E	V	M	K
A/CA/04/09-MA1			*E*		P		*G*		-					G								G				
A/CA/04/09-MA2			*E*		P		*G*		-					G												
A/TN/1-560/09	L	K	G	K	S	R	D	I	-	R	Q	G	K	D	H	D	F	N	L	E	A	E	E	V	M	K
A/TN/1-560/09-MA1		N				*K*			-						*Y*				P			A				
A/TN/1-560/09-MA2						*K*			-						*Y*				P							
A/Bel/145-MA	I		*E*		S		*G*	I	*60-71*				R		*Y*	G			P	G			G			R

Примечание:

Исходные вирусы выделены цветом, для их MA вариантов приведены только отличающиеся аминокислоты. Одинаковые замены обозначены курсивом.

*Временные мутации, наблюдаемые на промежуточных пассажах.

**Варианты, полученные в настоящей работе. Исходный вирус A/Hamburg/05/2009 идентичен A/Hamburg/04/2009.

Все MA варианты отличаются суммарным набором мутаций, хотя в некоторых позициях наблюдаются совпадения. Остались неизменными белки генов M и NS. По всей видимости, одинаковые мутации в HA (G158E, R224K, D225K) носят адаптационный характер, т.к. расположены в антигенных сайтах на поверхности молекулы и входят в состав сайта взаимодействия с рецептором. Основную роль играют мутации R224K и D225K, которые способствуют переключению с одного типа рецепторов на другой, что позволяет вирусу эффективно размножаться в нижних отделах легких и приводит к возрастанию вирулентности. По отдельности одиночные мутации в полимеразных белках и NP в разной степени могут влиять на полимеразную активность. Замена в PA F35L усиливает (Seyer, et al, 2012), а мутация в NP H289Y существенно не влияет на полимеразную активность (Ilyushina et al, 2010). Одновременное присутствие мутаций в разных белках оказывало синергичное действие на вирулентность.

Суммируя данные, можно заключить следующее.

Патогенность имеет полигенную природу. Совокупный набор мутаций в адаптированных к мышам Balb/c вариантах вирусов H1N1/2009pdm носит случайный характер. Первостепенную, но не решающую роль имеют замены в HA, ответственные за связь с рецептором. Дополнительные мутации в NP и полимеразных белках в разной степени способствуют усилению вирулентности.

Не исключено, что резкое изменение патогенности варианта 1094-MA вызвано делецией в нейраминидазе, поскольку делеция в стеблевом участке NA вирусов H5N1 и H7N1 служит маркером их патогенности. Обнаружение аналогичной мутации еще в одном адаптированном к мышам вирусе A/Belgium/145-MA/2009 свидетельствует о потенциальной возможности появления подобного фактора патогенности в циркулирующих генах NA, имеющих общее происхождение с вирусами H1N1/2009pdm.

Работа поддержана грантом РФФИ 14-04-00547-а.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ И ВИРУСОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА H5N8, ВЫДЕЛЕННЫХ ВО ВРЕМЯ ВСПЫШЕК В РОССИИ В 2016 Г.

Марченко В.Ю., Суслопаров И.М., Гончарова Н.И., Святченко С.В., Колосова Н.П., Евсеенко В.А., Гудымо А.С., Михеев В.Н., Максютов Р.А., Рыжиков А.Б.

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

Введение. На сегодняшний день новый вариант высокопатогенного вируса гриппа H5N8 клады 2.3.4.4 представляет серьезную угрозу сельскому хозяйству, а также общественному здравоохранению. Это обусловлено высокой вирулентностью данных штаммов для млекопитающих, которая была показана в ряде исследований. Впервые возникнув в 2010 году в Китае, вирусы данной клады широко распространились, став причиной вспышек среди диких и домашних птиц в различных регионах мира. Было показано, что в 2014 году вирус гриппа H5N8 циркулировал в Юго-Восточной Азии и затем был занесен в Европу и Северную Америку с дикими птицами, использующими пути миграции, проходящие через территорию Российской Федерации. Это было подтверждено выделением на Дальнем Востоке России штамма A/wigeon/Sakha/1/2014/H5N8. Изучение биологических свойств данного вируса показало, что он являлся высокопатогенным и имел высокую степень идентичности со штаммами, циркулирующими в Европе и Юго-восточной Азии. После широкого распространения в 2014 году, вирус гриппа H5N8 продолжил циркулировать и к началу 2016 года, по данным OIE, вспышки H5N8 продолжали регистрироваться в Корее и Тайване. Тогда нами было высказано предположение о возможном повторном выделении вируса гриппа H5N8 в некоторых регионах России. Наша гипотеза получила подтверждение, когда в мае 2016 года H5N8 появился на территории Республики Тыва.

Результаты. В ходе мониторинга вируса гриппа птиц на территории Республики Тыва в мае 2016 года была зафиксирована гибель диких птиц. На озере Убсу-Нур были найдены трупы видов Серая цапля (*Ardea cinerea*), Чомга (*Podiceps cristatus*), Озерная чайка (*Larus ridibundus*), Крачка (*Sterna hirundo*) и один неопределенный вид дикой утки. Из биологического материала, взятого от погибших птиц, было выделено несколько штаммов вируса гриппа (номера в базе данных EpiFlu GISAID: EPI_ISL_230820, EPI_ISL_231684, EPI_ISL_231685). В результате типирования была определена принадлежность данных штаммов к субтипу H5N8 вируса гриппа. Филогенетический анализ показал высокую степень идентичности генов HA изученных штаммов с нуклеотидными последовательностями штаммов, выделенных в Юго-Восточной Азии и определил их принадлежность к кладе 2.3.4.4.

При титровании на РКЭ изученные штаммы показали высокую степень репродукции. Титр вируса в аллантоисной жидкости находился в диапазоне от 7.9 до 9.3 $\log ЭИД_{50}$/мл. Несмотря на различия в титрах между штаммами H5N8 2016 года, все они оказались более инфекционными для РКЭ, чем штамм A/wigeon/Sakha/1/2014 H5N8, выделенный в 2014 году в России, для которого данный показатель составил 6.2 $\log ЭИД_{50}$/мл. Также, изученные штаммы показали высокую степень вирулентности для мышей. При интраназальном заражении мышей Balb/c штаммами A/great crested grebe/Tyva/34/2016 и A/wild duck/Tyva/35/2016 показатель инфекционной дозы ($ИД_{50}$) составил 1,7 $\log ЭИД_{50}$ и 1,9 $\log ЭИД_{50,}$ соответственно. Значение летальной дозы ($ЛД_{50}$) было определено для штамма A/great crested grebe/Tyva/34/2016 и составило 2,3 $\log ЭИД_{50}$. Показатели вирулентности для изученных штаммов также были выше, чем у штамма A/wigeon/Sakha/1/2014 H5N8, выделенного ранее, и оказались сопоставимы с показателями у штаммов высокопатогенного вируса гриппа H5N1-субтипа, циркулировавших в России в 2015 году.

Анализ нуклеотидных последовательностей генома выделенных штаммов выявил ряд мутаций, отвечающих за вирулентность и изменение специфичности к хозяину. Так, при анализе аминокислотной последовательности гена HA были выявлены две замены N94S и T123P. Подобные замены по литературным данным обуславливают усиление рецепторного взаимодействия с α2-6 остатками сиаловых кислот, присутствующих на клетках ВДП человека. В гене NS1 были выявлены две мутации V226I и E227G, которые отвечают за вирулентность и, в частности, за ее усиление, которое было показано экспериментально в сравнении со штаммом 2014 года A/wigeon/Sakha/1/2014. Также в гене M2 была выявлена мутация I51V, которая, по литературным данным, совместно с мутацией S31N вероятно может указывать на устойчивость штаммов к антивирусным препаратам адамантанового ряда, однако последняя у исследуемых штаммов выявлена не была. Таким образом, можно заключить, что выделенные штаммы являются чувствительными к препаратам адамантанового ряда. Флюоресцентным методом ингибирования нейраминидазной активности (Fluorometric Neuraminidase Inhibition Assay), было показано, что все штаммы, выделенные в 2016 году, чувствительны к ингибиторам нейраминидазы. Помимо всего прочего, у штаммов A/black-headed gull/Tyva/41/2016 и A/wild duck/Tyva/35/2016 в гене PB2 была выявлена мутация I292V. Ранее было показано, что мутации в позиции 292 могут влиять на адаптацию вирусов к передаче от человека к человеку. Таким образом, нами получена важная информация, которая может использоваться при оценке пандемического риска циркулирующих вариантов вируса гриппа.

Заключение. Выделение вируса гриппа H5N8 клады 2.3.4.4 на озере Убсу-Нур показывает, что данный вирус продолжает циркулировать в природе, приобретая в ходе эволюции новые свойства. Это было показано проведением вирусологических и молекулярно-генетических исследований. Его повышенная вирулентность по сравнению с циркулировавшим ранее в России штаммом A/wigeon/Sakha/1/2014, а также потенциальная возможность передачи от человека к человеку заставляет уделять особое внимание распространению данного вируса, а также комплексно подходить к изучению его свойств.

Хотя, до сих пор не зарегистрировано ни одного случая заражения человека вирусом H5N8, нами показано, что возможность преодоления данным вирусом межвидового барьера сохраняется. Вполне вероятно, что вирус H5N8 в будущем также продолжит свое распространение в различные географические регионы, так как все виды птиц, от которых нами был выделен вирус, являются мигрирующими и имеют широкие территориальные связи. Это уже подтверждено тем, что в конце 2016 года новый вариант вируса гриппа H5N8 распространился и вызвал вспышки среди диких и домашних птиц в ряде Европейских стран, а в ноябре - декабре 2016 года данный вирус был выделен в России. Так, на территории республики Калмыкия, в Астраханской и Ростовской областях и Краснодарском крае были зарегистрированы вспышки среди сельскохозяйственной и дикой птицы, а в зоопарке города Воронеж вирус гриппа H5N8 поразил коллекцию редких видов диких птиц. В связи с этим необходимо продолжать исследование данного патогена, усиливать мониторинговые исследования с целью своевременного выявления циркулирующих вариантов вируса гриппа птиц в ключевых точках его распространения.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-60073 мол_а_дк.

МЕТОДЫ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИИ ВИРУСА ГЕРПЕСА ЧЕЛОВЕКА 6 ТИПА У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМИ РЕСПИРАТОРНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Мелёхина Е.В.[1], Музыка А.Д.[1], Петухова Е.В.[1], Лысенкова М.Ю.[2], Сильвейстрова О.Ю.[1], Ракчеева О.В.[1], Домонова Э.А.[1], Шипулина О.Ю.[1], Чугунова О.Л.[3], Горелов А.В.[1,4], Барыкин В.И.[5]

[1]ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия
[2]ГУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» РАМН, Москва, Россия
[3]Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва, Россия
[4]Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия
[5]ГАУЗ «Химкинская центральная клиническая больница», городской округ Химки, Россия

Введение. Герпесвирусы обладают плейотропностью, способностью к длительной персистенции в пораженных тканях и формированию хронических форм заболевания уже в детском возрасте. Инфицированность населения вирусами герпетической группы достигает 90%. На сегодняшний день актуальной является разработка схем диагностики активных форм герпесвирусных инфекций (ГВИ), требующих проведения противовирусной терапии.

Цель исследования. Определить частоту выявления маркеров инфекции вируса герпеса человека 6 типа (ВГЧ-6) (вирусоспецифических АТ-IgG, АТ-IgM) и ДНК ВГЧ-6 у детей с острыми респираторными инфекциями (ОРИ) и условно здоровых детей.

Материал и методы. Обследовано 187 пациентов в возрасте от 1 года до 17 лет: 95 ребенка с ОРИ, поступивших в детское инфекционное отделение Химкинской центральной клинической больницы (основная группа) и 92 клинически здоровых детей в ходе диспансеризации (контрольная группа). Группы были сопоставимы по полу и возрасту. Для диагностики ОРИ, ее осложнений, а также уточнения топики инфекционного процесса и степени тяжести заболевания, пациентам проводилось стандартное обследование, включавшее: осмотр, клинические анализы крови и мочи, биохимическое исследование крови с определением маркеров воспаления. По показаниям осуществляли рентгенографию грудной клетки, УЗИ органов брюшной полости и почек, ЭКГ, ЭЭГ, а также проводили консультации специалистов (отоларинголог, невролог).

Диагностика ГВИ (ВПГ I типа, ВЭБ, ЦМВ, ВГЧ-6) и последующая оценка стадии активности инфекционного процесса проводилась на основании комплекса лабораторных методов исследования: иммунохимических (ИФА), молекулярно-биологических (ПЦР).

Методом ИФА в сыворотке периферической крови выявляли вирусоспецифические АТ к АГ ГВИ классов IgM (качественное), IgG (полуколичественное, количественное) с использованием наборов реагентов ЗАО «Вектор–Бест» (РФ), руководствуясь инструкциями производителя. Методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» в образцах периферической крови, мазках из ротоглотки выявляли и количественно определяли ДНК: *Humanbetaherpesvirus* 5 (ВГЧ 5 типа, *CMV*), *Humanbetaherpesvirus* 6 (ВГЧ 6 типа, *HHV6*), *Humangammaherpesvirus* 4 (ВГЧ 4 типа, *EBV*). ПЦР–исследование выполняли при помощи наборов реагентов, разработанных в ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора. Экстракцию ДНК из различного биологического материала проводили при помощи набора реагентов «Рибо–преп» (РУ №ФСР 2008/03147), амплификацию – «АмплиСенс®*HHV6*–скрин–титр–FL» (РУ №ФСР 2010/09506), «АмплиСенс®*EBV–CMV–HHV6*–скрин–FL» (РУ №ФСР 2010/09502). Постановку и анализ результатов амплификации осуществляли на приборе с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» «Rotor–Gene Q» («Qiagen», ФРГ) в соответствии с инструкцией производителя. Сбор, хранение и транспортировку биологического материала выполняли согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности» (2010). Острая первичная

инфекция ВГЧ-6 устанавливалась при наличии виремии, выявлении вирусоспецифических АТ класса IgM, а также отсутствии АТ класса IgG. О реактивации хронической персистирующей инфекции свидетельствовала виремия, обнаружение вирусоспецифических АТ класса IgM и/или повышение уровня вирусоспецифических АТ класса IgG в 2,5 раза и более. Незначительное повышение уровня АТ IgG к АГ ВГЧ-6 (менее чем в 2,5 раза) при наличии ДНК ВГЧ-6 в мазках из ротоглотки расценивалось как проявление латентной формы инфекции.

Основные результаты. Все дети основной группы поступали в стационар с направляющим диагнозом ОРВИ, тонзиллофарингит и лихорадкой выше 38^{0}С. После проведенного обследования у 16 (15,7%) пациентов установлен инфекционный мононуклеоз, у 4 (3,9%) детей – лакунарная ангина, у 4 (3,9%) – внебольничная пневмония. Остальные дети (76,5%) выписаны из стационара с выздоровлением с диагнозом ОРВИ.

Маркеры ГВИ (вирусоспецифические АТ к АГ классов IgM, IgG) и/или ДНК возбудителей ГВИ выявлены у 90 детей (94,7%) основной группы и 88 контрольной (95,6%). Из них: инфекции ВЭБ определялись у 60 пациентов основной группы (63,2%) и 61 контрольной группы (66%), ЦМВИ – 44 (46,3%) и 51 (54,3%), соответственно; инфекции, обусловленной ВПГ I типа – 33 (34,7%) и 30 (32,6%), соответственно. Наиболее часто в основной и контрольной группе обнаруживали маркеры инфекции ВГЧ-6 и/или ДНК ВГЧ-6: 78 (82,1%) и 66 (71,7%) детей соответственно. В виде моноинфекции ВГЧ-6 встречалась реже, чем в составе микст–ГВИ: у 12 (12,6%) детей основной группы и 9 (9,7%) контрольной. При этом у детей с ОРИ активные формы инфекции ВГЧ-6 (острая первичная и хроническая персистирующая) встречались достоверно чаще (23%), чем среди клинически здоровых – 5% (p<0,05). В контрольной группе чаще встречались латентная форма – 66% и хроническая персистирующая без реактивации – 19%.

Из 78 образцов крови пациентов основной группы с выявленными маркерами ВГЧ-6 у 26 (33,3%) ДНК ВГЧ-6 не обнаружена, у 12 (15,4%) – ДНК ВГЧ-6 определена в концентрации менее 5 копий/10^5 клеток, у 34 (43,6%) – от 5 до 10^2 копий/10^5 клеток, у 4 (5,1%) – 10^2–10^3 копий/10^5 клеток, у 2 (2,6%) – 10^3 копий/10^5 клеток и более. Дополнительно среди пациентов основной группы проанализирована концентрация ДНК ВГЧ-6 в крови в зависимости от стадии инфекционного процесса. Вирусная нагрузка менее 10 копий/10^5 клеток достоверно чаще определяется у детей с реактивацией хронической инфекции (p<0,05, точный критерий Фишера), в то время как высокие уровни концентрации от 10^2 до 10^4 копий/10^5 клеток характерны для пациентов с острой первичной инфекцией ВГЧ-6 (p<0,05, критерий Хи-квадрат). Среди детей контрольной группы: у 51 (55%) ДНК ВГЧ-6 в крови не обнаружена, у 11 (12%) – менее 5 копий/10^5 клеток, у 19 (21%) – от 5 до 10 копий/10^5 клеток, у 11 (12%) – 10–10^2 копий/10^5 клеток. ДНК ВГЧ-6 в крови в концентрации более 10^2 копий/10^5 клеток у клинически здоровых детей не выявлялась.

Анализ результатов количественного определения ДНК ВГЧ-6 в мазках из ротоглотки показал, что в основной группе у 9% пациентов выявлено менее 400 копий/мл, 11,5% – 400–10^3 копий/мл, 41% – 10^3–10^4 копий/мл, 25,5% – 10^4–10^5 копий/мл, 4% – более 10^5 копий/мл. У 9% ДНК ВГЧ-6 в мазках из ротоглотки не обнаружена. Среди пациентов контрольной группы: менее 400 копий/мл идентифицировано у 3,5% детей, 400–10^3 копий/мл – 29%, 10^3–10^4 копий/мл – 14%. У более половины клинически здоровых детей (53,5%) ДНК ВГЧ-6 в мазках из ротоглотки не обнаружили.

Выводы. Инфекция ВГЧ-6 на сегодняшний день является наиболее распространенной среди ГВИ у детей и представлена в большинстве случаев в виде микст-инфекции с другими герпесвирусами. У детей с ОРИ преобладают активные формы инфекции ВГЧ-6, в то время, как у клинически здоровых инфекция имеет латентное течение. Для диагностики активных форм инфекции, требующих проведения противовирусной терапии, наиболее значимым является обнаружение ДНК ВГЧ-6 в крови в концентрации 100 копий/10^5 клеток и более и/или в мазке из ротоглотки в количестве 10^5 копий/мл и более. Среди ОРИ могут встречаться как случаи острой первичной инфекции ВГЧ-6, так и реактивации хронической персистирующей инфекции. Вклад ВГЧ-6 в этиологию ОРИ предстоит установить в дальнейшем.

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ *NEISSERIA MENINGITIDIS,* ВЫЗВАВШИХ ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫЕ ФОРМЫ МЕНИНГОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ НА ТЕРРИТОРИИ МОСКВЫ В 2016 ГОДУ

Миронов К.О.[1], Животова В.А.[1], Матосова С.В.[1], Шипулина О.Ю.[1], Маркелов М.Л.[1], Гоптарь И.А.[1], Валдохина А.В.[1], Пимкина Е.В.[1], Королева М.А.[1], Королева И.С.[1], Нагибина М.В.[2], Венгеров Ю.Я.[3], Кулешов К.В.[1], Платонов А.Е.[1], Шипулин Г.А.[1]

[1] ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

[2] ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница № 2» Департамента здравоохранения, Москва, Россия

[3] Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия

Введение. Генерализованные формы менингококковой инфекции (ГФМИ) входят в число инфекций с наивысшей смертностью среди всех возрастных групп в России. ГФМИ вызываются преимущественно *N. meningitidis* шести серогрупп. На территории России наиболее распространены серогруппы A, B, C и W, данные о представителях остальных серогрупп практически отсутствуют. Информация о серогруппах *N. meningitidis* и данные о заболеваемости ГФМИ позволяют планировать иммунопрофилактические мероприятия с использованием соответствующих вакцин. Для дополнительного описания менингококков, принадлежащих одной серогруппе,

используется современная классификация, предполагающая определение аллельного профиля по трем вариабельным фрагментам белков наружной мембраны, сиквенс-типа и клонального комплекса с помощью мультилокусного секвенирования-типирования (МЛСТ) [1]. Определение серогрупп и дальнейшая классификация *N. meningitidis* могут быть проведены с использованием молекулярно-биологического мониторинга – комплекса основанных на ПЦР методических подходов, не предполагающих высев культуры возбудителя, что значительно расширяет возможности сбора эпидемиологически значимой информации [1-4].

Исторически для территории России наибольший эпидемиологический интерес представляют *N. meningitidis* серогруппы А [5], однако в наблюдаемый текущий межэпидемический период в последние годы увеличивается доля ГФМИ, вызванных *N. meningitidis* серогруппы W [2, 6], что сопровождается выявлением на наблюдаемой территории представителей клонального комплекса ST-11 complex/ET-37 complex [2]. Это требует проведения дополнительных исследований, поскольку, начиная с 1990-х годов, представители этого клонального комплекса были ассоциированы с периодами эпидемического неблагополучия во многих странах. Скорее всего, рекомендованная схема антигенной и генетической характеристики штаммов [1] не обладает достаточной дискриминирующей способностью для выявления неоднородности клонального комплекса ST-11 complex/ET-37, о чем свидетельствуют ряд зарубежных исследований и данные полногеномного секвенирования представителей этого клонального комплекса, опубликованные в базе данных PubMLST (http://pubmlst.org/neisseria/). В связи с этим возникает необходимость расширенного определения антигенных и генетических характеристик *N. meningitidis* с целью анализа эпидемиологических связей и поиска маркеров, ассоциированных с повышенными вирулентными свойствами представителей клонального комплекса ST-11 complex/ET-37 complex.

Цель и задачи. Цель данной работы заключалась в определении антигенных и генетических характеристик *N. meningitidis*, циркулировавших на территории Москвы в 2016 году. Задачи исследования включали сбор клинического материала и проведение молекулярно-биологического мониторинга циркулирующих возбудителей, анализ выявленных клональных комплексов и расширенную характеристику штамма, принадлежащего клональному комплексу ST-11 complex/ET-37 complex, с помощью массового параллельного секвенирования.

Материалы и методы. Для генотипирования использовано 10 образцов ДНК *N. meningitidis* (3 серогруппы А и 7 серогруппы W), выделенных из клинического материала (спинномозговая жидкость или кровь) при проведении молекулярно-биологического мониторинга в исследовании [6], а также 1 образец ДНК, выделенный из бактериальной культуры (серогруппа W), предоставленной Российским референс-центром по мониторингу за бактериальными менингитами при ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии». Все образцы и бактериальная культура были получены от больных ГФМИ на территории Москвы в 2016 году.

Антигенная и генетическая характеристика *N. meningitidis* проводилась согласно рекомендациям [1] с использованием стандартных молекулярно-биологических методик для секвенирования с применением реагентов и оборудования производства «Applied Biosystems» (США).

Образец ДНК, выделенный из бактериальной культуры, был исследован с помощью массового параллельного секвенирования на платформе «MiSeq» с использованием набора «MiSeq Reagent Kit v2, 500-cycles» («Illumina», США). Геномная библиотека была приготовлена методом ферментативной фрагментации ДНК с использованием набора «Nextera XT DNA Library Preparation Kit» («Illumina», США). Сборку нуклеотидных последовательностей (контигов) из секвенированных прочтений проводили с помощью программного обеспечения SPAdes v3.5.0 [7].

Обработка всех результатов секвенирования проводилась с использованием программных возможностей Интернет-ресурса http://pubmlst.org/neisseria/.

Основные результаты. Для всех образцов ДНК *N. meningitidis* получена характеристика антигенного профиля и определен МЛСТ сиквенс-тип, результаты генотипирования и информация об источниках образцов ДНК *N. meningitidis* опубликованы в базе данных PubMLST (идентификационные номера – 50218-50227 и 50241). *N. meningitidis* серогруппы А имели антигенный профиль P1.5-2,10: F3-5 и сиквенс-тип ST-75, входящий в клональный комплекс ST-1 complex/subgroup I/II. *N. meningitidis* серогруппы W имели антигенный профиль P1.5,2: F1-1 и сиквенс-тип ST-11, входящий в клональный комплекс ST-11 complex/ET-37 complex.

Циркуляция штаммов клонального комплекса ST-1 complex/subgroup I/II характерна для текущего межэпидемического периода и свидетельствует о стабильном характере эпидемического процесса, обусловленного *N. meningitidis* серогруппы А [3, 5].

Продолжающаяся циркуляция на территории Москвы *N. meningitidis* серогруппы W, входящих в клональный комплекс ST-11 complex/ET-37 complex, потребовала расширенного изучения циркулирующих возбудителей с помощью массового параллельного секвенирования бактериальной культуры, что позволило определить следующие дополнительные антигенные и генетические характеристики. Определен аллельный профиль на основании расширенного МЛСТ (extended MLST): abcZ – 2, adk – 3, aroE –2, aspA – 11, carB – 6, dhpS – 5, fumC – 3, gdh – 8, glnA – 2, gpm – 5, mtgA – 4, pdhC – 4, pgm – 6, pilA – 188, pip – 3, ppk – 2, pykA – 2, rpiA – 3, serC – 143, talA – 124. Антигенный профиль включал характеристику следующих антигенов: FetA VR – F1-1, PorA VR1 – 5, PorA VR2 – 2, NHBA – 29, fHbp – 22 (аллели обозначены по вариабельным последовательностям белковых антигенов) и porB – 2-144, NEIS2109 (nhba) – 17, NEIS2020 (porB) – 244, NEIS1963 (fetA) – 13 (аллели обозначены по нуклеотидным последовательностям). Аллели рибосомальных генов: 16S – 72 и 23S – 1. Аллели генов, ассоциированных с резистентностью к антибиотикам: ponA – 1, gyrA (NEIS1320) – 159, parC – 44, parE – 172, folP – 4, penA (NEIS1753) – 59, gyrA – 4, penA – 1, промоторная область mtrR – 5, rpoB – 9, mtrR – 797. Необходимо отметить, что выявлено две алле-

ли, ассоциированные с пониженной чувствительностью к антибиотикам: folP – 4 – к сульфаниламидам [8], mtrR – 797 – к ципрофлоксацину [9].

Заключение. Проведена антигенная и генетическая характеристика возбудителей ГФМИ, циркулировавших на территории Москвы в 2016 году. Относительно высокая доля ГФМИ, обусловленных *N. meningitidis* серогруппы W, ассоциирована с циркуляцией представителей клонального комплеса ST-11 complex/ET-37 complex. Невысокая заболеваемость, не превышающая в последние годы 2 случаев на 100000 населения в год, не позволяет говорить о высоком эпидемическом потенциале выявленных представителей клонального комплекса ST-11 complex/ET-37, что косвенно подтверждается циркуляцией этого клонального комплекса в предыдущие годы (см. [2, 3] и базу данных PubMLST).

Дальнейшие направления изучения *N. meningitidis*, вызывающих ГФМИ, должны, с одной стороны, заключаться в продолжении проспективного молекулярно-биологического мониторинга циркулирующих штаммов с использованием ранее опубликованных подходов [1, 2, 4], и, с другой стороны, в продолжении исследований, включающих анализ данных полногеномного секвенирования *N. meningitidis*. Использование массового параллельного секвенирования резко увеличивает объем получаемых данных и дискриминирующую способность генотипирования. Планируется провести исследование дополнительных штаммов и расширить анализируемую выборку за счет генотипирования нежизнеспособных возбудителей, содержащихся в клиническом материале.

Список используемой литературы

1. Fox A.J., Taha M.K., Vogel U. Standardized nonculture techniques recommended for European reference laboratories. FEMS Microbiol. Rev. 2007; (31)1: 84-88.

2. Матосова С.В., Миронов К.О., Платонов А.Е. и др. Молекулярно-биологический мониторинг Neisseria meningitidis на территории Москвы в период с 2011 по 2015 г. Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2016; 2: 4-9.

3. Миронов К.О. Клональные комплексы Neisseria meningitidis, циркулирующие на территории России, и их роль в эпидемическом процессе менингококковой инфекции. Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2016; 6: 52-61.

4. Миронов К.О., Платонов А.Е., Дрибноходова О.П. и др. Методика для определения серогрупп A, B, C и W Neisseria meningitidis методом ПЦР в режиме реального времени. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2014; 6: 35-42.

5. Королева М.А., Покровский В.И., Миронов К.О. и др. Эпидемиологический мониторинг за гнойными бактериальными менингитами в историческом и современном аспектах. Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2014; 2: 52-56.

6. Матосова С.В., Миронов К.О., Смирнова В.С. и др. Характеристика серогруппового распределения Neisseria meningitidis, вызвавших генерализованные формы менингококковой инфекции на территории Москвы в 2016 году. Молекулярная диагностика – 2017. М., 2017.

7. Bankevich A., Nurk S., Antipov D. et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J. Comp. Biol. 2012; 19(5): 455-477.

8. Fiebelkorn K.R., Crawford S.A., Jorgensen J.H. Mutations in folP Associated with *e*levated sulfonamide MICs for Neisseria meningitidis clinical isolates from five continents. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2005; 49(2): 536-540.

9. Enriquez R., Abad R., Salcedo C. et al. Fluoroquinolone resistance in Neisseria meningitidis in Spain. J. Antimicrob. Chemother. 2007; 61 (2): 286-290.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТА *NEISSERIA MENINGITIDIS,* ВЫЗВАВШЕГО ЛЕТАЛЬНУЮ МЕНИНГОКОККОВУЮ ИНФЕКЦИЮ У ПАЦИЕНТА С АТИПИЧНЫМ ГЕМОЛИТИКО-УРЕМИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ, НАХОДИВШЕГОСЯ НА ТЕРАПИИ ПРЕПАРАТОМ «ЭКУЛИЗУМАБ»

Платонов А.Е.[1], Миронов К.О.[1], Матосова С.В.[1], Дадалова О.Б.[2], Зенин И.В.[2], Грибовская Н.В.[3], Симакова А.И.[4], Королева М.А.[1], Королева И.С.[1], Шипулин Г.А.[1]

[1] ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

[2] ГБУЗ «Краевая клиническая больница № 2» Департамента здравоохранения Приморского края, Владивосток, Россия

[3] ГБУЗ «Краевая клиническая больница № 1 им. проф. С.И. Сергеева», Хабаровск, Россия

[4] Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток, Россия

Введение. Атипичный гемолитико-уремический синдром (аГУС) – редкое хроническое системное заболевание, обусловленное комплемент-опосредованной тромботической микроангиопатией (ТМА), приводящей к органному повреждению. В течение 3-6 месяцев от дебюта болезни умирают от 8 до 25% пациентов. 65% больных нуждаются в проведении гемодиализа и/или имеют необратимое повреждение почек, несмотря на проводимую плазмотерапию (как правило, пересадка почки также неэффективна). аГУС – врожденное заболевание, в большинстве случаев обусловленное гетерозиготными мутациями генов компонентов системы комплемента (СК), кодирующих комплемент-регулирующие фактор H и фактор I или эффекторные компоненты СК белки C3 и B [1, 2]. В результате нарушается контроль альтернативного пути (АП) СК, и его хроническая патологическая активация приводит к повреждению клеток крови и эндотелия и развитию жизнеугрожающих нарушений микроциркуляции крови. На сегодняшний день единственным препаратом для патогенетической терапии аГУС является экулизумаб (Солирис®, Alexion Pharmaceuticals,

Inc) – рекомбинантные гуманизированные моноклональные антитела, которые обладают высокой аффинностью к С5 компоненту СК, полностью блокируют расщепление компонента С5 на С5а и С5b и, как следствие, образование мембраноатакующего комплекса (МАК) терминальных компонентов комплемента $C5b678(9)_n$. Таким образом, экулизумаб подавляет развитие комплемент-опосредованных тромботических микроангиопатий и успешно используется для их терапии, что, однако, требует длительного или даже пожизненного приема экулизумаба [2, 3]. К сожалению, в результате лица, получающие экулизумаб, становятся биохимически и физиологически подобны другой группе пациентов – лицам с врожденными дефицитами терминальных компонентов комплемента (ДТКК), которые также не способны к образованию МАК и для которых характерна повышенная в 3000-10000 раз вероятность заболевания генерализованными формами менингококковой инфекции (ГФМИ). В этой связи международные клинические рекомендации и инструкция по применению требуют до начала терапии экулизумабом провести вакцинацию против ГФМИ, желательно тетравалентной (A+C+W+Y) конъюгированной вакциной. В РФ для этих целей зарегистрирована вакцина Менактра. Известны единичные публикации о заболевании ГФМИ лиц, вакцинированных против менингококков, на фоне терапии экулизумабом; по мере расширения применения экулизумаба добавляются новые подобные сообщения [3, 4]. Наиболее тяжелый случай ГФМИ, приведший к смерти российского пациента, рассматривается далее. Принципиальным моментом при расследовании таких случаев является серогруппа штамма *Neisseria meningitidis*, вызвавшего ГФМИ: если полисахарид этой серогруппы был включен в состав использованной вакцины, значит, имеет место реальная «неэффективность вакцинации» (vaccine failure); если ГФМИ была вызвана менингококком иной серогруппы, это не ставит под сомнение полезность вакцинации, но подчеркивает, что лица, получающие экулизумаб, остаются в группе риска по ГФМИ.

Цель и задачи. Цель данной работы заключалась в расследовании летального случая ГФМИ у пациента с аГУС, находившемся на терапии препаратом «экулизумаб».

Задачи исследования включали сбор клинической информации о пациенте и анализ генотипа возбудителя, выполненный на основании данных ПЦР и секвенирования ДНК *N. meningitidis*, содержащейся в ликворе.

Материалы и методы. Исследован образец ликвора пациента, госпитализированного в Краевую клиническую больницу №2 Департамента здравоохранения Приморского края с клиническим диагнозом ГФМИ. Выделение ДНК и определение вида возбудителя методом ПЦР проводились с использованием наборов реагентов «РИБО-преп» и «АмплиСенс® *N.meningitidis / H.influenzae / S.pneumoniae* – FL» (ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии», Россия). Для определения серогруппы и подтверждения наличия ДНК *N. meningitidis* в образце ликвора использована методика [5]. Антигенная и генетическая характеристика *N. meningitidis* проводилась согласно международным рекомендациям по стандартным схемам и методикам, используемым нами с 2007 г. [6], путем секвенирования с применением реагентов и оборудования производства «Applied Biosystems» (США). Обработка всех результатов секвенирования проводилась с использованием программных возможностей интернет-ресурса http://pubmlst.org/neisseria/.

Основные результаты

Анамнез. В 1999 г. больной N., 1994 года рождения, перенес приступ ТМА на фоне ОРВИ; в 2002 г. – второй приступ; в ноябре-декабре 2003 г. – еще три приступа ТМА тяжелой степени с выраженным гемолизом, развитием ДВС-синдрома и острой почечной недостаточности, потребовавшим реанимационных мероприятий с применением гемодиализа и плазмафереза, диагноз – «рецидивирующий ГУС». В апреле 2016 г. во время рецидива заболевания, сопровождавшегося полиорганной недостаточностью, был поставлен диагноз «аГУС, рецидивирующее течение». Диагноз подтверждён на кафедре нефрологии и гемодиализа ПМГМУ им. Сеченова. С апреля 2016 г. назначен экулизумаб в режиме индукционной терапии (900 мг раз в неделю в течение месяца) и затем поддерживающей терапии (1200 мг раз в две недели); последнее введение препарата – за несколько дней до заболевания ГФМИ. Перед началом терапии был привит конъюгированной менингококковой вакциной Менактра («Sanofi», France).

Выдержки из посмертного эпикриза. Больной N. был доставлен бригадой СМП в инфекционное отделение ККБ № 2 в ноябре 2016 г. в крайне тяжелом состоянии через 12 часов после начала заболевания, сопровождавшегося жалобами на головную и мышечно-суставную боль. Через 6 часов от начала болезни появилась звездчато-геморрагическая сыпь, которая быстро прогрессировала. При поступлении: общий цианоз, менингеальный синдром выражен, АД 100/60 мм рт. ст. Некоторые показатели лабораторных обследований: тромбоциты – 27 $x10^9$/л, ликвор прозрачный, цитоз – 5 клеток в поле зрения, белок 0,35 г/л. Посев образцов ликвора, крови, смыва со слизистой глотки – отрицательно. Больной находился в палате интенсивной терапии. Состояние прогрессивно ухудшалось, несмотря на интенсивную терапию, через 1 час 10 минут наступила смерть. Посмертный диагноз: ГФМИ, менингококкцемия, молниеносное течение. ДВС-синдром, инфекционно-токсический шок III степени, отек легких, острая надпочечниковая недостаточность, синдром Уотерхауса-Фридериксена.

Результаты генетических исследований возбудителя. В образце ликвора обнаружена ДНК *N. meningitidis*; приблизительно оцененная концентрация возбудителя достаточно высока и составляет 10^5-10^6 копий/мл. С помощью методики [5] подтверждено наличие ДНК *N. meningitidis* в анализированном образце, ПЦР с праймерами и зондами к ДНК менингококков серогрупп A, B, C, W дала отрицательные результаты. С использованием стандартных молекулярно-биологических подходов [6] определен антигенный профиль P1.5-3,2: F3-6 и сиквенс-тип возбудителя – ST-12758, выявленный впервые и не входящий в известные клональные комплексы (идентификационный номер в PubMLST – 51191). Поиск в PubMLST штаммов, совпадающих с ST-12758, как минимум, по 4 из 7 аллелей, включенных в схему МЛСТ, показал, что генетически близкие штаммы циркулируют в странах Европы с 2003 года. Всего группа включала 47 штаммов, из них 6 были найдены в России. Наиболее часто в этой группе штаммов

определяется серогруппа Y (в 61% случаев), антигенный профиль P.1.18-1,3: F3-4; клональный комплекс для них не обозначен. 8 (17%) из 47 штаммов были не группируемыми. По 6 фрагментам аллельного профиля ST-12758 совпадает с 4 сиквенс-типами, три из которых были найдены у *N. meningitidis*, обнаруженных на территории России. Большинство, как минимум 70%, изолятов, генетически близких штамму *N. meningitidis* с сиквенс-типом ST-12758, найденному у пациента, были ассоциированы с ГФМИ, а не с бессимптомным носительством менингококка. Однако, низкая частота выявления в России и европейских странах этой группы штаммов, по сравнению с *N. meningitidis* серогрупп A, B, C и W, свидетельствует об их невысокой эпидемической значимости. Вероятно, описываемый случай ГФМИ не связан с повышенными вирулентными свойствами возбудителя, но обусловлен подавлением бактериолитической функции СК в процессе лечения аГУС.

Заключение. На данном этапе нельзя с уверенностью сказать, имел ли штамм, вызвавший ГФМИ, серогруппу Y или вообще был не способен синтезировать полисахарид капсулы (был негруппируемым). Известно, что лица с ДТКК чаще болеют ГФМИ, вызванной менее вирулентными штаммами «редких серогрупп», чем лица с нормальной активностью СК [7]. С другой стороны, было показано, что вакцинация лиц с ДТКК тетравалентной полисахаридной менингококковой вакциной значимо, приблизительно в три раза снижает их заболеваемость ГФМИ, но не устраняет опасность заболевания ГФМИ полностью [8]. По весьма предварительным оценкам заболеваемость ГФМИ у лиц, получающих экулизумаб, составляет около 4 случаев на 1000 человеко-лет [4]. Это существенно ниже, чем заболеваемость российских пациентов с ДТКК (по нашим данным – около 90 случаев на 1000 человеко-лет [9]), но намного выше, чем средняя заболеваемость ГФМИ в российской популяции (порядка 2 случаев на 100000 человек в год). Поэтому с практической стороны лица на терапии экулизумабом, их родственники, лечащие врачи и врачи СМП должны быть крайне насторожены при появлении симптоматики, свойственной ГФМИ. Для понимания патофизиологии ГФМИ у лиц с аГУС необходимо разобраться, насколько генетически обусловленная склонность к гиперактивации СК может приводить к повышенной продукции анафилотоксина C3a и отягчать течение болезни (экулизумаб не ингибирует выработку C3a). Наконец, молекулярно-генетические исследования должны быть направлены на максимально полную характеристику *N. meningitidis*, вызывающих ГФМИ у лиц с патологией СК или других иммунологических защитных механизмов, в том числе на выявление менингококков «редких» серогрупп (Y, X и других).

Список используемой литературы

1. Ricklin D, Reis ES, Lambris JD. Complement in disease: a defence system turning offensive. Nat. Rev. Nephrol. 2016; 12(7): 383-401.

2. Loirat C., Fakhouri F., Ariceta G. et al. An international consensus approach to the management of atypical hemolytic uremic syndrome in children. Pediatr. Nephrol. 2016; 31(1): 15-39.

3. Rathbone J, Kaltenthaler E, Richards A. et al. A systematic review of eculizumab for atypical haemolytic uraemic syndrome (aHUS). BMJ Open 2013; 3(11): e003573.

4. Hillmen P., Muus P., Roth A. et al. Long-term safety and efficacy of sustained eculizumab treatment in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. Br. J. Haematol. 2013; 162(1): 62-73.

5. Миронов К.О., Платонов А.Е., Дрибноходова О.П. и др. Методика для определения серогрупп A, B, C и W *Neisseria meningitidis* методом ПЦР в режиме реального времени. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2014; № 6: 35-42.

6. Миронов К.О. Клональные комплексы *Neisseria meningitidis*, циркулирующие на территории России, и их роль в эпидемическом процессе менингококковой инфекции. Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2016; № 6: 52-61.

7. Fijen C.A., Kuijper E.J., Hannema A.J. et al. Complement deficiencies in patients over ten years old with meningococcal disease due to uncommon serogroups. Lancet 1989; 2(8663): 585-588.

8. Platonov A.E., Vershinina I.V., Kuijper E. et al. Long term effects of vaccination of patients deficient in a late complement component with tetravalent meningococcal capsular polysaccharide vaccine. Vaccine 2003; 21: 4437-4447.

9. Платонов А.Е., Вершинина И.В. Менингококковая инфекция у лиц с дефицитами терминальных компонентов комплемента. Эпидемиология и инфекционные болезни 1999; № 5: 38-43.

АНАЛИЗ ОСОБЕННОСТЕЙ ЭКСПРЕССИИ ЦИТОКИНОВ У ПАЦИЕНТОВ С ОРЗ

Клотченко С.А., Плотникова М.А., Барановская И.Л., Егорова М.А., Дроздова Ю.В., Васин А.В.

ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Основой быстрого прогрессирования и тяжести течения заболевания при гриппе и ОРВИ является начало «цитокинового шторма», или гиперцитокинемии, которая служит пусковым механизмом развития синдрома системной воспалительной реакции с риском формирования синдрома полиорганной недостаточности (заключительного этапа тяжёлых инфекционных процессов) [1]. Избыток продукции цитокинов играет ключевую роль в развитии системного поражения органов и летальном исходе заболевания. Оценка корреляции между этиологическим агентом, тяжестью течения заболевания и выраженностью системной воспалительной реакции позволит разработать стандарты противовоспалительной терапии, что значительно сократит период заболевания, частоту развития осложнений и смертность, в том числе в группах риска.

Цель и задачи. Цель работы состояла в исследовании особенностей уровней экспрессии цитокинов в лейкоцитах крови пациентов при острых респираторных вирусных инфекциях. В соответствии с поставленной целью были выполнены следующие задачи: 1) Депонированы

биологические пробы, представляющие собой лейкоциты, выделенные из крови пациентов с ярко выраженной картиной ОРЗ; 2) Пробы были охарактеризованы, и этиология ОРВИ была подтверждена с помощью метода ПЦР; 3) В депонированных образцах были исследованы уровни мРНК цитокинов IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12β, IL-18, IFN-γ и TNF.

Материалы и методы. Идентификацию этиологического агента в мазках из носовых ходов пациентов проводили методом ПЦР с использованием сертифицированных наборов «АмплиСенс ОРВИ-скрин-FL» и «АмплиСенс Influenza virus A/B-FL» (ФБУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора, Россия) по рекомендованной производителем методике. Забор венозной крови проводили в вакутейнеры с ЭДТА объёмом 5 мл. Выделение лейкоцитов из цельной крови проводили с использованием реактива Lymphosep в соответствии с инструкцией производителя («Biowest», Франция). Осадок лейкоцитов лизировали в 1 мл реактива TRIzol («Invitrogen», США), затем проводили выделение тотальной РНК в соответствии с инструкцией производителя. Для оценки уровня экспрессии цитокинов использовали тест-систему на основе мультиплексной ПЦР с детекцией в режиме реального времени, ранее разработанную в ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России [2, 3]. Расчёт относительной экспрессии цитокинов проводили с использованием ΔΔCt метода, используя GAPDH в качестве нормировочного гена. Оценку статистической достоверности различий проводили при помощи компьютерной программы GraphPad Prism 6 с использованием теста непараметрических критериев Манна-Уитни и критерия Вилкоксона. Различия считали статистически значимыми при значении $p < 0,05$.

Основные результаты. Настоящее исследование было выполнено на биологических образцах, полученных от 63 пациентов с диагнозом ОРЗ. Общая длительность исследования для каждого пациента составила 7–9 дней (средняя длительность лечения неосложнённой лёгкой и среднетяжёлой форм ОРВИ составляет 5–8 дней). Критерии включения пациентов: мужчины и женщины в возрасте от 18 до 65 лет; установленный врачом диагноз – ОРЗ, в том числе грипп с клинической симптоматикой; длительность заболевания до включения в исследование не более 48 часов; отсутствие осложнений основного заболевания на момент включения в исследование; отрицательный тест на беременность у женщин детородного возраста.

Взятие мазка из носовых ходов для идентификации возбудителя методом ПЦР на ОРВИ/грипп проводили на 1–2 день заболевания. Забор крови для определения уровня мРНК цитокинов с помощью ПЦР в режиме реального времени проводили на 3–4 день от начала заболевания (пик выработки цитокинов у больных ОРВИ) и 7–8 день (контроль).

Используемая для определения цитокинов тест-система, разработанная в ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, соответствовала назначению и требованиям лабораторной практики. Диагностические характеристики тест-системы: нижний предел чувствительности разрабатываемого метода в среднем составил менее чем 20 фМ для очищенных ПЦР-фрагментов, эффективность амплификации составила 90–100%, воспроизводимость результатов при количественной детекции мРНК цитокинов составила не менее 98%.

При изучении уровней цитокинов, секретируемых мононуклеарными клетками периферической крови, полученными от пациентов, была выявлена экспрессия шести из девяти определяемых тест-системой цитокинов: IL-1β, IL-4, IL-6, IL-10, IL-18 и TNF. Исследуемые в работе биологические образцы представляли собой парные пробы, полученные от двух групп пациентов: больных ОРВИ/гриппом с подтверждённым методом ПЦР диагнозом с использованием сертифицированного набора (опытная группа) и больные с выраженной клинической картиной, но с неподтверждённым по ПЦР диагнозом (контрольная группа). Исследование уровней экспрессии цитокинов в первой временной точке показало достоверное увеличение экспрессии провоспалительных цитокинов IL-1β и IL-6 у опытной группы по сравнению с контрольной. При этом относительные уровни экспрессии IL-1β и IL-6 в опытной группе составляли в среднем 152,8 и 292,7 ед., в то время как средние уровни этих цитокинов в контрольной группе были 11,7 и 29,0 ед. соответственно. Различия в уровнях экспрессии других цитокинов (IL-4, IL-10, IL-18, TNF) в контрольной и опытной группах были недостоверными. Для опытной группы пациентов с подтверждённым диагнозом ОРВИ/грипп было проведено сравнение уровней экспрессии цитокинов в парных пробах. Достоверное снижение уровня экспрессии во второй временной точке относительно первой наблюдалось только в случае IL-1β (примерно в два раза).

Заключение. Анализ уровней мРНК цитокинов у пациентов с ОРЗ показал, что лейкоциты крови этих пациентов вырабатывают целый ряд цитокинов, причём паттерны экспрессии цитокинов у больных ОРВИ/гриппом в целом такие же, как и у больных ОРЗ, вызванными возбудителями другой этиологии. Тем не менее, было показано, что у пациентов с ОРВИ/гриппом происходит достоверное увеличение экспрессии провоспалительных цитокинов IL-1β и IL-6 по сравнению с контрольной группой. Детальное исследование взаимосвязи потенциала патогенности возбудителей ОРВИ и их способности стимулировать экспрессию цитокинов будет продолжено.

Список используемой литературы:

1. Lee N. L. Role of cytokines and chemokines in severe and complicated influenza infections //Hong Kong medical journal/Hong Kong Academy of Medicine. – 2009. – Т. 15. – С. 38–41.

2. Плотникова М. А. и др. Сравнение паттерна экспрессии мРНК цитокинов в эпителиальных клетках А-549, инфицированных вирусами гриппа A/H1N1pdm09, A/H3N2 и A/H5N1 //Цитокины и воспаление. – 2013. – Т. 12. – №. 1–2. – С. 57-65.

3. Plotnikova M. A., Klotchenko S. A., Vasin A. V. Development of a multiplex quantitative PCR assay for the analysis of human cytokine gene expression in influenza A virus-infected cells //Journal of immunological methods. – 2016. – Т. 430. – С. 51–55.

4. Julkunen I. et al. Molecular pathogenesis of influenza A virus infection and virus-induced regulation of cytokine gene expression //Cytokine & growth factor reviews. – 2001. – Т. 12. – №. 2. – С. 171–180.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГРИППА В Г. УФЕ В 2015 - 2016 ГОДАХ

Мурзабаева Р.Т., Валишин Д.А., Мамон А.П., Назырова Е.А., Арсланова Л.В., Асадуллина О.А., Мурзабулатова И.Х.

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет», Уфа, Россия

Заболеваемость гриппом регистрируется повсеместно и значительно повышается в зимне-весенний период. В последние годы одновременно циркулируют и имеют эпидемическое распространение 2 подтипа вируса гриппа А – H3N2, H1N1 и вирус гриппа В.

Целью работы явился анализ этиологической структуры и особенностей клиники гриппа в период эпидемического сезона в 2015 и в 2016 гг.

Материалы и методы исследования

Проведен ретроспективный анализ 1070 медицинских карт стационарных пациентов, поступивших в инфекционную клиническую больницу (ИКБ) № 4 г.Уфы, в период подъема заболеваемости гриппом в 2015 и 2016 гг., и результатов генно-молекулярного исследования методом ПЦР мазков из слизистой носа и ротоглотки на наличие РНК вируса гриппа и его подтипа.

Результаты исследования и обсуждение

Эпидемический подъем заболеваемости гриппом в 2015 году зарегистрирован с февраля по май месяцы, был растянут по времени. За это время в ИКБ № 4 на грипп в ПЦР был исследован материал от 883 госпитализированных больных, у 219 из них диагноз гриппа был верифицирован лабораторным методом, что составило 24,81%.

Среди заболевших гриппом преобладали дети от 1 до 14 лет (55%), на 2-м месте - взрослые от 18 до 55 лет (34%). Этиологическая структура подтвержденных случаев гриппа в 2015 году была следующей: грипп A(H1N1) pdm09 - 2,7%, грипп А (H3N2) - 46,1%, грипп В - 51,2%. Как видно, преобладал грипп типа В, несколько ему уступал грипп, вызванный сезонным штаммом вируса А (H3N2) и регистрировались единичные случаи заболевания, вызванные вновь появившимся в 2009 году вирусом гриппа А подтипа H1N1. У госпитализированных пациентов преобладала среднетяжелая и реже легкая форма болезни. В 2015 г. количество больных, нуждавшихся в лечении в условиях отделения реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), составило 5 человек.

В 2016 г. сезонный эпидемический подъем заболеваемости гриппом наблюдался с февраля по март и был короче по сравнению с 2015г. В возрастной структуре стационарных пациентов гриппом преобладали дети от 1 до 3 лет (26,3%) и от 4 до 14 лет (20,95%). Реже случаи заболевания регистрировались у детей в возрасте до 1 года (4,04%) и от 15 до 17 лет (3,3%). Более одной трети (37,6%) больных были в наиболее работоспособном возрасте - от 18 до 55 лет, лица старше 56 лет составили 7,8%. Среди пациентов всех возрастов преобладали тяжелые и среднетяжелые формы гриппа.

За исследуемый период 2016 г. в ИКБ № 4 на грипп обследовано 1057 заболевших, из них у 471 диагноз гриппа был верифицирован методом ПЦР, что составило 44,6%.

В преобладающем большинстве случаев (87,9%) среди подтвержденных случаев гриппа верифицирован пандемический вирус гриппа A(H1N1)pdm09 и у 12,1% заболевших выявлен сезонный штамм вируса А (H3N2). Ни одного случая обнаружения вируса гриппа В не было. За февраль-март 2016г. 19 больным гриппом была оказана помощь в ОРИТ, причем у всех пациентов в мазках из слизистой носа и ротоглотки в ПЦР были обнаружены специфические фрагменты вируса пандемического гриппа A(H1N1)pdm09. Нами в 2016 г. проанализированы 60 историй болезни взрослых пациентов гриппом. Следует отметить, что ни один больной не был привит против сезонного и пандемического гриппа.

У 39 пациентов (65%) регистрировалась среднетяжелая, у 21 (35%) - тяжелая форма ОРВИ. При поступлении в стационар у 2/3 больных были выраженные симптомы интоксикации (лихорадка, ломота в теле, головная боль, светобоязнь). В 21 случае (35%) отмечалась гиперпиретическая лихорадка до 40^0С и в 39 (65%) - до фебрильных цифр (39^0С). У 36 человек (60%) лихорадка держалась в течение 3 – 4 дней, у одной трети – в течение 5-7 суток, у 9 пациентов (15%) - более недели. У 10 (16,7%) больных в первые 3 дня отмечался жидкий стул до 3-х раз в сутки.

Катаральный синдром развивался у всех больных и проявлялся заложенностью носа и насморком, сухим кашлем, першением и болью в горле, затем появлением продуктивного кашля. У единичных пациентов отмечались проявления геморрагического синдрома в виде мокроты с прожилками крови, петехиальной сыпи на коже, развившихся на 5- 6 день болезни. Артериальное давление имело тенденцию к гипотензии. В 8 случаях (13,3%) на 4–5 день болезни развивалась пневмония, которая сопровождалась одышкой, цианозом кожных покровов, болью в грудной клетке, прожилками крови в мокроте, лихорадкой более 6-8 суток. Наиболее частыми возбудителями пневмонии явились Str. pneumoniae (5 случаев), St. aureus (2 случая), Str. pyogenes (1 случай). У более половины больных, перенесших грипп A(H1N1)pdm09, по данным рентгенографии органов грудной клетки подтверждался бронхит. Всем пациентам при поступлении в стационар были взяты мазки и смывы из слизистой ротоглотки и носа для обследования на грипп в ПЦР. Всем больным назначалась этиотропная терапия, включая осельтамивир, умифеновир, кагоцел, препараты интерферона. На фоне вирусно-бактериальных осложнений, назначалась адекватная комбинированная антибактериальная терапия. В лечении тяжелых вирусно-бактериальных пневмоний, инфекционно-токсического шока применялись инфузии волемических растворов (альбумин 1-2 раза в сутки, свежезамороженная плазма). Назначался минимальный объем инфузионной терапии с учетом суточного диуреза, взрослым, в основном, 10% раствор глюкозы в объеме не более 300-400 мл в сутки. Следует подчеркнуть, что полиионные солевые растворы применялись редко. В конце инфузий вводились петлевые диуретики (фуросемид) в дозе 1-1,5 мг/кг в сутки взрослым. Особое место в тера-

пии занимает гормонотерапия, применялся дексаметазон в дозе 12-16 мг в сутки. Всем больным назначалась кислородотерапия. ИВЛ не проводилась. Летальных случаев не регистрировалось.

Таким образом, подъем заболеваемости гриппом в 2015 году был обусловлен сезонными вирусами гриппа А (H3N2) в 46,1% и гриппа В в 51,2% случаев, что определило затяжной характер эпидемии гриппа, преобладание легких, среднетяжелых форм болезни. В 2016 году основной причиной подъема заболеваемости стал пандемический вирус гриппа A(H1N1)pdm09 в 87,9%, что определило более взрывной характер эпидемии (в среднем 2 месяца), преобладание среднетяжелых и тяжелых форм заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Жданов К. В., Карпов А. В., Львов Н. И. и др. Клинический случай заболевания тяжелой формой гриппа А (H1N1) //Журн. инфекционной патологии. – 2010. – Т. 2. – № 3. – С. 28-31.

2. Казанцев А.П., Казанцев В.А. Дифференциальная диагностика инфекционных болезней – М., 2013. – 496 с.

3. Инфекционные болезни: национальное руководство [электронный ресурс]. http://beta.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970415832.html. /Под ред. Н.Д. Ющука, Ю.Я. Венгерова М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – С.725-735.

4. Лекции по инфекционным болезням: в 2 т. / Н.Д. Ющук, Ю.Я. Венгеров. - 4-е изд., перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. – Т.2. – С. 208-224.

5. Тимченко, В.Н. Воздушно-капельные инфекции в практике педиатра и семейного врача (руководство для врачей всех специальностей). СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2007. – С. 347-369.

ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ *ВИРУСА ГРИППА A(H1N1pdm09),* ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ФАТАЛЬНЫХ СЛУЧАЕВ ЗАБОЛЕВАНИЯ ГРИППОМ ЛЮДЕЙ НА ТЕРРИТОРИИ РФ В ЭПИДЕМИЧЕСКОМ СЕЗОНЕ 2015-2016

Святченко С.В., Дурыманов А.Г., Суслопаров И.М., Колосова Н.П., Гончарова Н.И., Марченко В.Ю., Шиповалов А.В., Епанчинцева А.В., Ильичева Т.Н., Михеев В.Н., Рыжиков А.Б.

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирск, Россия

Мониторинг за изменением антигенных детерминант *вируса гриппа А* и за чувствительностью циркулирующих штаммов к специфичным противовирусным препаратам играет важную роль в своевременной корректировке состава профилактических вакцин и спектра эффективных средств лечения. Особый интерес представляет изучение штаммов, вызывающих тяжелое течение гриппа, в том числе завершившееся летальным исходом. В связи с этим, **целью** данной работы являлась генетическая и фенотипическая характеристика изолятов *вируса гриппа А*, выделенных на территории РФ в эпидемическом сезоне 2015-2016 от фатальных случаев заболевания гриппом среди людей.

Материалы и методы. В период с декабря 2015 г. по июнь 2016 г. из различных регионов РФ нами был получен секционный материал от 500 фатальных случаев заболевания гриппом, из которого была проведена изоляция *вируса гриппа А* в культуре клеток MDCK. Тестирование первичного материала на наличие *вируса гриппа А*, а также типирование выделенных изолятов осуществлялось методом ОТ-ПЦР с использованием наборов реагентов «АмплиСенс Influenza virus A-тип-FL; A/B-FL; A/H1-swine-FL». Секвенирование проводилось по методу Сэнгера. Серологическая характеристика изолятов проводилась с помощью реакции торможения гемагглютинации (РТГА). Фенотипическое определение чувствительности изолятов к действию антинейраминидазных препаратов проводилось в флуоресцентном тесте ингибирования нейраминидазы.

Результаты. Из секционного материала, полученного от 500 фатальных случаев заболевания людей гриппом, нами было выделено 115 изолятов, 114 из которых были типированы в ОТ-ПЦР как A(H1N1pdm09) и 1 как A(H3N2). Для 22 изолятов *вируса гриппа А* подтипа H1N1pdm09 была определена нуклеотидная последовательность генов гемагглютинина (HA), нейраминидазы (NA) и гена неструктурных белков (NS).

По последовательности гена гемагглютинина было построено филогенетическое дерево, в соответствии с которым все 22 проанализированных изолята A(H1N1pdm09) подтипа были отнесены к генетической группе 6B, доминирующей в циркуляции в мире начиная с осени 2014 года. В эпидемическом сезоне 2015-2016 специалистами ВОЗ внутри клады 6B были выделены 2 новые подгруппы, характеризующиеся вновь выявленными аминокислотными заменами: 6B.1 (замены S84N, S162N и I216T) и 6B.2 (замены V152T и V173I) [1]. Большая часть проанализированных нами изолятов (19 штаммов) были отнесены к подгруппе 6B.1, и лишь 3 изолята вошли в подгруппу 6B.2. Таким образом, на территории Российской Федерации, как и в странах Европы и Северной Америки, в эпидемическом сезоне 2015-2016 в циркуляции преобладали представители клады 6B.1. Несмотря на появление новых аминокислотных замен в гемагглютинине и связанное с этим выделение новых генетических подгрупп, штаммы подтипа A(H1N1pdm09) по-прежнему продолжают оставаться антигенно схожими между собой и с первыми изолятами данного подтипа, выделенными ещё в 2009 году, что подтверждается результатами исследования всех выделенных изолятов в РТГА с поликлональной хорьковой референсной сывороткой, полученной против штамма A/California/07/2009, входящего в вакцину в качестве A(H1N1pdm09)-компонента на протяжении последних 6 эпидемических сезонов.

В гене гемагглютинина пяти из 22 отсеквенированных изолятов *вируса гриппа А* подтипа H1N1pdm09 (A/St.Petersburg/10/2016, A/St.Petersburg/31/2016, A/Noyabrsk/3/2016, A/Stavropol/07/2016 и A/

Stavropol/11/2016) была выявлена мутация, приводящая к замене аспартата на глицин в положении 222, ассоциируемая с повышенной патогенностью вируса гриппа для человека [2]. Увеличение патогенности, предположительно, обусловлено изменением рецепторной специфичности гемагглютинина: аминокислотная замена D222G приводит к увеличению сродства белка к α2-3-связанным сиаловым кислотам, что дает возможность вирусу взаимодействовать не только с эпителием верхних дыхательных путей человека, где преобладают α2-6-связанные сиаловые кислоты, но и эпителиальной выстилкой нижних дыхательных путей, где представлены α2,3-связанные рецепторы.

В целях определения восприимчивости циркулирующих штаммов к антинейраминидазным препаратам осельтамивиру и занамивиру все 114 изолятов *вируса гриппа A(H1N1pdm09)*, выделенные от фатальных случаев заболевания, были протестированы в флуоресцентном тесте ингибирования нейраминидазы. Было выявлено 2 изолята, фенотипически характеризующихся сниженной чувствительностью к осельтамивиру, концентрация полумаксимального ингибирования активности фермента (IC50) которых превосходила типичные значения для чувствительных вирусов данного подтипа более чем в 100 раз. Один из данных изолятов был выделен из пробы, взятой на территории Северо-Западного федерального округа (ФО) у ребенка 2 лет с диагнозом ОРВИ (IC_{50}= 77,51нМ). Второй изолят выделен из пробы, взятой на территории Сибирского ФО у пациента с диагнозом нозокомиальная пневмония; болезнь, вызванная вирусом иммунодефицита человека, стадия 4Б; вирусный гепатит С (IC_{50}= 68,76нМ). Принимали ли пациенты осельтамивир неизвестно. Оба изолята сохраняли нормальную чувствительность к действию занамивира. Определение нуклеотидной последовательности гена нейраминидазы данных изолятов позволило выявить наличие мутации, приводящей к замене гистидина на тирозин в положении 275. Данная замена приводит к изменению конформации активного центра фермента, делая невозможным его блокирование осельтамивиром, и является наиболее часто встречающейся мутацией, обусловливающей лекарственную резистентность к данному препарату среди представителей *вируса гриппа А* субтипа H1N1pdm09.

Заключение. В эпидемическом сезоне 2015-2016 большая часть циркулировавших в РФ штаммов *вируса гриппа А* относилась к подтипу H1N1pdm09, генетической группе 6B1. По своим антигенным характеристикам изоляты H1N1pdm09 по-прежнему остаются сходными с вакцинным штаммом A/California/07/2009. В гемагглютинине 5 изолятов была выявлена аминокислотная замена D222G, ассоциируемая с повышенной патогенностью вируса для человека. Было выявлено 2 штамма с аминокислотной заменой H275Y в нейраминидазе, резистентных к действию осельтамивира. Тем не менее, более 98% циркулирующих в настоящее время штаммов остается чувствительными к действию антинейраминидазных препаратов, в связи с чем является целесообразным применение данных лекарственных средств на ранних этапах развития заболевания.

Библиографический список:

1. ECDC. Influenza virus characterisation, summary Europe, February 2016. Stockholm: ECDC; 2016.

2. Chutinimitkul S., Herfst S., Steel J. et al. Virulence-associated substitution D222G in the hemagglutinin of 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus affects receptor binding // J Virol.– 2010. – Vol. 84, N 22.- P. 11802-13.

ОПТИМИЗАЦИЯ АЛГОРИТМА ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ОРВИ/ГРИППА С ПРИМЕНЕНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДА

Вершинина М.Г., Калугина Е.Ю., Кухтина Н.Б., Пак И.В.

ФГБУ «Центральная клиническая больница с поликлиникой» Управления делами Президента Российской Федерации, Москва, Россия

Введение. Острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) и грипп являются актуальной проблемой здравоохранения в силу высокого уровня заболеваемости. По данным ВОЗ, инфекции дыхательных путей представляют собой одну из самых главных причин заболеваемости и смертности как в раннем детском, так и в старшем возрасте. Основной экономический ущерб от инфекционных заболеваний наносят именно грипп и ОРВИ, а грипп занимает одно из ведущих мест в структуре инфекционной патологии человека. В этой ситуации резко повышается значимость лабораторных исследований, обеспечивающих возможность раннего распознавания этиологии заболеваний с последующим применением всего комплекса противоэпидемических и профилактических мероприятий.

Возбудителями ОРВИ преимущественно являются вирусы, относящиеся к шести семействам: ортомиксовирусы (вирусы гриппа), парамиксовирусы (респираторно-синцитиальный вирус, метапневмовирус, вирусы парагриппа 1-4 типа), коронавирусы, пикорнавирусы (риновирусы), аденовирусы, парвовирусы (бокавирус). Определение возбудителя ОРВИ в каждом конкретном случае имеет важнейшее значение для выбора терапии и для прогноза вероятных осложнений.

Цель и задачи. Цель работы - оценка эффективности применения молекулярно-биологического метода для выявления возбудителей ОРВИ и гриппа. Задачи – оптимизация алгоритма лабораторной диагностики ОРВИ/гриппа в условиях многопрофильного стационара.

Материалы и методы. В ФГБУ «ЦКБ с поликлиникой» Управления делами Президента РФ с 2014 года диагностика ОРВИ/гриппа организована в соответствии с требованиями СП 3.1.2.3117-13 «Профилактика гриппа и других острых респираторных вирусных инфекций». Материал для исследования - мазки из носа, с задней стенки глотки, мокрота, бронхо-альвеолярный лаваж. Контингент обследуемых - пациенты, находящиеся на стационарном лечении в отделениях больницы и обратив-

шиеся амбулаторно. Исследования по выявлению РНК/ДНК возбудителей ОРВИ и гриппа выполняются методом ПЦР в режиме реального времени с использованием мультиплексных наборов «АмплиСенс ОРВИ-скрин-FL» и «АмплиСенс Influenza virus A/B-FL» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора) и применением для детекции продуктов амплификации приборов Rotor-Gene Q (QIAGEN) и CFX96 (BioRad). Для экстракции РНК/ДНК из клинического материала применяется комплект реагентов «АмплиПрайм РИБО-преп» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора). Ранее для диагностики указанных инфекций применялись иммунологические методы выявления антигенов (реакция непрямой иммунофлюоресценции) отдельных возбудителей (вирусов гриппа А и В, респираторно-синцитиального вируса, вирусов парагриппа, аденовируса) и определения антител (иммуноглобулинов класса М) к антигенам возбудителей.

Основные результаты. Нами проанализированы результаты исследования 6291 образца биоматериала, из них РНК/ДНК возбудителей ОРВИ/гриппа выявлена в 1596 (25%). При анализе выявленной патологии в течение всего периода и по эпидемическим сезонам отмечено преобладание в исследуемых образцах вирусов гриппа А и В - 498 образца (31% от общего количества образцов с выявленной патологией), как в моноинфекции (467 образцов), так и в сочетании с другими возбудителями ОРВИ (31 образец). На 2-м месте по частоте встречаемости – риновирус (483 образца или 30%), на 3-м месте – респираторно-синцитиальный вирус (172 образца или 11%). При выявлении РНК вирусов гриппа отмечается зимне-весенняя сезонность, при выявлении возбудителей ОРВИ сезонность менее выражена.

В течение 2014-2016 гг. среди вирусов гриппа преобладал вирус гриппа А (388 образцов или 78% с выявленным вирусом гриппа). При выявлении РНК вируса гриппа А в большинстве случаев проводилось генетическое типирование. При типировании РНК в январе-апреле 2014 г. отмечалась распространенность субтипов H1N1 (sw2009) и H3N2; в течение эпидемического сезона 2014-2015гг. доминировал субтип H3N2; в течение эпидемического сезона 2015-2016 гг. - субтип H1N1 (sw2009). С начала эпидемического сезона 2016-2017 гг. преобладает штамм вируса гриппа А субтип H3N2.

Заключение. Применение молекулярно-биологического метода в диагностике ОРВИ/гриппа повысило результативность диагностики, позволило сократить сроки диагностических мероприятий, оптимизировать временные и материальные затраты на выполнение исследований, повысить качество диагностики благодаря применению высокочувствительного и высокоспецифичного метода и расширению спектра выявляемых возбудителей. С целью оптимизации алгоритма предлагается одновременное выявление на начальном этапе ДНК/РНК возбудителей ОРВИ и гриппа, при выявлении РНК вируса гриппа А – генетическое типирование.

ЦИТОКИНЫ ПРИ ГРИППЕ

Оспельникова Т.П., Морозова О.В., Андреева С.А., Исаева Е.И., Колодяжная Л.В., Ершов Ф.И.

ФГБУ «Федеральный центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва

Введение. Грипп – респираторная вирусная инфекция с возможным развитием осложнений, включая пневмонии, острую дыхательную недостаточность, инфекционно-токсический шок, менингиты, а также декомпенсацию хронических заболеваний – бронхиальной астмы, ХОБЛ, заболеваний печени, почек и сердечно-сосудистой системы. Индуцированные вирусом гриппа ранние провоспалительные цитокины вызывают некроз тканей, разрушение капилляров с увеличением проницаемости сосудов, что приводит к усилению патогенеза. **Цель:** анализ экспрессии генов цитокинов у больных гриппом с использованием обратной транскрипции с ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) и иммунофлуоресцентного анализа xMAP с магнитными микросферами.

Материалы и методы. Сбор носоглоточных смывов и образцов крови 10 больных с диагнозом «грипп» в остром периоде при поступлении в стационар и 10 здоровых добровольцев проводили в феврале-марте 2015 г. Клинический диагноз подтверждён посредством ОТ-ПЦР-РВ с использованием наборов «АмплиСенс® Influenza virus A/B-FL», «АмплиСенс® Influenza virus A/H1-swine-FL», «АмплиСенс® Influenza virus A-тип-FL» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва). Количественное определение РНК интерферонов (IFN) α, β, γ, λ и противовирусного белка MxA проводили с использованием ОТ-ПЦР-РВ [1]. Концентрации 37 цитокинов воспаления в сыворотках крови определяли методом xMap с набором «Bio-Plex Pro™ Human Inflammation Panel 1 37-plex» на анализаторе «MAGPIX» («BioRad», США). Статистический анализ проводили с использованием «Exel».

Результаты и обсуждение. Молекулярное типирование посредством ОТ-ПЦР-РВ выявило вирус гриппа А (H3N2) - у 4-х, вирус гриппа В – у 6 из 10 обследованных больных. Образцы контрольной группы не содержали РНК вируса гриппа и других респираторных вирусов. Анализ экспрессии генов IFN 3 типов показал преимущества определения РНК в мононуклеарных клетках крови по сравнению с сыворотками как по общему количеству положительных образцов, так и по их количественным оценкам. Необходимо отметить наличие РНК IFN и MxA в смывах со слизистой носоглотки при качественных и количественных отличиях мукозального и системного ответа. Для IFNα показано отсутствие РНК в смывах как здоровых людей, так и у больных гриппом, при отличиях частот детекции в лимфоцитах больных (41,2±12,3%) и здоровых людей (26,7±11,8%). Уровни IFNa2 в сыворотках крови также были достоверно больше у больных гриппом (20,65±6,49 пг/мл) по сравнению с контрольной группой (4,79±0,82 пг/мл) ($P<0,05$). У больных гриппом РНК IFNβ детектировали во всех смывах при полном от-

сутствии в лимфоцитах, при этом в контрольной группе экспрессия гена IFNβ обнаружена в большинстве клинических образцов (как смывов, так и лимфоцитов). По результатам xMAP содержание IFNβ в сыворотках крови больных гриппом и у здоровых существенно не отличалось. В противоположность экспрессии гена IFNα и аналогично IFNβ, РНК IFNγ обнаружена преимущественно в смывах при полном отсутствии в клетках крови. Высокие частоты (80-100%) и уровни экспрессии генов IFNλ 3 типа и MX1, кодирующего противовирусный белок Myxovirus resistance protein (MxA), у больных и здоровых не отличались. Экспрессия гена MX1 в клетках крови и слизистой носоглотки была индуцирована IFNα и IFNβ соответственно. Высокие уровни РНК белка MxA в клетках крови и слизистой свидетельствовали о биодоступности IFN I типа в этих клетках, о преимущественно вирусных инфекциях без ассоциаций с бактериями и не обеспечивали полного ингибирования репликации вирусов гриппа на ранней стадии инфекции.

Вирусные инфекции индуцируют экспрессию провоспалительных цитокинов - IFNα, IFNγ, TNFα, IL1, IL6, IL8 - медиаторов врожденной резистентности и модуляторов последующего адаптивного иммунитета. Анализ xMAP 37 цитокинов воспаления показал повышенные уровни 7 цитокинов в сыворотках крови больных гриппом по сравнению со здоровыми добровольцами ($p<0,05$), включая 4 цитокина семейства фактора некроза опухолей (tumor necrosis factor (TNF)): APRIL/TNFSF13, BAFF/TNFSF13B, sTNF-R1 и sTNF-R2, а также IFN-α2, IL10 и остеопонтина. При гриппе повышение уровней цитокинов семейства TNF может усиливать патогенез вследствие цитотоксического эффекта или посредством повышения проницаемости капилляров и повреждения эндотелия сосудов. В результате протеолиза растворимые мембранные рецепторы sTNF-R1 и sTNF-R02 связываются с TNF в крови, что повышает стабильность комплекса цитокина с рецептором с увеличением периода полураспада, и приводить к усилению патогенеза. APRIL и BAFF регулируют созревание и дифференциацию В-клеток. Цитокин APRIL также способен индуцировать апоптоз при его взаимодействии с другими рецепторами семейства TNF белков. BAFF активирует В-клетки и стимулирует активированные Т-клетки. Повышенные концентрации цитокинов TNF свидетельствуют о Th1 поляризации с последующим развитием преимущественно клеточного иммунитета. Инфекция вирусом гриппа также индуцировала продукцию регуляторного цитокина IL10, который ингибирует провоспалительные цитокины, включая IL1β, IL6 и TNF, что снижает риск аллергизации и аутоиммунных заболеваний, и стимулирует секрецию антител В-клетками.

Пониженные концентрации у больных гриппом по сравнению с контролем обнаружены для gp130/sIL-6Rβ и MMP-1 ($p<0,05$). Уменьшение количеств маркера острой фазы воспаления – цитокина gp130/sIL-6Rβ обеспечивает благоприятный прогноз острой инфекции без последующих осложнений. Пониженные концентрации TNF-индуцируемой матриксной металлоротеиназы MMP-1, которая разрушает коллагены, приводят к подавлению деградации коллагеновых нитей внеклеточного матрикса в легких, что снижает риск развития ХОБЛ и рака легких.

Заключение. При инфекции вирусами гриппа А и В качественные и количественные отличия РНК IFN 3 типов в клетках слизистой носоглотки и в лимфоцитах крови больных гриппом в острый период свидетельствуют о дифференциальной индукции их экспрессии на входных воротах инфекции, которая обеспечивает врождённую неспецифическую резистентность с провоспалительными цитокинами Th1 пути с последующим преимущественно клеточным иммунным ответом. РНК IFNα отсутствует в смывах, а РНК IFNβ и IFNγ обнаружены преимущественно в смывах при полном отсутствии в клетках крови. Высокие уровни экспрессии гена белка MxA, индуцированные IFN I типа, наряду с повышенными концентрациями только 7 из 37 анализируемых цитокинов воспаления, включая регуляторный интерлейкин IL10 и полифункциональный белок остеопонтин, коррелировали с элиминацией вируса без последующих аллергических и аутоимунных осложнений у больных гриппом.

Литература

1. Морозова О.В., Оспельникова Т.П. Тест-система для определения РНК интерферона λ, интерлейкина IL23 и противовирусного белка MxA. Рег. №2016131205.

РОЛЬ ПЦР-ДИАГНОСТИКИ ГРИППОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ В СЕЗОНЕ 2015-2016 ГГ.

Моисеева Т.И., Трушакова С.В., Мукашева Е.А., Краснослободцев К.Г., Гарина Е.О., Кружкова И.С., Вартанян Р.В., Бурцева Е.И.

Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Введение

Грипп - острое респираторное заболевание, сопровождающееся поражением слизистой оболочки дыхательных путей и развитием интоксикационного синдрома. Детей дошкольного и школьного возраста относят к группам высокого риска инфицирования и заболевания гриппом, с последующей передачей возбудителя окружающим лицам, в том числе взрослым и лицам пожилого возраста. «Гриппоподобное» начало болезни может возникать и при многих других инфекциях, передающихся воздушно-капельным путем, поэтому в целях выбора тактики лечения и расшифровки этиологии заболевания дифференциальная диагностика гриппа методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) является необходимой в условиях современного эпидемического процесса.

Цели и задачи

Цель данной работы заключалась в выявлении вирусов гриппа A(H1N1)pdm09, A(H3N2) и B методом ПЦР

среди детей в возрасте до 14 лет, госпитализированных с ОРВИ в эпидемиологическом сезоне 2015-2016 гг.

Материалы и методы

У детей были взяты носоглоточные смывы на 1-2 день после поступления в стационар с признаками гриппоподобного заболевания. РНК вируса гриппа выделяли при помощи наборов реагентов производства ФБУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора и ZR Viral RNA Kit (Zymo Research, USA). Обратную транскрипцию проводили с помощью набора «Реверта-L». Проведение ПЦР-анализа осуществляли на амплификаторах Rotor-Gene (Corbett Research) и «DT*lite* 4» (ООО «НПО ДНК-Технология») с помощью коммерческих тест-систем «АмплиСенс *Influenza virus A/B*» и «АмплиСенс *Influenza virus* А-тип» (ФБУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора). Субтипирование вирусов гриппа В осуществлялось праймерами, разработанными в лаборатории.

Результаты

Исследовано 898 носоглоточных смывов. Первые случаи гриппа появились в середине декабря 2015 г., вызванные штаммами вируса A(H1N1)pdm09. Максимальное число положительных проб детектировали в январе 2016 года. В марте к циркуляции штаммов A(H1N1)pdm09 присоединились вирусы гриппа В, пик активности которых был зафиксирован в апреле 2016г. Все случаи гриппа В были подобны эволюционной ветви B/Victoria. Вирусы гриппа A(H3N2) встречались спорадически (5 случаев) в течение периода февраль-май. Всего за эпидемиологический сезон 2015-2016 гг. грипп был подтвержден лабораторно у 258 (29%) детей: A(H1N1)pdm09 – 191 (74%), A(H3N2) был подтвержден у 5 (2%) детей, грипп В – у 55 (21%).

Возрастная структура госпитализированных детей составляла: 0-1 год – 121 (13%), 1-3 лет – 447 (50%), 4-6 – 202(23%), 7-10 – 81 (9%), 11-14 – 47 (5%). От гриппа было привито 17 детей. Грипп был подтвержден у 7 пациентов (41% вакцинированных), в том числе у 4 – A(H1N1)pdm09, у 3 – B/Victoria.

У пациентов были выявлены такие сопутствующие заболевания, как: пневмония (179 детей - 20% от общего количества заболевших), бронхит - 79 (9%), стеноз гортани - 66 (7%), острый тонзиллит – 38 (4%). Для лечения 156 госпитализированных использовали антибиотикотерапию, 119 - ингаляции с О2, 1 - занамивир , 1 - ибуклин, 4 - нурофен, 3 - тамифлю, 61 - симптоматическую терапию, для лечения остальных (223 пациента) использовали различные комбинации из вышеупомянутых методов и средств.

Заключение

Метод ПЦР имеет большое значение в диагностике гриппа. На основании только клинических и эпидемиологических данных можно сделать лишь предположительный диагноз. В сезоне 2015-2016 гг. с помощью ПЦР-диагностики грипп был подтвержден лабораторно у 29% госпитализированных детей. При этом доминирующим агентом, вызвавшим заболевание, были штаммы вирусов A(H1N1)pdm09 и В.

ПЦР-ДИАГНОСТИКА ВИРУСОВ ГРИППА И ОРВИ

Мусаева Т.Д., Резниченко Н.А., Писарева М.М., Бузицкая Ж.В., Комиссаров А.Б.

ФГБУ «НИИ гриппа» Министерства здравоохранения России, Санкт-Петербург, Россия

Введение

Клиническая диагностика заболеваний, вызванных различными этиологическими агентами, зачастую представляет серьезные трудности. Лабораторная диагностика заболеваний, вызванных такими агентами, как риновирусы, аденовирусы, бокавирусы, респираторго-синцитиальные вирусы (РС-вирусы), метапневмовирусы, коронавирусы, вирусы парагриппа, доступна только специализированным лабораториям[2].

Использование ПЦР-диагностики позволяет расшифровывать этиологию возбудителя в режиме, близком к реальному времени и обобщать полученные данные в еженедельные сводки, позволяющие отслеживать течение респираторных вирусных инфекций и гриппа и распознавать начало эпидемии гриппа на ранней стадии.

Цель

Анализ этиологической структуры гриппа и ОРВИ в Санкт-Петербурге в эпидемический сезон 2013-2014 гг., 2014-2015 гг., 2015-2016 гг. у пациентов различных возрастных категорий.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1) Провести исследование носоглоточных мазков от пациентов с симптомами ОРВИ на наличие генетического материала вирусов гриппа А и В, респираторно-синцитиального вируса, метапневмовируса, вирусов парагриппа 1, 2, 3 и 4 типов, коронавирусов, риновирусов, аденовирусов групп В, С и Е и бокавируса.

2) Определить подтип вируса гриппа А и генетическую линию вируса гриппа В в положительных на вирусы гриппа А и В образцах.

3) Провести сравнительный анализ частоты встречаемости различных патогенов с учетом сезона и возраста пациентов.

Материалы и методы

Материалом послужили образцы, взятые у больных, госпитализированных в клиники Санкт-Петербурга, осуществляли забор мазков из зева и носа с последующим исследованием на обнаружение респираторных вирусов. Клинический материал для исследования: мазки из носа и зева (объединенные в одной пробирке) собирали в пробирки, содержащие 3 мл универсальной жидкой транспортной среды для вирусов (Транспортные системы COPAN, Италия). Образцы собирали в первые сутки госпитализации (или при обращении в поликлинику), но не позднее 6-го дня заболевания. Также исследовали образцы бронхоальвеолярного лаважа и мокроты от длительно болеющих пациентов. Клинический материал хранился при +4 - 8°С не более 3 дней или замораживался в день взятия и хранился при минус 20°С.

Экстракцию нуклеиновых кислот (НК) возбудителей проводили с применением набора «Рибо-преп», реакцию обратной транскрипции - с набором реагентов «Реверта-L». Для выявления НК вирусов гриппа А и В и ОРВИ

использовали тест-системы «АмплиСенс® Influenza virus A/B-FL», «АмплиСенс® Influenza vims A/H1-swine-FL», «АмплиСенс® Influenza virus A-тип-FL» (производства ЦНИИЭ, Москва), «АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL», основанные на методе полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени на приборах «Rotor-Gene» 6000 («Corbett Research», Австралия) и «Rotor Gene Q» (QIAGEN, Германия).

Генетическую линию вирусов гриппа В определяли с помощью набора QIAGEN OneStep RT-PCR Kit.

Результаты

В течение трех эпидемических сезонов 2013-2016 гг. был проведен ПЦР-анализ 6424 клинических образцов от госпитализированных пациентов с симптомами ОРЗ (4980 детей до 16 лет и 1444 взрослых) на наличие генетического материала вирусов гриппа А и В, РС-вирусов, аденовирусов, бокавирусов, риновирусов, коронавирусов, вирусов парагриппа, метапневмовирусов.

РНК вируса гриппа А подтипа H1N1pdm09 была выявлено в 963 образцах, подтипа H3N2 – в 653 образцах. В образцах, положительных на грипп В (415 образца), Ямагатская генетическая линия выявлена в 6,5% случаев, а Викторианская – в 0,5% случаев. Микст-инфекция вирусами гриппа А и В была обнаружена в 28 случаях, а сочетание гриппа А и ОРВИ в 329. Причем выявлены микст-инфекции с тремя возбудителями ОРВИ. Основная часть подобных заболеваний сочетает грипп А-риновирус-РС-вирус.

Эпидемический сезон 2015-2016гг. характеризуется преимущественной циркуляцией вируса гриппа А(H1N1) pdm09. Интенсивность последней эпидемии была выше, чем во все эпидемические сезоны после появления на эпидемической арене вируса «свиного гриппа» и была сравнима с вызванной им пандемией 2009 г.

Результаты ПЦР-диагностики респираторных инфекций не гриппозной этиологии среди госпитализированных детей показали, что наиболее часто заболевание было вызвано РС-вирусом (15%) и риновирусами (19,7%), а среди госпитализированных взрослых – аденовирусом (3,7%) и риновирусом (7,5%). Анализ этиологической структуры показал, что за три сезона среди ОРВИ - РС-вирус доминировал в эпидемических сезонах 2013-2014 гг. и 2015-2016гг. – 820 положительных образцов (12,8%). Подъём риновирусной инфекции наблюдался в эпидемический сезон 2014-2015 гг., что в сумме составило 16,9% (1089 образцов).

Заключение

Результаты исследований показали, что в течение трех эпидемических сезонов с 2013-2016 гг. в Санкт-Петербурге одновременно циркулировали вирусы гриппа А подтипов H3N2 и H1N1pdm09. По данным ПЦР-диагностики, в положительных на грипп А образцах доминирует субтип A/H1pdm09, а в положительных на грипп В – Ямагатская генетическая линия. В течение 2015-2016 гг. наблюдается эпидемия, вызванная вирусом гриппа А субтипа H1N1pdm09.

В этиологической структуре ОРВИ за период с 2013 по 2016 гг. в Санкт-Петербурге преобладали РС-вирусные, риновирусные, гриппозные A(H1N1)pdm09 и аденовирусные заболевания. ПЦР-диагностика показала, что у детей до 16 лет превалировали РС-вирусы, а у взрослых – риновирусы.

Таким образом, вирусологический надзор за гриппом и другими респираторными вирусами, имеет решающее значение для того, чтобы определить, какие вирусы на самом деле, циркулируют в популяции, сроки их активности, тенденции и влияние на эпидемиологическую картину всего сезона в целом.

Литература

1. Осидак Л.В.,Дриневский В.П., Цыбалова Л.М. ОРИ у детей и подростков. – СПб.: ИнформМед, 2014. С.9-31.

2. Позднякова М.Г., Ерофеева М.К., Максакова В.Л. Актуальные вопросы профилактики гриппа и других ОРВИ. – СПб.: РМЖ, 2011. – 32.

3. Покровский В.И., Пак С.Г., Брико Н.И., Данилкин Б.К. Инфекционные болезни и эпидемиология // М.: Гэотар-Медиа, 2004. – 816.

4. Лусс Л.В., Ильина Н.И., Хаитов Р.М. Грипп. Профилактика, диагностика, терапия. – М.: Гэотар-Медиа, 2011. – 113.

5. Малый В.П., Андрейчин М.А., Лядова Т.И. Грипп (сезонный, птичий, пандемический) и другие ОРВИ. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 319 с.

ПРИМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКОГО И ИММУНОХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО МЕТОДОВ В ДИАГНОСТИКЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ВИРУСОМ ЭПШТЕЙНА – БАРР

Мысливцева Г.А., Рудая Я.А., Бондарева В.П., Петровская И.В., Гордиенко И.В.

АНМО «Ставропольский краевой клинический консультативно–диагностический центр», Ставрополь, Россия

Введение. Инфицированность вирусом Эпштейна – Барр (ВЭБ) регистрируется во всем мире и охватывает около 90% населения. ВЭБ впервые открыт в 1964 году, относится к семейству *Herpesviridae*, 4 типу, имеет сложную антигенную структуру, содержит капсидный, ядерный, ранний и мембранный антигены, против которых образуются антитела, обладает тропностью к лимфоцитам, вызывает их пролиферацию. Установлено, что ВЭБ является этиологическим агентом острого и хронического инфекционного мононуклеоза (ИМ), рецидивирующей герпесвирусной инфекции, лимфоаденопатии, реактивного лимфаденита, а также назофарингиальной карциномы.

Цель исследования. Сравнение лабораторных показателей молекулярно–биологического метода (ПЦР) и иммунохемилюминесцентного анализа (ИХЛ) у носителей ВЭБ среди населения Ставропольского края различного возраста.

Материалы и методы. В Ставропольском краевом клиническом консультативно–диагностическом центре на базе отделения лабораторной диагностики обследовано 1560 пациентов: определялись ДНК к ВЭБ методом ПЦР и антитела к капсидному антигену класса IgG, антитела к капсидному антигену класса IgM ВЭБ методом ИХЛ.

Критериями отбора явились: наличие в слюне и (или) в крови обследуемого ДНК ВЭБ; наличие в крови обследуемого антител к капсидному антигену класса IgG и к капсидному антигену класса IgM к ВЭБ. ПЦР-исследования (Real–time PCR) проводились на детектирующем амплификаторе ДТ–96, «ДНК-Технология», Россия. ИХЛ–исследования проводились на анализаторах: Immulite–2000 Xpi (США, «Siemens Healthcare Diagnostics Inc. »), Liaison XL (Италия, DiaSorin). Комплект реагентов для ПЦР-амплификации: ДНК «Вирус Эпштейна – Барр (EBV)», «Проба – Рапид», «ДНК-Технология», Россия. Комплекты реагентов для ИХЛ-исследований: набор реагентов для определения антител класса IgG к капсидному антигену вируса Эпштейна – Барр (EVB-VGA IgG); набор реагентов для определения антител класса IgM к капсидному антигену вируса Эпштейна – Барр (EVB-VGA IgM), Immulite–2000 Xpi. Реагент для определения антител IgM к капсидному антигену вируса Эпштейна – Барр (LIAISON® EBV IgM). Реагент для определения антител IgG к капсидному антигену вируса Эпштейна–Барр (LIAISON® VCA IgG).

Обследованные пациенты (1560 человек) сформированы в группы по возрасту: 1 группа – до 10 лет – 601 человек; 2 группа – от 10 до 20 лет – 181 человек; 3 группа – от 20 до 30 лет – 230 человек; 4 группа – от 30 до 40 лет – 244 человека; в 5 группе лица старше 40 лет – 304 человека.

В ходе проведенной работы было установлено: (табл.1) при обследовании 1560 пациентов методом ПЦР, с определением ДНК возбудителя ВЭБ в слюне, положительные результаты выявили у 606 человек (38%); отрицательные у 954 человека (62%). Из общего числа (1560 человек) сдали кровь на исследование методом ПЦР – 272 человека (1288 не обследованы). В крови обнаружили ДНК ВЭБ у 6 пациентов (2,2%). При параллельном обследовании методом ИФА в крови 1560 пациентов выявили антитела класса IgG у 796 человек (51%), антитела класса IgM – у 94 человек (6%).

В группе до 10 лет ДНК к ВЭБ обнаружена: в слюне у 219 человек (36,4%), в крови – у 1 человека (0,3%); Положительные антитела класса IgM обнаружены в крови у 49 человек (8,1%); антитела класса IgG – у 247 человек (41%).

В группе до 20 лет ДНК к ВЭБ обнаружена: в слюне у 65 человек (35%); в крови у 2 человек (0,7%). Положительные антитела класса IgM обнаружены в крови у 14 человек (7,7%); антитела класса IgG у 82 человек (45,3%).

В группе до 30 лет ДНК к ВЭБ обнаружена: в слюне у 99 человек (43%); в крови – у 1 человека (0,3%). Положительные антитела класса Ig M обнаружены в крови у 16 человек (6,9%), антитела класса IgG у 145 человек (63%).

В группе 40 лет ДНК к ВЭБ обнаружены: в слюне у 99 человек (40%); в крови – у 2 человек (0,7%). Положительные антитела класса Ig M обнаружены в крови у 10 человек (4%); антитела класса IgG – у 150 человек (61%).

В группе после 40 лет ДНК к ВЭБ обнаружена: в слюне у 124 человек (40%); в крови ДНК не выявлена. Положительные антитела класса IgM обнаружены в крови у 5 человек (1,6%); антитела класса IgG у 172 человека (23%).

Таблица. Результаты комплексного исследования на ВЭБ с применением ПЦР- и ИХЛ-методов

Возрастные группы	Кол–во пациентов, абс.,%	ПЦР		ИХЛ		
		кол–во позитивных по слюне, абс.,%	кол–во позитивных по крови, абс.,%	кол–во позитивных по крови IgM, абс.,%	кол–во позитивных по крови IgG, абс.,%	соотношение позитивных IgM к IgG,%
до 10 лет	601 38,5%	219 36,4%	1 0,3%	49 8,1%	247 41%	19,8%
10 – 20 лет	181 11,6%	65 35%	2 0,7%	14 7,7%	82 45,3%	17%
20 – 30 лет	230 14,8%	99 43%	1 0,3%	16 6,9%	145 63%	11%
30 – 40 лет	244 15,6%	99 40%	2 0,7%	10 4%	150 61%	6,6%
после 40 лет	304 19,4%	124 40%	0	5 1,6%	172 23%	2,9%
Общее кол–во	1560 100%	606 38%	6 2,2%	94 6%	796 51%	11,8%

С учетом полученных результатов ПЦР и ИХЛ, клинической картины, anamnesis morbi, результатов других лабораторных исследований, врачами СККЦДЦ выставлен диагноз 1185 пациентам (75,9%); у 375 пациентов (24%) – диагноз не установлен.

Среди всех возрастных групп преобладают диагнозы: хроническая ВЭБ–инфекция – 360 человек (23%); транзиторная иммунная недостаточность – 348 человек (22%); носительство ВЭБ – 213 человек (13%); ВЭБ – период активации – 107 человек (6,8 %).

Заключение:

1. Увеличение возраста пациентов обратно пропор-

ционально проценту выявления ДНК вируса Эпштейна – Барр в крови и слюне (методом ПЦР), также снижается количество положительных результатов антител классов IgG и IgM к вирусу Эпштейна – Барр в крови (методом ИХЛ).

2. Самым распространенным диагнозом среди обследуемых во всех возрастных группах является хроническая ВЭБ–инфекция; затем по значимости и частоте следует транзиторная иммунная недостаточность (ТИН), и далее – носительство вируса Эпштейна – Барр.

3. Применение метода ПЦР помогает обнаружить вирус Эпштейна – Барр в случаях атипичного течения инфекции, реактивации, ранней паст-инфекции, а также в инкубационном периоде, когда антитела к вирусу в организме еще отсутствуют.

4. Методы ПЦР и ИХЛ применяются комплексно в диагностике заболеваний, ассоциированных с вирусом Эпштейна – Барр, и являются взаимодополняющими, что позволяет делать выводы о наличии возбудителя, стадии заболевания, помогает в выборе схемы лечения и является необходимым для контроля лечения.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ВИРУСОВ ГРИППА *A(H3N2),* ОБНАРУЖЕННЫХ В ПЕРИОД С 2013 ПО 2017 ГОД, В РОССИИ

Рентеева А.Н., Яцышина С.Б., Валдохина А.В., Елькина М.А., Томская Ю.О., Агеева М.Р., Буланенко В.П., Шипулин Г.А., авторы ЦГиЭ Роспотребнадзора (*список в конце текста)

ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение. Сезонные эпидемии гриппа ежегодно охватывают значительную часть населения, как России, так и всего мира. Этиологическая структура гриппа варьирует от сезона к сезону, вирусы гриппа *A(H3N2)* активно участвуют в эпидемическом процессе. Вирус гриппа *A(H3N2)* циркулирует в популяции людей с 1968 г. (пандемия, названная «гонконгским гриппом») [1]. В России в сезонах 2013-2014 и 2014-2015 в этиологической структуре гриппа преобладал вирус *A(H3N2)* (47,2% и 69,5%, соответственно), а в 2015-2016 доля вируса *A(H3N2)* была незначительной [2]. В сезоне 2016-2017 большинство вирусов гриппа, обнаруженных у больных, это - вирусы *A(H3N2)* [3].

Цель данного исследования - молекулярно-генетическая характеристика вирусов гриппа *A(H3N2)*, циркулировавших в России в течение 4 эпидемических сезонов 2013-2017, и сравнение их с вакцинными штаммами; исследование участков гена гемагглютинина (НА), кодирующих антигенные (АГ) эпитопы; анализ генома вирусов *A(H3N2)* на наличие известных молекулярных маркеров резистентности к противовирусным препаратам.

Материалы и методы. В работе использовался биологический материал (мазки со слизистой носо- и ротоглотки, аутопсийный материал) от больных гриппом. Материал был получен из 28 центров ФБУЗ «ЦГиЭ» Роспотребнадзора (2013-2014 – 10, 2014-2015 – 70, 2015-2016 – 5, 2016-2017 – 57 образцов), проводящих исследование тяжелых и летальных случаев и мониторинг гриппоподобных заболеваний по распоряжению Роспотребнадзора. Для экстракции РНК из биологического материала (без предварительного культивирования вирусов) и реакции обратной транскрипции использовали наборы «Рибо-преп», «Реверта-L» (ЦНИИЭ, Москва). ПЦР фрагментов генов: НА, нейраминидазы (NA) и матричного белка (МР) вирусов *A(H3N2)* проводили на приборах «Терцик» (ДНК-технология) (реагенты производства ЦНИИЭ, Москва). Секвенирование продуктов ПЦР проводили методом «cycle sequence» с набором ABI PRISM Big Dye™ v.3.1 на секвенаторе ABI-3100 PRIZM™ Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Для анализа нуклеотидных последовательностей использовался пакет программ DNASTAR. Секвенирование вируса *A/Moscow/CRIE-141/2015* проводилось методом NGS на приборе MiSeq (Illumina, США) набором «MiSeq Reagent Kits V2 (250PE)». Последовательности нуклеотидов депонированы в базы данных GISAID EpiFlu, GenBank. Подробнее с данными сезонов 2013-2015 и методами исследования можно ознакомиться в публикации ЖМЭИ. 2016, №5, стр.60-72. Последовательности нуклеотидов полного генома вируса *A/Moscow/CRIE-141/2015*: KU198896-KU198903. 2015-2016: EPI827085-EPI827091, 2016-2017: KY288889-KY288904. Всего секвенировано: в 2013-2014 полных сегментов: 10-НА, 10–МР; 6 фрагментов NA; 2014-2015: полных сегментов: 70-НА, 8-NA, 15–МР; 44 фрагмента NA; 2015-2016: полных сегментов: 5-НА, 2-NA, 2-МР; 2016-2017: полных сегментов: 57-НА, 12–NA, 7-МР; 29 фрагментов NA.

Основные результаты. Вирусы гриппа подразделяются на клайды в соответствии с аминокислотными заменами в НА. В сезоне 2012-2013 внутри клайда 3С сформировались 3 группы: 3С.1, 3С.2, 3С.3 [4]. Преобладал клайд 3С.1, в связи с чем в вакцину на сезон 2013-2014 ВОЗ рекомендовала ввести штамм вируса A/*Texas*/50/2012 (3С.1). В сезоне 2013-2014 произошло разделение клайдов 3С.2 и 3С.3 на субклайды: 3С.2а, 3С.3а и 3С.3b. В России в этом сезоне чаще встречались вирусы клайда 3С.3 (80%), подобные штамму *A/Texas/50/2012*, реже - вирусы клайдов 3С.2а (10%) и 3С.3b (10%). Сравнение вирусов *A(H3N2)* с вакцинными штаммами проводилось на основании анализа нуклеотидного состава генов НА и NA. В сезоне 2013-2014 вирусы, циркулировавшие в РФ, были идентичны вакцинному штамму по гену НА на 98,6–99,0%, по гену NA – на 98,9–99,6%.

В сезоне 2014-2015 на территории РФ преобладали вирусы клайда 3С.2а (81%), 9% принадлежало к клайду 3С.3b и 10% - к 3С.3а. Гомология вирусов с вакцинным штаммом *A/Texas/50/2012* по гену НА снизилась (97,4–98,1%), а по гену NA составила 98,3–99,1%. Однако в связи с преобладанием в сезоне 2014-2015 в Северном полушарии вирусов 3С.3а, по рекомендации ВОЗ вакцинный штамм на следующий сезон заменили на *A/Switzerland/9715293/2013* (клайд 3С.3а) [4]. Тем не менее, в мире в 2015-2016 большинство исследованных вирусов *A(H3N2)* относилось к другому клайду - 3С.2а [4]. В России в 2015-2016 80% вирусов принадлежали к клайду 3С.2а1 (выделенному в конце сезона 2015-2016), а 20% - к клайду

3С.2. В сезоне 2015-2016 гомология российских вирусов с вакцинным штаммом по гену НА была 98,3–99,1 %, по гену NA – 99,2%. Мутации затрагивали АГ сайты вирусов, поэтому в вакцине на сезон 2016-2017 произведена замена на штамм *A/Hong Kong/4801/2014* (3С.2а).

В текущем сезоне 2016-2017 среди исследованных российских вирусов *A(H3N2)* доминирует клайд 3С.2а (79%), а 21% вирусов принадлежит к клайду 3С.2а1. Гомология обнаруженных вирусов с вакцинным штаммом *A/Hong Kong/4801/2014* по гену НА – 98,8–99,5 %, по гену NA – 98,5–99,1%. Ген NA не претерпевал таких сильных изменений в течение 4х сезонов, как ген НА. Вирусы клайдов 3С.2а и 3С.2а1 подобны вакцинному штамму *A/Hong Kong/4801/2014* [3].

Таблица. Анализ мутаций в АГ сайтах НА вирусов *A(H3N2)*, обнаруженных в России в 2013-2017 гг. в сравнении с вакцинными штаммами

	Сайт A	Сайт B	Сайт C	Сайт D	Сайт E
РФ вирусы 2013-2014	S124N, R142G N144S, N145S	N128A/T, L157S F159Y, K160T I192T, P198S	Q311H	K207Q I214T	
РФ вирусы 2014-2015	N122D, A138S R142G, N144S N145S	N128A/T, L157S N158K, F159Y/S K160T, I192T Q197H, P198S	D53N S54R Q311H	K207Q A212S N216S	E62K K83R R261E S265G
РФ вирусы 2015-2016	S138A, G142R N144S	A128T, S159Y/F K160T	Q311H	N171K	
РФ вирусы 2016-2017	N122D, R142K S144K		S47T, A304V E50K, H311Q	N121K, V213I N171K	K92R S262N

Наибольшее количество аминокислотных замен АГ сайтов НА [5] наблюдалось в сезоне 2014-2015, что сопровождалось значительным подъемом заболеваемости гриппом. Анализ известных молекулярных маркеров резистентности к противовирусным препаратам показал чувствительность всех изученных вирусов к Озельтамивиру и Умифеновиру и резистентность к Римантадину (в белке М2 выявлена самая частая мутация S31N).

Выводы. За 4 года циркуляции в геноме вирусов гриппа *A(H3N2)* наблюдалась смена доминирующих клайдов: 3С.3 – в 2013-2014, 3С.2а – в 2014-2015, 3С.2а1 - в 2015-2016. Изменения в геноме затрагивали антигенную структуру вирусов, что дважды вызвало необходимость смены компонента *A(H3N2)* вакцин. Изучение изменения генетических и антигенных свойств вирусов гриппа в совокупности с серологическим мониторингом является необходимым инструментом эпидемиологического надзора за гриппом.

Список литературы

1. Cockburn W.C., Delon P.J., Ferreira W. Origin and progress of the 1968-69 Hong Kong influenza epidemic. Bull. World Health Organ. 1969, 41(3), p. 345-348.

2. Письма Роспотребнадзора: 30.06.2014 №01/7281-14-32, 28.07.2015 №1042, 20.03.2016 № 5995.

3. Недельные отчеты по гриппу Европейского бюро ECDC и Американского бюро CDC, электронные ресурсы: http://flunewseurope.org/, https://www.cdc.gov/flu/weekly/.

4. Годовые отчеты Европейского бюро ECDC, электронный ресурс http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/seasonal_influenza/epidemiological_data/Pages/Annual-Epidemiological-Report.

5. Lee M-S., Chen J. S-E. Predicting Antigenic Variants of Influenza A/H3N2 Viruses. Emerg. Infect. Dis. 2004, 10(8), p. 1385–1390.

***Список авторов из ФБУЗ ЦГиЭ и ТУ Роспотребнадзора:**

ФБУЗ ЦГиЭ в городе Москве: Иваненко А.В., Хизгияев В.И., Ярмольская М.С., Бирюкова М.Е. ФБУЗ ЦГиЭ в Тульской области: Болдырева В.В., Серегина И.В, Крапивин А.В. ФБУЗ ЦГиЭ в Карачаево-Черкесской Республике: Батчаев Х.Х., Болатаева Л.Н. ФБУЗ ЦГиЭ в Вологодской области: Славнухина Л.В., Зорина Д.М. ФБУЗ ЦГиЭ в Республике Марий Эл: Бастраков С.И., Кудрявцева. ФБУЗ ЦГиЭ в Костромской области: Разумовский С.Л., Барышникова А.С., Смирнова Л.В. ФБУЗ ЦГиЭ в Курской области: Ковальчук М.Л., Шевцова Ю.А. ФБУЗ ЦГиЭ в Оренбургской области: Коновалов В.Ю., Деревянко А.В. ФБУЗ ЦГиЭ в Республике Мордовия: Кочетов Е.Н., Богачева О.Е. ФБУЗ ЦГиЭ в Республике Карелия: Пахомова Т.Н., Исаева А.А. ФБУЗ ЦГиЭ в Смоленской области: Сидоренкова Л.М., Михайлова И.Е. ФБУЗ ЦГиЭ в Воронежской области: Степкин Ю.И., Агеева О.Т. ФБУЗ ЦГиЭ в Самарской области: Спиридонов А.М., Яценко Т.В., Осипова М.Е., Отмахова О.Н. ФБУЗ ЦГиЭ в Липецкой области: Зубчонок Н.В., Вендеревская Е.И. ФБУЗ ЦГиЭ в Республике Адыгея: Агиров А.Х., Кудрявцева Е.А. ФБУЗ ЦГиЭ в Республике Северная Осетия-Алания: Бутаев А.К., Мамиева С.Ч. ФБУЗ ЦГиЭ в Тамбовской области: Тихонова Г.Д., Исаева И.Н., Агафонова Т.В. ФБУЗ ЦГиЭ в Республике Коми: Гнатив Б.Р., Грицай А.Б. ФБУЗ ЦГиЭ в Кировской области: Агафонов С.В., Калинина Л.А. ФБУЗ ЦГиЭ в Саратовской области: Казакова Л.В., Длясина О.В. ФБУЗ ЦГиЭ в Ставропольском крае: Соломащенко Н.И., Демина Г.И. ФБУЗ ЦГиЭ в Пензенской области: Пантелеев Г.В., Гусева Ю.В. ФБУЗ ЦГиЭ в Краснодарском крае: Пархоменко В.В., Куличенко О.А., Зинченко И.Н. ФБУЗ ЦГиЭ в Республике Башкортостан: Казак А.А., Денисова Н.Б., Мамаева А.Ф. ФБУЗ ЦГиЭ в Архангельской области: Болтенков В.П., Шишко Л.А. ФБУЗ ЦГиЭ в Орловской области: Старых А.И, Цицина О.Н. ФБУЗ ЦГиЭ в Калужской области: Овсянникова Л.В., Гусарова Е.И., Казакова Л.В. ФБУЗ ЦГиЭ в Калининградской области: Михеенко О.П., Погребная Т.Н.

РОЛЬ БОКАВИРУСА В ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ У ДЕТЕЙ

Сивец Н.В.[1], Шмелева Н.П.[1], Лапо Т.П.[1], Грибкова Н.В.[1], Чекан В.Л.[2], Стринкевич Э.А.[2]

[1]ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Республика Беларусь

[2]ГУ «Белорусская медицинская академия последипломного образования», кафедра оториноларингологии, Минск, Республика Беларусь

Введение. Респираторные вирусные инфекции занимают доминирующую позицию в структуре инфекционной патологии респираторного тракта у детей. Развитие молекулярных методов диагностики способствовало открытию новых респираторных вирусов, одним из которых является бокавирус человека.

Бокавирус человека (HBoV) - это ДНК-содержащий вирус, принадлежащий к семейству Parvoviridae, к роду Bocaparvovirus. В настоящее время известно 4 генотипа вируса: HBoV1, HBoV2, HBoV3, HBoV4. HBoV 1 является причиной респираторных заболеваний у человека, HBoV 2-4 наиболее часто выявляется у пациентов с симптомами гастроэнтерита. Для диагностики бокавирусной инфекции используются молекулярные методы диагностики (полимеразная цепная реакция и секвенирование), так как пока не найдена лабораторная модель для культивирования вируса. С момента открытия (2005 г.) показана активная циркуляция вируса во многих странах мира. ДНК HBoV выявлена не только в респираторных мазках, но и в сыворотке крови, спинномозговой жидкости, моче и фекалиях у пациентов с клиническими проявлениями ОРВИ. Описаны также случаи латентного присутствия бокавируса в респираторном тракте до шести месяцев после перенесенной ранее острой инфекции, показана также персистенция вируса в лимфоидной ткани аденоидов. Эти данные не исключает возможность риска реинфицирования при наличии у пациентов иммунодефицитных состояний, связанных с дисбалансом иммунной системы.

Целью данного исследования явилось определение роли бокавируса в инфекционной патологии дыхательных путей, выявление корреляции тяжести заболевания при развитии виремии, связанной с активной циркуляцией вируса в организме пациентов, а также возможности персистенции вируса в лимфоидной ткани аденоидов

Материалы и методы. В работе использовали назофарингеальные мазки, полученные от детей в возрасте от 0 до 18 лет из всех районов страны с 2010-2016 гг. (2935 образцов), госпитализированных с острыми заболеваниями верхних и нижних дыхательных путей. Образцы сывороток крови пациентов были получены в острой фазе заболевания и в период выздоровления. Венозную кровь без антикоагулянтов отстаивали при комнатной температуре (+15– +20ºС) до полного образования сгустка. После образования сгустка сыворотку центрифугировали при 1500 об./мин в течение 10 мин. После центрифугирования сыворотку собирали в стерильные пробирки. Ткань аденоидов забирали в стерильные пробирки, содержащие 2 мл транспортной среды следующего состава: раствор Хенкса, 0,5% бычий сывороточный альбумин (БСА), 4% раствор гентамицина сульфата (250 мг/л), нистатин ($0,5x10^6$ МЕ/л). Из лимфоидной ткани аденоидов была приготовлена 10% суспензия. Весь клинический материал хранили при температуре минус 20ºС до проведения исследования. Все образцы были тестированы на наличие генетического материала следующих респираторных вирусов: гриппа типа А и типа В, парагриппа 1-4 типа (ПГ1-4), респираторно-синцитиального вируса (РС), метапневмовируса (МПВ), риновируса (РВ), аденовируса (АД), коронавируса (КоВ) и бокавируса человека типа (HBoV). Выделение ДНК и РНК респираторных вирусов проводили с использованием коммерческого набора «Рибосорб», производства «АмплиСенс» (Российская Федерация). Выявление генетического материала респираторных вирусов проводили с использованием диагностических наборов «АмплиСенс» (Российская Федерация): «Influenza virus A/B-FL», «ОРВИ-скрин». Амплификацию и анализ результатов исследований проводили на приборе Rotor Gene 6000, Corbett research, Австралия.

Результаты

Проведенные исследования показали, что ДНК бокавируса человека обнаружена в 257 (12,3%) образцах. Бокавирус стал четвертым вирусом по частоте встречаемости наряду с другими респираторными вирусами. За период исследования подъем заболеваемости бокавирусной инфекцией отмечен в осенний период, с максимальной частотой выявления HBoV в октябре – ноябре. Наиболее восприимчивыми к данной инфекции являются дети в возрасте от 1 года до 3 лет. Из всех положительных находок 61,5% относились именно к данной возрастной категории. Бокавирусная инфекция может протекать как в виде моно -, так в виде сочетанной инфекции с другими респираторными вирусами. У 65,8% обследованных детей выявлена моноинфекция и в 34,2% случаях инфекция протекала в виде сочетанных инфекций. Наиболее часто микст-инфекция регистрировалась в сочетании с риновирусом - 36% случаев, с РС-вирусом - 29,5%, с вирусом парагриппа – 18%, с аденовирусом - 16,4%. HBoV инфекция протекала с поражением как верхних, так и нижних отделов дыхательных путей. Клиническая картина пневмонии или бронхита наблюдалась в 47,1%. Длительность заболевания при бокавирусной инфекции в нашем исследовании варьировала от 10 до 35 дней (в среднем 20 дней) и была обусловлена развитием виремии. Из 57 образцов сыворотки ДНК бокавируса выявлена в 45 (78,9%), в сыворотках крови в стадии выздоровления ДНК вируса обнаружена в 22 (38,6%) образцах, что свидетельствует об активной циркуляции HBoV в периферической крови в течение длительного времени. Из числа данных пациентов лечение в отделении интенсивной терапии и реанимации (ОИТР) проходили 37 (64,9%) пациентов. С клиническим диагнозом «пневмония» в ОИТР было госпитализировано 22 (59,5%) ребенка, причем в двух случаях заболевание осложнилось плевритом. Клинические проявления обструктивного бронхита с выраженным синдромом ин-

токсикации и дыхательных расстройств наблюдались у 15 (21,6%) человек.

Для определения возможной персистенции бокавируса были протестированы 66 образцов лимфоидной ткани аденоидов, полученных в результате проведения аденотомии у детей, проходивших лечение в ГУ «Республиканский научно-практический центр оториноларингологии». ДНК бокавируса выявлено в 13 (19,7%) образцах.

Выводы

Полученные результаты свидетельствуют, что бокавирус человека является инфекционным агентом, способным вызывать респираторные заболевания верхних и нижних дыхательных путей с различными клиническими проявлениями у детей первых лет жизни. Данные исследования показали возможность HBoV активно циркулировать в периферической крови в течение длительного времени, что не исключает его последующей персистенции в организме. При генерализации процесса и появлении виремии бокавирусная инфекция имеет тяжелое течение, и для ее лечения требуется госпитализация. Обнаружение ДНК бокавируса в лимфоидной ткани аденоидов без клинических проявлений ОРВИ позволяет полагать персистенцию вируса в лимфоидной ткани аденоидов и способствование развитию гиперплазии лимфоидного глоточного кольца у детей раннего и дошкольного возраста.

Внедрение молекулярно-генетических методов (ПЦР) диагностики в повседневную рутинную практику расширит эпидемиологические данные о бокавирусной инфекции.

ХАРАКТЕРИСТИКА СЕРОГРУППОВОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ *NEISSERIA MENINGITIDIS,* ВЫЗВАВШИХ ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫЕ ФОРМЫ МЕНИНГОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ НА ТЕРРИТОРИИ МОСКВЫ В 2016 ГОДУ

Матосова С.В.[1], Миронов К.О.[1], Смирнова В.С.[1], Шипулина О.Ю.[1], Нагибина М.В.[2], Чернышов Д.В.[2], Ченцов В.Б.[2], Смирнова Т.Ю.[2], Солдатова И.А.[2], Венгеров Ю.Я.[3], Платонов А.Е.[1], Шипулин Г.А.[1]

[1]ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия
[2]ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница № 2» Департамента здравоохранения, Москва, Россия
[3]Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия

Введение. Генерализованные формы менингококковой инфекции (ГФМИ) являются актуальной проблемой отечественного здравоохранения в связи с высоким уровнем заболеваемости среди взрослых и детей. Подавляющее число случаев ГФМИ в России вызывают менингококки серогрупп А, В, С, при этом значительная доля ГФМИ на территории Москвы были обусловлены менингококками серогруппы А. Определение серогрупп *N. meningitidis я*вляется важным элементом эпидемиологического надзора за менингококковой инфекцией. Данные о серогрупповом распределении менингококков позволяют прогнозировать и контролировать течение эпидемического процесса за счёт иммунопрофилактики.

Цель. Характеристика серогруппового распределения эпидемически значимых серогрупп *N. meningitidis*, вызвавших ГФМИ на территории Москвы в 2016 году, с использованием молекулярно-генетических методов.

Материалы и методы. Исследовали 37 образцов биологического материала (30 образцов спинномозговой жидкости и 7 образцов крови) от пациентов с ГФМИ, проходивших стационарное лечение в Инфекционной клинической больнице №2 г. Москвы в 2016 году. Во всех образцах была обнаружена ДНК *N. meningitidis* методом ПЦР-РРВ с использованием набора реагентов «АмплиСенс® *N.meningitidis / H.influenzae / S.pneumoniae*-FL» (производство ФБУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора). Среди пациентов, включённых в исследование, было 20 взрослых, 14 детей в возрасте от 1 месяца до 5 лет и 3 пациента в возрасте от 5 до 18 лет. Для определения серогрупп *N.meningitidis* использовалась методика на основе ПЦР-РРВ, разработанная в ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, описанная ранее [1]. В данной методике проводится детекция продуктов амплификации четырех серогрупп-специфических генетических локусов в формате «мультипрайм» для серогрупп A, B, C и W *N. meningitidis* одновременно с фрагментаом гена ctrA, присутствующим у всех менингококков. ПЦР-РРВ проводили на приборах «Rotor Gene3000/6000».

Результаты. Использованная методика позволила определить серогруппу *N. meningitidis* во всех 37 образцах. В 5 (13%) образцах обнаружена ДНК *N. meningitidis* серогруппы А, ДНК *N. meningitidis* серогруппы В обнаружена в 15 (41%) образцах, в 6 (16%) обнаружена ДНК *N. meningitidis* серогруппы С; ДНК *N. meningitidis* серогруппы W обнаружена в 11 (30%) образцах. Распределение серогрупп менингококков, выделенных от детей до 5 лет, отличалось от распределения серогрупп у взрослых пациентов. Наиболее часто от детей выделяли менингококки серогруппы В (8 из 14 образцов), а от взрослых пациентов – менингококки серогруппы W (9 из 20 образцов). Часть образцов (7 образцов, содержащих *N. meningitidis* серогруппы W и 3 образца, содержащих *N. meningitidis* серогруппы А) была охарактеризована методом мультилокусного секвенирования-типирования согласно международным требованиям, результаты генотипирования были опубликованы в международной базе данных http://pubmlst.org/neisseria/ [2].

Заключение. Наиболее часто в биологическом материале пациентов с ГФМИ обнаруживали менингококки серогруппы В, на втором месте по частоте выявления – менингококки серогруппы W. При этом по данным наших более ранних исследований [3] этиологической структуре ГФМИ на территории Москвы в последние годы преобладали менингококки серогруппы А.

Отличие полученных данных от результатов других исследований может объясняться малым размером

выборки, однако в нашей предыдущей работе [4] при изучении серогруппового распределения менингококков, циркулирующих на территории Москвы в период с 2012 по 2015 г. была показана тенденция к ежегодному снижению доли менингококков А в этиологической структуре ГФМИ, а в 2014-2015 – увеличению доли менингококков серогупп В и W. Таким образом, полученные результаты указывают на возможную смену доминирующей серогруппы *N. meningitidis* в 2016, что обуславливает необходимость пристального наблюдения за эпидемической обстановкой в отношении менингококковой инфекции на территории Москвы.

Литература

1. Миронов К.О., Платонов А.Е., Дрибноходова О.П. и др. Методика для определения серогрупп A, B, C и W Neisseria meningitidis методом ПЦР в режиме реального времени. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2014. №6: 35-42.

2. Миронов К.О., Житова В.А., Матосова С.В., и др. Генотипирование Neisseria meningitidis, вызвавших генерализованные формы менингококковой инфекции на территории Москвы в 2016 году. Молекулярная диагностика – 2017. М., 2017.

3. Матосова С.В., Миронов К.О., Паркина Н.В., и др. Определение серогрупп Neisseria meningitidis, выделенных из биологического материала пациентов с генерализованными формами менингококковой инфекции методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Материалы VII Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием. – С. 215.

4. Матосова С.В., Миронов К.О., Платонов А.Е., и др. Молекулярно-биологический мониторинг *Neisseria meningitidis* на территории Москвы в период с 2011 по 2015 г. Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2016. № 2. С. 4-9.

СПЕКТР ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСТРЫХ СРЕДНИХ ОТИТОВ И ПЕРСПЕКТИВЫ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

Маянский Н.А.[1], Яцышина С.Б.[2], Катосова Л.К.[1], Алябьева Н.М.[1], Куличенко Т.В.[1]

[1] *ФГАУ «Национальный научно-практический центр здоровья детей» Минздрава Российской Федерации*

[2] *ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора*

Введение. Этиологическая диагностика острого среднего отита (ОСО) предполагает исследование жидкости среднего уха (ЖСУ) на предмет наличия микробных агентов.

Цели и задачи. Сравнить результаты полимеразной цепной реакции (ПЦР) в носоглоточных мазках и ЖСУ.

Материалы и методы. В настоящей работе мы провели исследование ЖСУ, а также носоглоточных мазков, полученных от детей с ОСО (n=179), при помощи серии ПЦР для определения бактерий (7 видов) и вирусов (17 видов). Для выявления бактериальных возбудителей проводили обычное культуральное исследование параллельно с ПЦР.

Основные результаты. Распространенность патогенов с долей ≥3% по данным ПЦР составила: *S. pneumoniae* (70,4%), *H. influenzae* (17,9%), *S. aureus* (16,8%), *S. pyogenes* (12,3%), *M. catarrhalis* (9,5%), *Rhinovirus* (9,5%), *Adenovirus* (3,4%). Для бактериальных патогенов доля ПЦР-положительных образцов была в 2,6 раза выше (95% доверительный интервал 2,3-3,0 раза) по сравнению с культуральным результатом. Сравнение результатов ПЦР в ЖСУ и носоглоточных мазках показало похожую частоту положительных образцов и состав возбудителей в указанных видах биоматериала. Результаты ПЦР в носоглотке были в высокой степени конкордантны результатам, полученным при исследовании ЖСУ. Носоглоточные результаты обладали вариабельным положительным прогностическим значением и высоким отрицательным прогностическим значением при определении наличия соответствующего патогена в ЖСУ.

Заключение. Таким образом, наши результаты предполагают, что ПЦР-исследование материала, полученного из носоглотки, может быть полезным инструментом для выявления респираторных патогенов у детей с ОСО.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ДИАГНОСТИКИ ГРИППА И ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ В РЕСПУБЛИКЕ ДАГЕСТАН (ПО МАТЕРИАЛАМ ЭПИДЕМИИ 2015-2016 ГОДОВ)

Омариева Э.Я., Милихина А.В.

Управление Роспотребнадзора по Республике Дагестан, ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Дагестан», Махачкала, Россия

В последние годы молекулярно-биологические исследования заняли ведущее место в мониторинге вирусных инфекций в системе Роспотребнадзора. В настоящее время трудно переоценить важность диагностики гриппа и острых вирусных инфекций методом полимеразной цепной реакции в «режиме реального времени» (ПЦР), особенно у больных с сопутствующей патологией респираторной, сердечно-сосудистой систем, у беременных и при различных иммунодефицитах.

Целью настоящего исследования явилось обоснование алгоритма проведения исследований для этиологической расшифровки заболеваний верхних и нижних дыхательных путей с учётом особенностей эпидемии, вызванной пандемическим гриппом А (H1N1) pdm 09 в эпидсезон 2015 – 2016 годов в Республике Дагестан.

Материалы и методы. Исследовали мазки из носа и ротоглотки, взятые у больных с явлениями ОРВИ, брон-

хита и пневмонии ПЦР-методом в режиме реального времени. Всего исследовано за 2015-2016 годы – 3757 проб.

Выделение РНК/ДНК проводили с использованием коммерческих наборов ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора «РИБО-преп», обратную транскрипцию – с помощью набора реагентов «Реверта-L». Амплификацию при исследовании на грипп и ОРВИ - методом ПЦР в режиме реального времени тест-системами: «АмплиСенс Influenza virus A/B-FL», «АмплиСенс Influenza virus A-тип-FL», «Амплисенс Influenza virus A/H1-swine-FL» и «АмплиСенс ОРВИ-скрин- FL» того же производителя.

Результаты и обсуждение. В Республике Дагестан заболеваемость острыми респираторными вирусными инфекциями остаётся на среднем уровне, многолетний показатель заболеваемости за последние 5 лет - 4082,1 на 100,0 тыс. населения.

В 2016 г. в соответствии с данными лабораторного мониторинга на базе вирусологической лаборатории ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Дагестан» увеличено количество исследований носоглоточных соскобов на грипп и другие ОРВИ в 1,2 раза (в 2015 г.- 1701 проба; 2016 г. – 2056 проб). Выявление НК вирусов ОРВИ в 2016 г. составило 16,6%, что на 8,4 % меньше, чем в 2009 г. (2009 г. – 25,0 %) (табл.1).

Таблица № 1

Результаты исследования носоглоточных мазков на вирусы гриппа и ОРВИ методом ПЦР в «режиме реального времени»

Год	Количество исследованных носоглоточных мазков	из них с наличием НК вирусов абс/%	в том числе:							
			грипп А (H1N1) pdm 09 абс/%	грипп А H3N2 абс/%	грипп В абс/%	парагрипп абс/%	аденовирусы абс/%	РС-вирус абс/%	метапневмовирус	риновирус
2009	1767	442	424	2	2	6	6	2	-*	-*
		25,0	96,0	0,45	0,45	0,36	0,36	0,45	-	-
2015	1701	236	42	32	6	33	32	40	6	45
		13,9	17,8	13,6	2,5	14,0	13,6	17,0	2,5	19,1
2016	2056	342	87	34	19	30	30	37	35	70
		16,6	25,4	9,9	5,6	8,8	8,8	10,8	10,2	20,5

* Примечание – не проводилась диагностика.

Как в 2016, так и в 2009 году ведущим этиологическим агентом оставался вирус пандемического гриппа А (H1N1) pdm 09 (96% и 25,0 % от положительных находок РНК, соответственно). В конце эпидемического периода 2015 – 2016 годов начал выделяться метапневмовирус, который по этиологической структуре был на четвёртом месте в 2016 г., а в 2015 г. – лишь на седьмом месте. (2015 г. – 2,5%, 2016 г. – 10,2 %). Особенно часто РНК метапневмовируса обнаруживалась при тяжёлых формах пневмоний и обструкционных бронхитов, иногда в сочетании с гриппом А или гриппом В.

В эпидсезон 2015 – 2016 годов, с 28.10.2015 г. по 12.03.2016 г. было зарегистрировано 146 случаев гриппа, в том числе у 14 – беременных женщин с тяжёлой формой течения. Преобладающим в этиологии был вирус гриппа А (H1N1) pdm 09 – 119 лиц (81,5%), на втором месте – вирус гриппа А H3N2 – 17 лиц (11,6%), на третьем - грипп В – 10 (6,8%). Осложнённые формы гриппа А и В наблюдались в 50,7% - 74 случая у больных с диагнозами пневмония, острый бронхит и хроническая обструктивная болезнь лёгких (ХОБЛ).

Алгоритм ПЦР-исследований при проведении диагностики в случаях тяжёлого течения заболевания был следующим: исследования на грипп А/В с одновременной постановкой на грипп А (H1N1) pdm 09 и грипп А H3N2 с целью ускорения выдачи результатов в эпидемический период.

Расшифровку других ОРВИ целесообразно проводить с использованием тест-системы «АмплиСенс ОРВИ-скрин- FL», позволяющей расширить спектр определяемых возбудителей ОРВИ, особенно метапневмовирусов, играющих существенную роль в этиологии пневмоний.

Заключение. В эпидсезон 2015 - 2016 годов осложнённые формы ОРВИ наблюдались как при различных серотипах гриппа А, так и при гриппе В и инфицировании метапневмовирусом. В эпидсезон 2009-2010 годов тяжёлые формы регистрировались только при осложнении грипп А (H1N1) pdm 09.

Алгоритм проведения ПЦР-исследований при осуществлении мониторинга за ОРВИ должен включать параллельные исследования на грипп А/В, грипп А (H1N1) pdm 09 и грипп А H3N2 с использованием соответствующих тест-систем.

Внедрение предложенного алгоритма способствует увеличению выявляемости вирусов и сокращению сроков при проведении противоэпидемических мероприятий.

Совершенствование лабораторного мониторинга будет способствовать улучшению эпидемиологической ситуации по гриппу и ОРВИ в республике в целом.

КЛОНАЛЬНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ ПНЕВМОКОККОВ СЕРОТИПА 19А В РОССИИ (2002-2013 ГГ.)

Маянский Н.А.[1], Лазарева А.В.[1], Алябьева Н.М.[1], Савинова Т.А.[1], Козлов Р.С.[2]

[1] ФГАУ «Национальный научно-практический центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

[2] НИИ антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии, Смоленск, Россия

Введение

Streptococcus pneumoniae остается одной из основных причин инвазивных и респираторных заболеваний у детей и взрослых. После введения вакцинации 7-валентной пневмококковой конъюгированной вакцин*ой* (ПКВ7) в США в 2000 году, а затем и в других странах, частота *инвазивных пневмококковых инфекций*, вызываемых вакцинными серотипами пневмококка, значительно снизилась среди детей и взрослых. В то же время частота заболеваний, вызываемых невакцинными серотипами, в том числе серотипом 19А, возросла, что связано с явлением замещения серотипов. Однако в некоторых регионах (Израиль, Южная Корея) увеличение распространенности серотипа 19А наблюдалось и до введения вакцинации.

Цель и задачи

Целью данного исследования было оценить антибиотикорезистентность пневмококков серотипа 19А, циркулировавших на территории России в 2002-2013 гг., и охарактеризовать клональную структуру данной популяции до введения вакцинации.

Материалы и методы

В исследование были включены клинические изоляты *S. pneumoniae*, выделенные в разных регионах России от педиатрических пациентов с респираторными инфекциями различной локализации. Чувствительность изолятов к антибиотикам определяли методом Е-тестов и диско-диффузионным методом. Определение серотипов пневмококков проводили в реакции набухания со специфическими антисыворотками. Определение клональной принадлежности изолятов проводили с помощью метода мультилокусного сиквенс-типирования (MLST, Multi Locus Sequence Typing).

Результаты

Изученная коллекция включала 18 изолятов, выделенных в 2003 году в европейской части России (Москва, Санкт-Петербург, Смоленск), 9 изолятов, выделенных в 2002-2008 гг. в азиатской части России (Иркутск, Новокузнецк, Екатеринбург, Анадырь), и 22 изолята, выделенных в Москве в 2010-2013 гг.

Всего было выявлено 25 сиквенс-типов (ST, sequence type) (в том числе 14 новых), относящихся к 6 клональным линиям/комплексам (CC, clonal complex), 3 ST были синглетонами, т.е. не обладали определенной клональной принадлежностью. Распределение клональных комплексов значительно различалось по регионам. Так, в 2003 году изоляты, выделенные в европейской части России, были представлены двумя клональными комплексами: CC663 (n=12) и CC156 (n=6). В период с 2010 по 2013 гг. эти клоны были вытеснены CC230 и CC320, в сумме составляющими 73% (16/22) от всех изолятов, выделенных в этот период. Пять из 9 азиатских изолятов были синглетонами, а 3 относились к CC230.

Наиболее распространенный клон CC663 (n=14, 28%) был представлен 4 ST (663, 10515, 10434, 10435). Данная линия доминировала в Европейской части России в 2003 году (67%), в период с 2010 по 2013 гг. было выделено только 2 изолята, принадлежащих к этому клональному комплексу. 79% изолятов CC663 обладали множественной устойчивостью (МУ) к антибиотикам, с высокими значениями МПК β-лактамов. Все резистентные к цефтриаксону изоляты (n=4; МПК>2 мг/л) относились к этому клональному комплексу.

Второй по распространенности клональный комплекс CC230 (n=12, 25%) включал 8 ST. Большая часть изолятов этого СС была выделена в Москве в 2010-2013 гг. Изоляты данного СС отличались умеренными или низкими значениями МПК β-лактамов, резистентностью к ко-тримоксазолу и сохраняли чувствительность к клиндамицину, хлорамфениколу и тетрациклину. Пять изолятов CC230 (42%) обладали МУ-фентотипом.

Семь пневмококков (14%) относились к CC156, включавшему 4 ST, причем 6 из 7 изолятов были выделены в европейской части России в 2003 году. Эти пневмококки обладали высокой резистентностью к амоксициллину (с МПК=4-8 мг/л, превышающей МПК пенициллина), были устойчивы к ко-тримоксазолу, но сохраняли чувствительность к эритромицину, хлорамфениколу и тетрациклину.

Клональный комплекс 320 (n=7, 14%) был выявлен только в период с 2010 по 2013 гг. и был представлен двумя ST (ST320и ST9656). Все пневмококки данного СС обладали МУ-фенотипом, причем у 6 изолятов значения МПК амоксициллина превышали МПК пенициллина.

Девять изолятов, в том числе все чувствительные к пенициллину изоляты (n=6), были представлены различными клональными линиями или генетически не связанными ST.

Заключение

80% изученной коллекции изолятов относились к четырем глобально распространенным клональным комплексам, CC156, CC230, CC320 и CC663. Результаты данного исследования свидетельствуют о том, что циркулирующие в настоящее время в европейской части России пневмококки серотипа 19А относятся преимущественно к CC230 и CC320 (70%), замещая распространенные ранее CC156 и CC663. Все изоляты CC156, CC320 и CC663 имели значения МПК пенициллина ≥1 мг/л, в то время как изоляты CC230 характеризовались умеренными и низкими значениями МПК пенициллина, и были полностью чувствительны к амоксициллину и цефтриаксону. Это свидетельствует о клональных различиях чувствительности к β-лактамным антибиотикам в исследуемой популяции пневмококков. Поскольку

данная коллекция изолятов была получена до включения ПКВ в Национальный календарь профилактических прививок в 2014 году, описанная эволюция клональной структуры пневмококков серотипа 19А носила ПКВ-независимый характер, как и в некоторых других регионах. Распространение небольшого числа клонов серотипа 19А, скорее всего, связано с их конкурентными преимуществами на генном уровне, а также с селективным давлением антибиотиков.

АНТИГЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АДЕНОВИРУСОВ, ВЫЗВАВШИХ ЗАБОЛЕВАНИЯ СРЕДИ ВОЕННОСЛУЖАЩИХ

Тимошичева Т.А.[1], Амосова И.В.[1], Егорова А.А.[1], Бузицкая Ж.В.[1], Львов Н.И.[2]

[1]ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

[2]ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Аденовирусы (АВ) впервые были выделены в 1953 г. Роу и соавторами. К настоящему времени известно более 90 серотипов АВ, отличающихся по антигенным свойствам, фенотипическим проявлениям и способности вызывать ту или иную патологию у различных млекопитающих. 51 из известных серотипов оказались патогенными для человека. На основе степени гомологии ДНК и содержания в ней GC-пар оснований АВ человека из рода Mastadenovirus распределены в шесть подгрупп (A-F).

Изучение этиологии заболеваемости ОРВИ среди военнослужащих в последние годы показало, что до половины всех ОРВИ во вновь сформированных воинских коллективах имеют АВ этиологию. АВ выделяются от новобранцев в 30-70% и вызывают до 80% случаев пневмонии среди военнослужащих.

Цель работы: изучение антигенного разнообразия АВ, вызывающих заболевания среди военного контингента.

Материалы и методы. Исследованы 349 клинических образцов (назофарингеальные мазки) от пациентов, госпитализированных в ВМА им. С.М. Кирова г. Санкт-Петербург с симптомами острого респираторного заболевания в апреле-июле 2014 г. и с сентября 2015 по январь 2016 гг. Мазки собирали в первые сутки госпитализации и не позднее 6 суток от начала заболевания, подвергали замораживанию и хранили при температуре -20ºС до проведения исследований.

Для выявления нуклеиновых кислот вирусов гриппа А и В и ОРВИ методом ПЦР с детекцией в реальном времени (ПЦР-рв) использованы тест-системы «АмплиСенс® Influenza virus A/B-FL», «АмплиСенс® Influenza vims A/H1-swine-FL», «АмплиСенс® Influenza virus A-тип-FL», «АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL» (ЦНИИЭ, Москва).

Выделение ДНК АВ проводили с помощью коммерческого набора RNeasy Mini Kit, Qiagen.

Секвенирование проводили методом Сэнгера с использованием прямого и обратного праймеров на участок гена фибриллы с помощью коммерческого набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Secuencing Kit, Applied Biosystems.

Обработку секвенированных нуклеотидных последовательностей осуществляли с использованием программы Vector NTI 10 Advance, Invitrogen. Секвенированные последовательности были выровнены с последовательностями участков фибриллы референс-штаммов, депонированных в базе данных GenBank.

Результаты. С помощью ПЦР определен спектр респираторных вирусов, вызвавших заболевания среди военнослужащих. В 120 образцах были выявлены АВ, в 57 образцах - вирусы гриппа А, среди которых 2 вируса принадлежали к субтипу A(H3N2), 50 были идентифицированы как A(H1N1)pdm09; в 25 образцах были выявлены вирусы гриппа В, в 11 образцах - одновременно вирусы гриппа А и В. Риновирус был обнаружен в 57 образцах, респираторно-синцитиальный вирус – в 38, бокавирус и коронавирус – по 1 образцу, соответственно. Наиболее частым вариантом сочетанной инфекции было сочетание АВ с риновирусами (27 образцов) и респираторно-синцитиальным вирусом (24 образца).

Из 120 образцов, положительных на наличие АВ по данным ПЦР, для проведения филогенетического анализа гена фибриллы АВ были отобраны 25 материалов, циклы детектирования АВ которых в ПЦР не превышали 15. По результатам исследования 10 образцов АВ, полученных в 2014 г., принадлежали к подгруппе Е, 4 серотипу. Среди 15 образцов, полученных в 2015-2016 гг., 14 АВ так же принадлежали к подгруппе Е, 4 серотипу, один образец принадлежал к группе В и его серотип определен как 7.

Известно, что АВ 4 серотипа подгруппы Е вызывает эпидемические фолликулярные конъюнктивиты и ОРВИ. АВ 7 серотипа подгруппы В также преимущественно связаны со вспышками ОРВИ и диареями. По данным ВОЗ на их долю приходится до одной трети всех изолятов АВ. Анализ клинической картины заболевания среди больных, госпитализированных в ВМА им. С.М. Кирова, показал наличие у них как респираторных, так и смешанных форм заболеваний в сочетании с лихорадкой, а так же фарингитом, тонзиллитом, конъюнктивитом, в 2 случаях была диагностирована пневмония.

Полученные результаты коррелируют с литературными данными, по которым АВ 4 и 7 серотипов являются частой причиной вспышек ОРВИ, связанных с воспалением легких, госпитализацией, а также отдельных смертельных случаев среди военнослужащих (особенно призывников) и вместе составляют 60% от всех госпитализированных случаев ОРВИ среди военнослужащих срочной службы. Разработка мер специфической профилактики АВ инфекции могла бы существенно снизить эти показатели и повысить боеготовность Вооруженных сил России.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА *NEISSERIA MENINGITIDIS И STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE,* СОДЕРЖАЩИХСЯ В СПИННОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ БОЛЬНЫХ МЕНИНГИТОМ

Чагарян А.Н., Иванчик Н.В.

НИИ антимикробной химиотерапии ГОУ ВПО Росздрава, Смоленский государственный медицинский университет, Смоленск, Россия

Введение. Гнойный бактериальный менингит (ГБМ) как форма инфекционной нейропатологии занимает важное место в структуре заболеваний нервной системы и остается одной из причин летальности и инвалидизации больных. Во всем мире ведущими возбудителями бактериального менингита являются *Neisseria meningitidis* (менингококк), *Streptococcus pneumoniae* (пневмококк) [1, 2]. По данным ВОЗ, острый бактериальный менингит входит в число пяти инфекций, характеризующихся наивысшей смертностью среди всех возрастных групп. Уровень летальности при менингококковом менингите составляет – 10-15%, при пневмококковом менингите – 15-30%. По структуре капсульного полисахарида у *N. meningitidis* выделяют 12 серогрупп. Наибольшее эпидемиологическое значение для российских территорий имеют штаммы серогрупп А, В и С [3]. Так, в России за период 2010-2013 гг. генерализованные формы менингококковой инфекции в 18-27% случаев были вызваны менингококками серогруппы А, в 25-32% – серогруппы В, в 19-20% – серогруппы С, и лишь 1,2-2,4% случаев были вызваны менингококками других серогрупп [3]. У *S. pneumoniae* по антигенным особенностям капсульных полисахаридов выделяют более 90 серотипов. Однако только около 15 являются причиной основных инвазивных пневмококковых инфекций. Пневмококковый менингит чаще всего вызывается серотипами 14, 6В, 18С, 23F, 19F и 6А [4].

Быстрые изменения, происходящие в популяционной структуре пневмококков и менингококков на фоне вакцинации, резко повысили требования к методам наблюдения за этими бактериями. Для идентификации *S. pneumoniae, N meningitidis* в лабораториях используются, в основном, бактериологические и серологические методы, и полноценной картины о распространении на этих территориях возбудителей гнойного бактериального менингита нет. Значительное расширение объемов исследований по молекулярному серотипированию дает уникальную возможность проводить эпидемиологические сопоставления, выявлять опасные клоны и прогнозировать возможное эпидемическое неблагополучие.

Цель: молекулярно-генетическая характеристика *N. meningitidis* и *S. pneumoniae*, содержащихся в спинномозговой жидкости больных ГБМ.

Материалы и методы. Работа проводилась на базе лаборатории молекулярной диагностики НИИ АХ Смоленского государственного медицинского университета. Исследовались образцы спинномозговой жидкости от пациентов с диагнозом ГБМ, поступившие на исследование в период с января по ноябрь 2016г.

Выделение ДНК из клинического материала проводили с помощью набора реактивов «ДНК-сорб-АМ» с дальнейшим проведением полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РРВ) при помощи набора реактивов *Neisseria meningitidis/ Haemophylus influenzae/ Streptococcus pneumoniae*-FL (АмплиСенс®, ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Амплификация проводилась в формате «мультипрайм» на приборе «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия). Для определения серогрупп А, В, С и W *N. meningitidis*, и серотипирования *S. pneumoniae* использовали ПЦР-РРВ методики в формате «мультипрайм» [5,6]. Для амплификации использовали термоциклер «RotorGene 6000» («Corbett Research», Австралия) с пятью каналами флуоресцентной детекции.

Результаты. Проанализировано 25 образцов ликвора от пациентов с диагнозом ГБМ в возрасте от 11 мес. до 65 лет. Было определено, что доминирующим возбудителем ГБМ, идентифицированным в СМЖ, был *N. meningitidis* (17 случаев, 68%), вторым по встречаемости был *S. pneumoniae* (8 случаев, 32%).

Среди исследуемых нами образцов, в которых обнаружена ДНК менингококка, наблюдалось следующее распределение серогрупп: *N. meningitidis* С – 64,3% (n=9), А – 28,5% (n=4), В – 28,5% (n=4), таким образом, серогруппу удалось обнаружить во всех исследованных образцах. Среди пациентов с менингококковым менингитом 76,5% составили дети в возрасте от 11 месяцев до 14 лет. В детской популяции доминировали менингококки серогруппы С. При этом у одного ребенка в возрасте 2-х лет был зарегистрирован летальный случай, вызванный *N. meningitidis* серогруппы С. У взрослых (возраст обследованных 30-50 лет) преобладали менингококки серогруппы В.

Из 8 образцов ликвора от пациентов с пневмококковым менингитом «вакцинные» серотипы был определены только в 6 случаях. Было идентифицировано 3 серотипа пневмококка, доминировал 6А/В серотип (50%, в 4 случаях), серотипы 9NL и 23F выделялись в 12,5 % (по 1 случаю). В двух клинических образцах (25%) серотип пневмококка определить не удалось. Так, один образец ликвора, вероятно, содержал ДНК пневмококка, серотип которого не определялся данной методикой, а другой клинический образец, содержал ДНК *S. pneumoniae,* неспособного к синтезу капсулы, так как отсутствовал продукт амплификации гена cps (положительного внутреннего контроля). В структуре заболевших с диагнозом «пневмококковый менингит» 75% составляли взрослые в возрасте от 35 до 65 лет, 25% – дети в возрасте от 1 мес. до 4 лет. У обоих детей был выявлен пневмококк серотипа 6А/В (данный серотип входит в состав 13-валентной вакцины), при этом случай пневмококкового менингита у ребенка в возрасте 1 год закончился летальным исходом.

Выводы. Использование методик [5,6] позволило определить серогруппу во всех клинических образцах, содержащих ДНК *N. meningitidis*, и серотип в 75 % образцов, содержащих ДНК *S. pneumoniae*. Информация об антигенном разнообразии основных возбудителей ГБМ

необходима для эпидемиологического контроля (мониторирование циркуляции ведущих возбудителей), принятия решений о вакцинации и контроля эффективности вакцинации в различных группах населения.

Методика ПЦР-РРВ проще, чем «классические» микробиологические (бактериологические и серологические) методы, так как позволяет охарактеризовать возбудителя без этапа высева и получения штамма.

Список литературы

1. Баранов А.А., Намазова Л.С., Таточенко В.К. Пневмококковая инфекция и связанные с ней заболевания – серьезная проблема современного здравоохранения. Педиатрич. фармакол. 2008; 5 (2): 7–12.

2. Walker C.L., Rudan I., Liu L. et al. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. Lancet. 2013; 381:1405–1416.

3. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Коллегия Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Решение № 5 от 26.06.2014 г.

4. Balachandran, P. Role of pneumococcal surfase protein C in nasopharyngeal carriage and pneumonia and its abilitu to elicit protection against carriage of Streptococcus pneumoniae // Infect. Immun., 2002., Vol. 70. P. 2526-2534.

5. Миронов К.О., Платонов А.Е., Дрибноходова О.П., Кусева В.И., Шипулин Г.А. Методика для определения серогрупп A, B, C и W *Neisseria meningitidis* методом ПЦР в режиме реального времени. Журн. микробиол. 2014; №6: 35-42.

6. Миронов К.О., Платонов А.Е., Дунаева Е.А., Кусева В.И., Шипулин Г.А. Методика ПЦР в режиме реального времени для определения серотипов *Streptococcus pneumoniae*. Журн. микробиол. 2014; №1: 41-48.

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ *LEGIONELLA PNEUMOPHILA,* ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ КРЫМ

Портенко С.А., Осина Н.А., Краснов Я.М., Гусева Н.П., Шарапова Н.А.

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

В рамках эпидемиологического надзора за легионеллезной инфекцией в Российской Федерации проводится количественная оценка уровня контаминации возбудителя легионеллеза в потенциально опасных водных системах [Онищенко Г.Г., 2009]. До момента настоящих исследований мониторинг за возбудителями легионеллеза в объектах окружающей среды на территории Республики Крым не осуществлялся.

В период Летней оздоровительной кампании в 2014 г. в Республике Крым силами специалистов СПЭБ в соответствии с положениями приказа Роспотребнадзора № 408 от 15.05.2014 г. и согласованным Порядком мониторинга проб окружающей среды и скрининга проб пищевых продуктов и продовольственного сырья осуществлялся микробиологический мониторинг возбудителя легионеллеза в объектах окружающей среды. Объектами мониторинга являлись учреждения, несущие большую рекреационную нагрузку: международный детский центр (МДЦ) «Артек», бассейн филиала МГУ им. М.В. Ломоносова, пансионат «Любоморье», аквапарк «Зурбаган», детский оздоровительный лагерь (ДОЛ) «Ласпи», аквапарк «Голубой залив», пансионат им. Терлецкого (п. Форос), а также 1 Городская больница г. Севастополь.

Микробиологические исследования проб из объектов окружающей среды на легионеллез проводили на базе лабораторного центра г. Севастополь в соответствии с действующими нормативно-методическими документами. Детекцию ДНК и количественный анализ *L. pneumophila* осуществляли с использованием набора реагентов «АмплиСенс *Legionella pneumophila*-FL» (ФГУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора). Для бактериологических исследований применяли забуференный угольно-дрожжевой агар (БУДРАГ) (Oxoid) с ростовой и селективной добавками, идентификацию и определение принадлежности к серогруппе выделенных штаммов легионелл проводили методом латекс-агглютинации с помощью набора Legionella latex test (Oxoid).

При исследовании проб воды немедицинских организаций на первом этапе применяли метод ПЦР-РВ. При получении отрицательных результатов методом ПЦР выдавали протоколы с заключением об отсутствии ДНК возбудителя легионеллеза в анализируемых пробах воды. Все пробы, в которых была обнаружена ДНК *Legionella pneumophila,* исследовали культуральным методом. Окончательный положительный ответ выдавали только по результатам бактериологического исследования.

Пробы воды из систем ГВС хирургических и реанимационных отделений ГБ № 1 г. Севастополь исследовали только бактериологическим методом. Такое решение было принято в связи с тем, что в соответствии с МУ 3.1.2.2412-08 в пробах воды из систем водоснабжения ООМД не допускается наличия как *L. pneumophila*, так и *Legionella* spp., а единственный разрешенный к применению в установленном порядке на территории РФ (на тот момент времени), набор реагентов «АмплиСенс Legionella pneumophila-FL», позволял выявлять только вид *Legionella pneumophil*a. В пробах воды из систем ГВС ГБ № 1 г. Севастополь бактериологическим методом *L. pneumophila* и *Legionella* spp. не были обнаружены.

Всего во время проведения Летней оздоровительной кампании 2014 г. в Республике Крым было исследовано 45 проб воды. Выделено 14 культур *L. pneumophila*, концентрация возбудителя в исследуемых пробах варьировала от $5{,}0\times10^{1}$ до $1{,}2\times10^{3}$ м.к./л, в девяти случаях концентрация возбудителя превышала допустимые показатели (1×10^{2} м.к./л). По результатам агглютинации пять культур отнесены к 1 серогруппе, девять - ко 2-14 серогруппе, причем из одной пробы воды выделено одновременно две культуры *L. pneumophila*, относящихся к разным серогруппам (1 и 2-14).

Дальнейшее изучение выделенных культур легионелл с помощью метода мультилокусного секвенирования (MLST) проводили на базе ФКУЗ РосНИПЧи «Микроб» Роспотребнадзора. В целях экстракции геномной ДНК применяли набор «ДНК-сорб-В». Амплификацию и секвенирование фрагментов семи генов *L. pneumophila*: *flaA, pilE, asd, mip, mompS, proA* и *neuA* осуществляли в соответствии с алгоритмом Европейской исследовательской группы по легионеллезу (EWGLI) Sequence-Based Typing protocol for epidemiological typing of *L. pneumophila* (www.ewgli.org.). Данный протокол является международным стандартом типирования штаммов легионелл и применяется в качестве быстрого и легко сопоставимого метода как при расследовании вспышек легионеллеза, так и для характеристики штаммов *L. pneumophila*, выделенных из объектов окружающей среды.

Секвенирование полученных фрагментов ДНК выполняли на генетическом анализаторе ABI 3500xL (Applied Biosystems), анализ последовательностей и их выравнивание – с помощью программы MEGA 7.0. Определение аллельного профиля и сиквенс-типа (ST) изучаемых штаммов легионелл осуществляли в автоматическом режиме на сайте www.ewgli.org, с использованием базы данных EWGLI SBT. Данная база содержит последовательности более 11000 штаммов возбудителя легионеллеза и более чем 2300 разновидностей ST *L. pneumophila*.

Анализ полученных данных показал, что из пяти штаммов *L. pneumophila* 1 серогруппы один имел аллельный профиль 1,4,3,1,1,1,1, что определяет его принадлежность к 1 сиквенс-типу (ST-1). Для десяти штаммов *L. pneumophila* (четыре – 1 серогруппы и шесть – 2-14 серогруппы) был определен генотип ST-967, аллельный профиль составил 2,10,3,3,9,14,3. Помимо этого, три штамма 2-14 серогруппы были отнесены к генотипу ST-366, аллельный профиль - 2,10,3,3,9,4,6, соответственно. Выделение штамма *L. pneumophila* генотипа ST-366 на территории нашей страны зафиксировано при проведении микробиологического мониторинга контаминации систем ГВС возбудителем легионеллеза во время подготовки и проведения XII Олимпийских и XI Паралимпийских зимних игр в г. Сочи [Ежлова Е.Б. с соавт., 2015]. О широком распространении штаммов *L. pneumophila* генотипа ST-1 в объектах окружающей среды свидетельствуют многочисленные данные отечественных и зарубежных исследователей [Воронина О.Л. с соавт., 2008; Ежлова Е.Б. с соавт., 2015; Edmond M.B. et al., 2010; Ginevra C. et al., 2011; Qin T. et al., 2014].

Таким образом, впервые на территории Республики Крым проведен количественный микробиологический мониторинг объектов окружающей среды, выделены штаммы *L. pneumophila,* проведена их расширенная идентификация, в том числе - с использованием метода мультилокусного секвенирования. Полученные данные могут быть использованы при оценке уровня контаминации легионеллами эпидемически значимых объектов на территории Республики Крым.

ТИП ИММУННОГО ОТВЕТА КАК ФАКТОР ТЯЖЕЛОГО И ОСЛОЖНЕННОГО ТЕЧЕНИЯ ГРИППА

Головачёва Е.Г., Афанасьева В.С., Афанасьева О.И., Осидак Л.В., Образцова Е.В., Королева Е.Г.

ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России

Введение

Преимущественный клеточный Th1 или гуморальный Th2 тип иммунного ответа, характеризующийся изменением баланса ранних цитокиновых реакций, зависит от индивидуальных особенностей иммунной системы человека, дозы и вирулентности возбудителя, оказывает влияние на клинические проявления заболевания гриппом.

Цель исследования: выявить закономерности влияния типов иммунного ответа на развитие осложнений при гриппе для обоснования применения препаратов интерферона и его индукторов.

Материалы и методы

С использованием разработанного ранее способа определения типов иммунного ответа на основании коэффициентов поляризации (КП), полученных в результате расчета соотношения показателей содержания в сыворотке крови цитокинов, определяемых методом ИФА, КП1=IL-4/IFNγ и КП2=IL-10/IFN-γ у 630 детей разного возраста от 3-х до 18 лет при верификации гриппа в соскобах из носа методом ПЦР были определены Th1, Th2 или смешанный Th1/Th2 тип иммунного ответа. Исследование проводилось на разных сроках от начала заболевания (в первые двое суток, на 3-4-й день и в периоде реконвалесценции).

Результаты

Во всех возрастных группах при гриппе с выраженной интоксикацией в начале заболевания поляризация иммунного ответа по Th2 типу (КП1 и КП2 больше 3) определялась в 55,3% случаев и статистически значимо чаще (в 78,4% случаев) при развитии бронхолегочных осложнений. Смешанный тип иммунного ответа Thl/Th2 встречался у четверти пациентов при любой форме гриппа (КП1=2,1-2,9 и КП2=1,8-2,8). Показано, что тяжелая степень тяжести заболевания при гриппе ассоциирована с Th2 типом иммунного ответа, определяемом при КП1 и КП2 больше 3, что обусловлено снижением активации цитокиновых реакций интерфероном первого типа. В период разгара заболевания (3-4-й день) происходит усиление дисбаланса про- и противовоспалительных цитокинов с увеличением КП1 за счет роста содержания IL-4 и снижением IFN-γ, что соответствует поляризации иммунного ответа по Th2 типу. При развитии бронхолегочных осложнений отмечается значительное повышение содержания IL-10, что приводит к увеличению КП2 в 2-3 раза и связано с недостаточностью цитотоксических иммунных реакций лимфоцитов-киллеров (CD8+, CD16+) и снижением функциональной активности интерферон-продуцирующих клеток. Показано, что при гриппе раннее применение препаратов интерферона и его индукторов способствует активации клеточного Th1 типа иммунного ответа, а при более позднем применении препаратов в комплексной терапии гриппа у детей отмечается увеличение уровня

интерферонов обоих типов в периоде реконвалесценции, за счет чего не происходит чрезмерной стимуляции Th2 иммунного ответа в поздние сроки, что соответствует сокращению периода интоксикации, катаральных симптомов и продолжительности всего заболевания.

Заключение. При определении у детей разного возраста в начале заболевания гриппом показателей КП1=IL-4/IFN-γ и КП2=IL-10/FN-γ больше 3, ассоциированных с Th2 типом иммунного ответа, возможно прогнозирование развития осложнений. Раннее применение препаратов рекомбинантного IFN-α2b и/или индукторов интерферона способствует поляризации иммунного ответа по Thl клеточному типу для предупреждения осложнений.

ВЫЯВЛЕНИЕ СЛУЧАЕВ ИНФИЦИРОВАНИЯ ЛЮДЕЙ РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНЫМ ВИРУСОМ ЧЕЛОВЕКА В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ В 2013-2016 ГОДАХ

Синцова К.С., Мусаева Т.Д., Писарева М.М.

ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Введение

Респираторно-синцитиальный вирус человека (РСВ) является одной из важнейших причин, вызывающих заболевания респираторного тракта, особенно у детей до 5 лет, пожилых людей, а также у людей с иммунодефицитами. Клинические проявления РСВ могут быть как симптоматически мягко выраженными, так и приводить к таким тяжелым заболеваниям, как бронхиолиты и пневмония. До 70% детей в возрасте до 1 года, госпитализированных с бронхиолитами, обусловленными РСВ, подвержены рецидивирующим эпизодам бронхообструкции в течение последующих 6-12 лет, что связано с риском развития бронхиальной астмы. На совещании в марте 2015 г. ВОЗ настоятельно рекомендовал включить наблюдение за заболеваемостью РСВ-инфекцией в программу глобального надзора за респираторными заболеваниями. На данный момент не существует вакцин от РСВ, а также направленных против данного вируса лекарственных препаратов.

Цель и задачи

Целью данной работы являлся анализ распространения РСВ инфекции у больных с симптомами ОРВИ, госпитализированных в клиники Санкт-Петербурга в 2013-2016 гг. Были поставлены следующие задачи:

1. Оценить количество РСВ от общего числа выявленных ОРВИ в Санкт-Петербурге за период 2013-2016 г.

2. Оценить встречаемость РСВ-инфекции у пациентов различных возрастов.

3. Оценить количество ко-инфекций РСВ и других респираторных патогенов.

Материалы и методы

Выделение РНК вируса из назофарингеальных мазков больных с симптомами ОРВИ (по стандартному определению случая ВОЗ), госпитализированных в клиники Санкт-Петербурга, проводилось при помощи коммерческого набора «Ампли-Прайм РИБО-преп», ИнтерЛабСервис, Москва. Реакцию обратной транскрипции осуществляли с использованием коммерческого набора реагентов «Реверта- L», ИнтерЛабСервис, Москва. Полимеразная цепная реакция с гибридизационно-флуоресцентной детекцией проводилась коммерческим набором реагентов «АмплиСенс ОРВИ-скрин-FL», ИнтерЛабСервис, Москва.

Основные результаты

За период 2013-2016 гг. проведена ПЦР на выявление генетического материала различных респираторных патогенов, включая грипп, в 10488 образцах. Выявлено 6207 образцов, положительных на адено-, бока-, метапневмо, РС-, рино-, коронавирусы и вирусы парагриппа, из них 1745 случаев были положительны на РСВ человека, что составляет около 28% от общего числа ОРВИ. Отмечено также присутствие нескольких патогенов в 575 образцах (9,3 % случаев). Из них 288 (4,6%) – сочетание РС с другими инфекциями, такими как грипп, аденовирусная, риновирусная и другие, при этом наиболее часто встречалось сочетание РС и риновирусной инфекции. Пик заболеваемости РСВ в 2013-2014 г и 2014-2015 г приходился на март, а в 2015-2016 г на январь. Наибольшее количество позитивных на РСВ образцов было получено в сезон 2015-2016 г. – 827 смывов (33% от общего числа ОРВИ в данном эпидемическом сезоне).

Для оценки распределения по возрастам были выделены следующие группы больных: от рождения и до полугода, от полугода до 5 лет, от 6 до 65 лет, и старше 66 лет. В результате: за весь период наблюдений 55 % положительных на РСВ образцов принадлежали ко второй группе (6 месяцев – 5 лет), 32 % - к первой группе (0 – 6 месяцев), 10% - к третьей группе (6 – 65 лет) и менее 1 % - к последней группе (66 лет и старше) (Табл.1).

Табл.1. Распределение по возрастным группам образцов, положительных на РСВ человека

Возрастные группы	Сезоны			
	2013-2014	2014-2015	2015-2016	2013-2016
0 – 0,5 лет	149	218	186	553
0,5 – 5 лет	140	351	464	955
6 – 65 лет	15	30	132	177
> 66 лет	5	4	6	15

Заключение

Для выяснения картины заболеваемости РСВ-инфекцией среди пациентов с респираторными инфекциями был проведен анализ данных ПЦР-диагностики по городу Санкт-Петербург за три эпидемических сезона: с 2013 по 2016 год. Показана явная возрастная зависимость лабораторно подтвержденной заболеваемости РСВ: наибольшее количество образцов, положительных на РСВ было получено от детей до пяти лет. В дальнейшем будет проводиться работа по молекулярно-генетической характеристике выделенных из первичного материала изолятов вируса, а также определение антигенной принадлежности РСВ, циркулировавших в Санкт-Петербурге в указанный период времени.

Поскольку РС-инфекция у маленьких детей и пожилых может протекать без температуры, расширение стандартного определения случая для отбора образцов от больных на выявление РСВ может привести к изменению уровня заболеваемости в целом и ее распределения по возрастам.

Список используемой литературы

1. Storey S. Respiratory syncytial virus market// Nat Rev Drug Discov. 2010 Jan;9(1):15-6.

2. Welliver RC. Review of epidemiology and clinical risk factors for severe respiratory syncytial virus (RSV) infection//J Pediatr. 2003 Nov;143(5 Suppl):S112-7.

3. Hyvärinen M.K., Kotaniemi-Syrjänen A., Reijonen T.M. et al. Lung function and bronchial hyper-responsiveness 11 years after hospitalization for bronchiolitis // Acta Paediatr.- 2007.- V.96(10).-P.1464-69.

4. Meeting report of WHO Informal Consultation on Surveillance of RSV on the Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS) Platform, 25-27 March 2015, Geneva, Switzerland

СЕРОТИПОВОЙ СОСТАВ И ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ НАЗОФАРИНГЕАЛЬНЫХ ИЗОЛЯТОВ *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE,* ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ДЕТЕЙ ДОШКОЛЬНОГО ВОЗРАСТА Г. КАЗАНИ

Баязитова Л.Т., Тюпкина О.Ф., Тюрин Ю.А., Чазова Т.А., Зарипова А.З., Исаева Г.Ш.

ФБУН «Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии», Казань, Россия

Введение. Распространенность респираторных инфекций пневмококковой этиологии у детей, возможность развития инвазивных жизнеугрожающих заболеваний, рост антибиотикорезистентности обосновывают необходимость изучения микробиологических аспектов пневмококкового носительства.

Цель исследования. Изучение распространенности серотипов и антибиотикорезистентности *S.pneumoniae* у часто болеющих детей детей дошкольного возраста.

Материалы и методы. Исследовано 511 штаммов *S.pneumonia*e, выделенных от часто болеющих детей с респираторными заболеваниями в возрасте от 6 месяцев до 7 лет в период с 2009 года по 2016 год.

Материал высевали на Columbia agar Base («Conda», Испания) с добавлением 5 % крови. Посевы инкубировали в CO2-инкубаторе 24 часа. Фенотипическую идентификацию *S.pneumoniae* проводили на основании морфологических, культуральных данных. Для серологической диагностики применяли латекс-агглютинацию «Slidex Pneumo-Kit», («bioMerieux», Франция); постановку реакции Нейфельда с пневмококковой антисывороткой OMNI (SSI Omni serum, Statens Serum Institut). Антибиотикочувствительность изучали при помощи диско-диффузионного метода;. для оценки чувствительности к β-лактамным антибиотикам использовали Е-тесты (HiComb MIC Test, «Himedia»). Молекулярное серотипирование штаммов *S. pneumonia*e методом мультиплексной ПЦР (МПЦР) изучалось с использованием праймеров наиболее значимых в эпидемиологическом аспекте серотипов 1, 3, 4, 5, 6A / B, 7F, 7C, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B / C, 16F, 17F, Sg18, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38 (ООО «Синтол», Россия).

Результаты. Анализ микробиоценоза носоглотки часто болеющих детей показал, что *S.pneumoniae* высевается в 32,9% случаев, причем у 58,4% детей - в виде монокультуры; степень колонизации (10^4-10^6 КОЕ/мл). У 41,6 % детей пневмококки контаминировали носоглотку в составе бактериальных ассоциаций с другими респираторными патогенами (*St.aureus, Moraxella spp, Haemophylus spp).* Анализ серотипового состава клинических изолятов *S.pneumoniae* (n=116) показал преобладание «вакцинных» серотипов 3, 6A (4,3%), 6B (3,4%), 19A, 19F (3,4%) 14, и 19A,23F и одного «невакцинного» штамма 33F (3,4%). 13-валентная пневмококковая конъюгированная вакцина, которая в настоящее время используется для вакцинации детей в соответствии с национальным календарем профилактических прививок, включает серотипы: 1, 3,4,5,6A, 6B,7F,9V,14,18C,19F,23F,19A и покрывает практически все выделенные нами серотипы пневмококка.

Пенициллинчувствительными оказались 88,2% -83,9% изолятов в зависимости от периода исследования. В период с 2009 по 2016 год доля чувствительных к амоксициллину штаммов уменьшилась с 96,1% в 2009 году до 85,1% в 2016 г., отмечается статистически достоверное увеличение доли нечувствительных к амоксициллину штаммов, начиная с 2015 г. Показан рост количества резистентных к макролидам изолятов: в 2009-2011 годы выявлено 90,7% азитромицинчувствительных и 93,4% кларитромицин чувствительных пневмококков. в 2016 г. – 78,6% и 85,1% штаммов соответственно, выявлен статистически значимый рост резистентности к кларитромицину в 2015 и 2016 гг. Отмечается рост уровня резистентности к ципрофлоксацину: в 2009 - 2011 годы выявлено 78,9% ципрофлоксацин- чувствительных штаммов; в 2016 г-72,6% отмечена достаточно высокая антипневмококковая активность линкозамидов (клиндамицин): выявлено 94,7 % - 91,8% чувствительных штаммов в зависимости от периода исследования. Но начиная с 2015 года отмечается статистически значимый рост количества устойчивых штаммов (относительно периода 2009-2011гг). В носоглотке часто болеющих детей обнаружены штаммы *S. pneumoniae,*

характеризующиеся множественной устойчивостью к антимикробным препаратам (к 3 и более АМП)-3,8% - 9,9% в зависимости от года исследования.

Заключение

Результаты локального мониторинга уровня антибиотикорезистентности «назофарингеальных» штаммов пневмококков, выделенных от часто болеющих респираторными заболеваниями детей, свидетельствуют о росте уровня резистентности в исследуемый период с 2009 по 2016 годы.

Показана высокая активность β-лактамных антибиотиков и клиндамицина; меньшей антипневмококковой активностью обладают азитромицин, кларитромицин и ципрофлоксацин.

Обнаружены штаммы *S. pneumoniae*, характеризующиеся множественной устойчивостью к антимикробным препаратам (к 3 и более АМП): 3,8% - 9,9% у часто болеющих детей.

Данные серотипирования показали, что носоглотку часто и длительно болеющих детей в г. Казани колонизируют серотипы пневмококков, которые в большинстве случаев покрываются 13 валентной конъюгированной вакциной, используемой в настоящее время у детей в соответствии с национальным календарем профилактических прививок.

Выявление «невакцинных» серотипов, штаммов с множественной лекарственной устойчивостью, рост химиорезистентности указывает на необходимость продолжения мониторинговых исследований с целью разработки мероприятий по профилактике рисков возникновения групповых пневмококковых инфекций в детских коллективах.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ БАКТЕРИЙ *P. AERUGINOSA*, ВЫЗЫВАЮЩИХ ХРОНИЧЕСКУЮ ИНФЕКЦИЮ ЛЕГКИХ У БОЛЬНЫХ МУКОВИСЦИДОЗОМ

Шагинян И.А.[1], Аветисян Л.Р.[1], Чернуха М.Ю.[1], Сиянова Е.А.[1], Припутневич Т.В.[2], Трофимов Д.Ю.[2], Гордеев А.В.[2], Кондратьева Е.И.[3], Красовский С.А.[4], Гинцбург А.Л.[1]

[1] *ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия*

[2] *ФГБУ «НЦАГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия*

[3] *ФГБУ «МГНЦ» ФАНО России, Москва, Россия*

[4] *ФГБУ «НИИ пульмонологии» ФМБА России, Москва, Россия*

Введение. Муковисцидоз (МВ) — генетическое заболевание, прогноз которого зависит от инфекционных осложнений в легких, вызванных условно-патогенными микроорганизмами. *P. aeruginosa* является одним из основных микроорганизмов, вызывающих хроническую инфекцию легких у больных МВ. Около 30% больных МВ хронически инфицированы *P. aeruginosa*. Ранее было установлено, что у 42% больных МВ изоляты *P. aeruginosa,* вызывающие хроническую инфекцию, характеризовались фенотипической гетерогенностью. В популяции клеток, выделенных из одного образца мокроты, обнаруживали до 5 различных по фенотипу клеток *P. aeruginosa*. Данная гетерогенность ограничивает эффективность антибиотикотерапии и позволяет клеткам бактерий длительно персистировать в легких больных МВ.

Цель. Изучить молекулярные основы фенотипической гетерогенности *P. aeruginosa,* вызывающих хроническую инфекцию легких у больных МВ.

Материалы и методы. Полногеномное секвенирование двух изолятов 70L и 203-2 *P. aeruginosa,* выделенных от одного больного МВ, проводили на платформе Ion PGM Torrent с наборами Ion Sequencing Kit и чипами 316v1 (Life Technologies Thermo Fisher, США) по протоколу производителя. Первичная аннотоция была проведена с помощью программ RAST. Выравнивание последовательностей проводили с помощью программы Mauve и Blast, поиск генов антибиотикорезистентности проводили с помощью ResFinder. Исследование фенотипических свойств изолятов проводили общепринятыми методами. Антибиотикочувствительность определяли диско-диффузионным методом.

Результаты. При секвенировании изолятов *P. aeruginosa* было установлено, что оба штамма относились к сиквенс-типу ST1050 и серогруппе 06, то есть имели клональное происхождение. Анализ результатов выравниваний нуклеотидных последовательностей 10 наиболее длинных контигов геномов одного штамма на нуклеотидные последовательности другого штамма показал практически полное отсутствие однонуклеотидных замен, что подтверждает, что это, несомненно, штаммы одного клона.

Основными фенотипическими свойствами, имеющими клиническое значение, являются антибиотикорезистентность бактерий, способность к продукции алгината и образованию биопленки. При исследовании антибиотикорезистентности было выявлено, что штаммы отличаются по спектру чувствительности к антибиотикам. Оба штамма были мультирезистентными, но второй штамм был резистентен к большему количеству антибиотиков. Секвенирование показало, что ферментативное ингибирование преобладает среди механизмов резистентности к антибиотикам у обоих штаммов, но в отличие от штамма 70L у штамма 203-2 имеются два дополнительных гена *blaTem,* кодирующие резистентность к цефалоспоринам, *u aph(3')-IIb* - резистентность к аминогликозидам. При выравнивании нуклеотидной последовательности двух контигов, на которых находятся гены *blaTem u aph(3')-IIb* с геномом 70L не было выявлено совпадений. Это свидетельствует о том, что гены *aac(3)-IIa* и *blaTEM* были приобретены. Выравнивание с помощью Blast с коллекцией нуклеотидных последовательностей базы NCBI, показало, что целиком контиги идентичны с участком, входящим в плазмиду pKp848CTX, выделенную от *K. pneumoniae*. Эти данные свидетельствуют о том, что гены *aac(3)-IIa* и

blaTEM были приобретены в результате горизонтального переноса генов, скорее всего с помощью плазмиды. Изучение генов, участвующих в других механизмах резистентности, показало, что у штамма 203-2 резистентность к аминогликозидам обусловлена также гиперфункцией эффлюкса *MexXY-OprM,* причиной которой являются мутации в гене *mexZ* (отрицательный регулятор MexXY насоса, субстратами которого являются фторхинолоны, цефепим, аминогликозиды, тетрациклин, хлорамфеникол). Кроме того у второго штамма резистентность к бета-лактамам обуславливается также редуцированной проницаемостью наружной мембраны OprD, причиной которооой являются мутации в гене *oprD*, приводящие к потере активности белка.

Другим фактором вирулентности *P. aeruginosa* является продукция экзополисахарида (альгината), который защищает бактерию от фагоцитоза, облегчает прикрепление бактерий к клеткам хозяина и принимает участие в формировании биопленок и персистенции бактерий. Оба штамма обладают способностью к продукции альгината, но у первого штамма эта способность более выражена. Секвенирование показало, у штамма 70L и 203-2 имеются мутации в генах, регулирующих продукцию альгината. У штамма 70L мутации имеются в генах *mucA* и *lasR* (LasR транскрипционный активатор системы кворум-сенсинга, который определяет синтез аутоиндуктора), которые подавляют транскрипционную активность альтернативного сигма-фактора algU, являющегося позитивным регулятором продукции альгината. У второго штамм активация сигма-фактора algU обусловлена наличием мутации в гене *mucB,* который также является отрицательным регулятором AlgU. Это приводит к появлению мукоидного фенотипа, обусловленного гиперпродукцией альгината. Более выраженная способность второго штамма к образованию биопленки по сравнению с первым также может быть связана с генами, регулирующими данный процесс, так как дефекты в генах, непосредственно участвующих в биопленкообразовании, ни у первого ни у второго штамма не были выявлены. Кроме того у второго штамма имеются два дополнительных гена, *fapB и fapA,* кодирующие FapB и FapA протеины амилоида, способствующие повышенной адгезии и участвующие в образовании биопленки. Эти два гена, предположительно, были приобретены в результате ГПГ вместе с фагом, так как они находятся в участке профага, который отсутствует у штамма 70L. Одной из причин фенотипической гетерогенности является также гипермутабельность бактерий, длительно персистирующих в организме. У таких бактерий частота мутаций превышает частоту мутаций обычной клетки в 100-1000 раз. Штамм 70L в отличие от 203-2 является гипермутабельным, что, согласно данным секвенирования, определяется мутацией в гене *mutS,* кодирующем MutS, который наряду с MutL, является критическим компонентом системы MMR (DNA mismatch repair systems), узнающей и восстанавливающей все ошибочные инсерции, делеции, возникающие при репликациях и рекомбинациях ДНК. Мутации в данной системе приводят к появлению гипермутабельного фенотипа. Кроме того, штамм 70L в отличие от 203-2 является *lasR*-мутантом, то есть имеет дефект в транскрипционном активаторе LasR системы кворум-сенсинга, которая контролируют от 6 до 12% всех хромосомных генов *P. aeruginosa,* в том числе и фенотипических признаков.

Заключение. Установлено, что фенотипическая гетерогенность может быть обусловлена не только одновременно циркулирующими разными генотипами, но и присутствием различных субпопуляций одного генотипа, сформировавшихся в результате микроэволюции благодаря «крупным» (приобретение фагов, плазмид, интегронов) и «мелким» геномным изменениям – мутациям в генах, кодирующих признак, или в регуляторных генах. При этом в различные периоды инфекции могут преобладать различные субпопуляции с разным «набором» мобильных генетических элементов, мутаций и, соответственно, адаптационными возможностями. Выживает субпопуляция, которая в данном случае наиболее приспособлена.

КОМПЛЕКСНАЯ ДИАГНОСТИКА ВНЕБОЛЬНИЧНЫХ ПНЕВМОНИЙ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ В ХАБАРОВСКОМ КРАЕ В 2016 Г.

Савосина Л.В., Резник В.И., Лебедева Л.А., Жалейко З.П.

ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Хабаровском крае», Хабаровск, Россия

Введение. Внебольничные пневмонии являются одним из наиболее распространенных тяжелых заболеваний респираторного тракта. Этиологическая диагностика и лечение пневмоний в настоящее время представляют определенные трудности. К пневмониям достаточно часто подходят не как к инфекционным заболеваниям, вызываемым широким спектром возбудителей, а как к синдромному заболеванию без этиологической расшифровки, хотя именно такой диагноз определяет прогноз течения болезни, рациональную антибактериальную терапию и соответствует этиологическому принципу классификации пневмоний по МКБ-10.

Задачи исследования. Провести сравнительный анализ заболеваемости внебольничными пневмониями, показать этиологическую структуру пневмоний в течение 2016г., проследить за особенностями циркуляции возбудителей.

Материалы и методы. Для исследования использовались мазки из носа, зева, глотки, отобранные у больных в лечебных учреждениях в остром периоде заболевания. Выявление ДНК/РНК возбудителей проводили с использованием наборов «АмплиСенс Influenza virus A/B-FL», «АмплиСенс ОРВИ-скрин FL», «АмплиСенс Mycoplasma pneumoniae/Chlamydophila pneumoniae». Все тест-системы производства ООО «ИнтерЛабСервис», ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора. Определяли специфические последовательности следующих возбудителей: вирусов гриппа A/H1N1/pdm09, A/H3N2/, B, парагриппа I-IV серотипов (Piv 1-4), РС-вируса (RSv), аденовируса (Adv), риновируса (Rv), метапневмовируса (Mpv), коронавируса

(Cov), бокавируса (Bov); внутриклеточных паразитов – Mycoplasma pneumoniae, Chlamydophila pneumoniae.

Результаты и обсуждение. В 2016 году при обследовании 593 больных с диагнозом «внебольничная пневмония» у 50,4% из них был выявлен тот или иной возбудитель либо их ассоциации. В первые 4 месяца 2016 г. было обследовано комплексно на все возбудители 253 человека, из них положительные находки были у 47,8%. Из вирусных агентов наиболее часто определялись *вирусы гриппа A/H1N1/pdm09* (20,2%), которые активно циркулировали в это время, остальные встречались реже: *РС-вирусы* в 8,7%, *риновирусы* в 6,3%, *аденовирусы* в 4,3% случаев. *Вирусы гриппа* типа *A/H3N2/* выявлялись у 3,6% больных. Прочие вирусные возбудители суммарно составили 5,5%. *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydophila pneumoniae* были определены в единичных случаях (в 2,0% и 1,2% соответственно).

В IV квартале 2016 г. комплексно было обследовано 340 человек, больных пневмониями, из них с положительными находками было 52,4%. В октябре 2016 г. в Хабаровском крае был зарегистрирован подъем заболеваемости пневмониями в детских коллективах, преимущественно в школах. При лабораторной диагностике у большинства обследованных из очагов был выявлен возбудитель – *Mycoplasma pneumoniae*, который был определен у 44,3% больных в октябре и 31,3% в ноябре. В декабре вспышка пошла на убыль и выявление *Mycoplasma pneumoniae* составило всего 6,4%. Из вирусных патогенов в октябре-декабре 2016 г. наиболее часто встречались *РС-вирусы* (у 14,4%) и *риновирусы* (у 13,5%), остальные определялись значительно реже, с частотой, которая составила от 1,9% (для *вирусов парагриппа*) до 2,9% (для *аденовирусов*). В IV квартале 2016 г. началась сезонная циркуляция вирусов *гриппа* типа *A/H3N2/*, частота выявления которых у больных пневмониями составила от 1,7% в ноябре до 6,4% в декабре.

При анализе частоты выявления тех или иных вирусных возбудителей в зависимости от сезона отмечено, что для всех характерна различная динамика. Наиболее изменчивы в этом отношении оказались *РС-вирусы*, процент выявления которых в марте-апреле составил 1,3%. На протяжении всего IV квартала *РС-вирусы* выявлялись примерно с одинаковой частотой, и она составила от 12,9% в октябре до 15,9% в декабре. Выявление *риновирусов* каждый год закономерно больше во внеэпидемическом (по гриппу) периоде. В 2016 году в январе *риновирусы* были выявлены в 13,8% случаев, затем в феврале-марте, в период активной циркуляции *вирусов гриппа*, *риновирусы* обнаруживались только в 3,9% и 5,3% случаев. В октябре частота их выявления была максимальной – 20,0%, затем постепенно снижаясь, в декабре составила уже 7,4%, что совпало с началом нового эпидемического сезона заболеваемости гриппом. В отношении других вирусных возбудителей – их количественные колебания были не столь значительными. Стоит только отметить, что в IV квартале, по сравнению с началом года, несколько вырос процент выявления *вирусов парагриппа* – 2,1% против 0,4% и *бокавирусов* – 2,4% против 0,9%.

При анализе возрастной заболеваемости, очевидно, что *вирусы гриппа* и *риновирусы* встречались во всех группах, причем частота выявления *риновирусов* была выше у детей до 14 лет (в среднем 14,3%), с преобладанием до 17,2% в группе 3-6-летних. У взрослых же частота выявления риновирусной инфекции не превысила 3,1% за весь анализируемый период. *Вирусы гриппа A/H3N2/* тоже встречались у пациентов всех возрастных категорий, в среднем с частотой 2,7%, так же с преобладанием у детей 3-6 лет (5,2%). *Вирусы гриппа A/H1N1/pdm09*, напротив, чаще регистрировались у пациентов в возрастной группе старше 15 лет и составили 18,8% против 2,6% в возрастных категориях 3-6 и 7-14 лет. У детей в возрасте до 2 лет они и вовсе не были выявлены. Наиболее частой вирусной инфекцией, диагностируемой у больных пневмониями, помимо гриппозной, была и остается РС-вирусная инфекция (у 11,1% от всех обследуемых больных). Наиболее уязвимы для тяжелого течения данной инфекции, в том числе с развитием пневмонии, оказываются дети раннего возраста. *РС-вирусы* были выявлены почти у каждого третьего ребенка в младшей возрастной группе, у каждого шестого в группе от 3 до 6 лет и у каждого 20-го в группе детей 7-14 лет. У больных пневмониями более старшего возраста они не выявлялись. Похожая закономерность выявлена и в отношении других вирусных возбудителей – *вирусов парагриппа, адено-* и *бокавирусов*, которые хоть и в небольшом проценте, но наиболее часто встречались в самой младшей возрастной группе, и частота их выявления постепенно снижалась, по мере увеличения возраста обследуемых, практически до нуля. Так, *бокавирусы* диагностированы у детей до 2 лет в 5,8% , а в двух последующих возрастных категориях в 0,9% случаев; у более взрослых пациентов они уже не определялись. Представляет интерес анализ возрастной структуры заболевших микоплазменной пневмонией в IV квартале 2016 г. Наиболее подвержены заболеванию оказались школьники в возрасте 7-14 лет и 15-18 лет – 57,1% и 44,0% соответственно от всех обследованных в этих категориях. У детей 3-6 лет *Mycoplasma pneumoniae* была выявлена в 15,6%, а у детей до 2 лет – в 6,1% случаев, т.е. очевидно, что в наибольшей степени оказались вовлечены дети, организованные в коллективы. При этом у лиц старше 18 лет в этот же период времени микоплазменной пневмонии при лабораторном обследовании выявлено не было. Для сравнения, в I-II кварталах 2016 г. *Mycoplasma pneumoniae* была выявлена всего в 5 случаях из 253 обследованных.

По результатам комплексной диагностики с января по апрель в этиологической структуре пневмоний лидировали вирусные патогены, и они составили 93,3% среди всех положительных результатов. Но уже в IV квартале 2016 г. этот показатель составил 48,9%. При этом значительно возрос удельный вес случаев, при которых была определена *Mycoplasma pneumoniae (*39,3%)в качестве моноинфекции, а также ее сочетание с вирусными возбудителями (11,8% случаев).

Заключение. Полученные данные свидетельствуют, что пневмония является полиэтиологическим заболеванием, которое может иметь вирусную, бактериальную или смешанную этиологию. При этиологической расшифровке внебольничных пневмоний необходим комплексный подход – исследование клинического материала на

вирусы и бактерии. При этом наличие некоторых возбудителей, например, *риновирусов*, в верхних дыхательных путях само по себе еще не может являться доказательством их участия в протекающем патологическом процессе (пневмонии). Но вместе с тем нельзя пренебрегать и данными исследований, которые свидетельствуют о том, что *риновирусы* играют определенную роль в этиологии пневмоний. В то же время другие возбудители, такие как *микоплазма*, некоторые вирусы, такие как вирусы *гриппа*, *РС-вирусы*, *бокавирусы*, *метапневмовирусы*, особенно если поражают наиболее восприимчивый к ним детский контингент, практически всегда провоцируют выраженный клинически патологический процесс, исходом которого в большинстве случаев является воспаление верхних и нижних дыхательных путей – бронхит и, конечно, пневмония.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНОМА ХОЛОДОАДАПТИРОВАННОГО ШТАММА B/ЛЕНИНГРАД/14/17/55 – РЕЗЕРВНОГО ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ

Крутикова Е.В., Федорова Е.А., Дубровина И.А., Большунова Е.А., Киреева Е.В., Киселева И.В., Руденко Л.Г.

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Введение. Маленькие дети являются наиболее восприимчивыми к гриппозной инфекции, поэтому для защиты этой группы населения в первую очередь необходима своевременная вакцинопрофилактика. Использование в качестве донора аттенуации для подготовки живой гриппозной вакцины вируса B/Ленинград/14/17/55 может позволить решить эту проблему, поскольку ранее было показано, что этот донор является наиболее аттенуированным, по сравнению с используемым в настоящее время донором B/СССР/60/69. На сегодняшний день в России разрешена вакцинация от гриппа для детей от 3-х лет, в случае же снижения допустимого возраста для вакцинации против гриппа, донор B/Ленинград/14/17/55 может быть использован для производства живой гриппозной аттенуированной вакцины для самых маленьких детей.

Цель и задачи. Целью данной работы было определение последовательности генома резервного донора аттенуации живой гриппозной вакцины B/Ленинград/14/17/55. Были поставлены следующие задачи:

- Определение последовательности генов штамма B/Ленинград/14/17/55 методом секвенирования.

- Клонирование смешанной популяции B/Ленинград/14/17/55 и определение генетической последовательности клонов для установления состава популяции в гетерогенных позициях.

- Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей сегментов с последовательностями вирусов гриппа B разных лет выделения для выявления уникальных замен в геноме вируса B/Ленинград/14/17/55.

Материалы и методы. Вирус B/Ленинград/14/17/55 был получен из музея отдела вирусологии ФГБНУ «ИЭМ». Накопление вирусного материала производилось в 11-дневных развивающихся куриных эмбрионах. Выделение РНК производилось из хориоаллантоисной жидкости куриных эмбрионов. На основе вирусной РНК получали кДНК с пулом случайных гексамерных праймеров. Полученная кДНК использовалась для постановки ПЦР со специфическими праймерами, разработанными для секвенирования последовательности вирусов гриппа B 1950-60х годов выделения, после чего ПЦР-продукт выделяли из геля и секвенировали на капиллярном секвенаторе Applied Biosystems 3130x Genetic Analyzer (США) в соответствии с протоколом производителя. Использовались наборы реагентов Ампли-сенс Рибо-Сорб (Россия), RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (США), DreamTaq Green PCR Master Mix (2x) (США), BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (США). Для анализа использовали программные пакеты DNA Star Lasergene 7.1.0, Unipro UGENE 1.18.0.

Результаты. Была полностью определена последовательность генома резервного донора аттенуации B/Ленинград/14/17/55. Для множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей донора B/Ленинград/14/17/55 и эпидемических вирусов гриппа B разных лет выделения использовали последовательности, представленные в базе данных Influenza Research Database (fludb.org). В анализ включали все последовательности вирусов гриппа B, выделенных до 1990 года, а также полные последовательности сегментов генома вирусов более поздних лет выделения. Всего было проанализировано не менее 1350 нуклеотидных последовательностей для каждого сегмента генома.

Последовательность генетических сегментов вируса B/Ленинград/14/17/55 значительно отличается от последовательности используемого на настоящий момент для подготовки ЖГВ холодоадаптированного донора аттенуации B/СССР/60/69, а также донора аттенуации живой гриппозной вакцины FluMist B/Ann Arbour/1/66 (табл. 1). По последовательности двух генов полимеразного комплекса (PB1, PA) донор аттенуации B/Ленинград/14/17/55 ближе к вирусам группы B/Lee/40. Как и все вирусы, выделенные более 50 лет назад, B/Ленинград/14/17/55 значительно отличается от вирусов, циркулирующих на настоящий момент (табл. 1).

Для определения состава популяции в гетерогенных позициях было проведено клонирование популяции B/Ленинград/14/17/55 и секвенирование последовательности генома полученных клонов. Была обнаружена гетерогенность в сегментах PB2, NP, M и NS. Анализ последовательности B/Ленинград/14/17/55 выявил ряд уникальных кодирующих замен, не встречающихся у других вирусов гриппа B. Было установлено, что штамм B/Ленинград/14/17/55 приобрел за время пассажей при пониженной температуре нуклеотидные замены во всех внутренних генах, из которых 17 привели к уникальным кодирующим заменам в сегментах 1-3 и 5. Также были об-

Таблица 1. Количество нуклеотидных отличий в последовательностях сегментов генома резервного донора аттенуации B/Ленинград/14/17/55 и штаммов B/СССР/60/69, B/Ann Arbour/1/66-*ca*, B/Lee/40, B/Indiana/25/2015 и B/Phuket/3073/2013

Ген	B/СССР/ 60/69	B/Ann Arbour/ 1/66	B/Lee/40	B/Indiana/ 25/2015[1]	B/Phuket/ 3073/2013[2]
PB2	49	75	109	162	147
PB1	119	118	64	189	191
PA	57	79	91	169	169
NP	51	56	81	118	111
M	28	38	61	78	86
NS	26	32	43	64	60
HA	26	н/о[3]	86	148	143
NA	53	н/о	92	116	121

[1,2] – вирусы, рекомендованные ВОЗ для включения в состав противогриппозных вакцин в 2016-2017 гг., выбраны в качестве референс-представителей линий Виктория (B/Indiana/25/2015) и Ямагата (B/Phuket/ 3073/2013)

[3] - не определено, в связи с отсутствием данных о последовательности генов HA и NA вируса B/Ann Arbour/1/66 в базах данных.

наружены позиции в генах PB2, PB1, PA и NP, не характерные для вирусов 1950-х годов выделения, встречающиеся в единичных изолятах более поздних лет выделения.

Заключение. Была определена последовательность всех сегментов генома вируса B/Ленинград/14/17/55 – резервного донора аттенуации живой гриппозной вакцины. Было показано, что данный донор аттенуации значительно отличается от доноров аттенуации, используемых в коммерческих вакцинах на настоящий момент. Геном B/Ленинград/14/17/55 содержит увеличенное количество уникальных замен, в том числе в генах нуклеопротеинового комплекса, что делает его перспективным кандидатом для подготовки живой гриппозной вакцины, отвечающей повышенным требованиям безопасности.

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОТОКОЛА ПИРОСЕКВЕНИРОВАНИЯ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОИСХОЖДЕНИЯ ГЕНОВ РЕАССОРТАНТОВ НА ОСНОВЕ РЕЗЕРВНОГО ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ B/ЛЕНИНГРАД/14/17/55

Федорова Е.А., Крутикова Е.В., Киселева И.В., Руденко Л.Г.

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Введение. Живая гриппозная вакцина (ЖГВ) – эффективный способ профилактики гриппа. Для подготовки вакцинного штамма используется метод обмена сегментами генома вирусов гриппа в развивающихся куриных эмбрионах (реассортация). Полученные в результате реассортации вирусы анализируют молекулярно-генетическими методами для определения происхождения сегментов генома – это важнейший этап, обеспечивающий получение эффективного и безопасного вакцинного штамма. В связи с большим количеством реассортантов для анализа генома необходим рутинный метод, позволяющий максимально быстро и точно определять принадлежность генов, при этом сохраняя чувствительность и специфичность. Пиросеквенирование с использованием системы генетического анализа PyroMark Q24 на настоящий момент является оптимальным методом для анализа генома реассортантов при подготовке вакцинного штамма – на первых этапах возможна количественная оценка компонентов смеси, на финальной стадии чувствительность протокола позволяет исключить наличие примесей в образце. Для обеспечения максимальной чувствительности метода протокол анализа должен полностью соответствовать анализируемой паре вирусов – при изменении хотя бы одного нуклеотида на секвенируемом участке необходима коррекция программы для пиросеквенатора и протокола учета результатов. Несоответствие последовательности праймеров генетической последовательности одного вируса из пары делает количественную оценку некорректной. Штамм вируса гриппа B/Ленинград/14/17/55 (B/14) на настоящий момент рассматривается как перспективный резервный донор аттенуации для подготовки ЖГВ для детей младшего возраста, поскольку обладает более аттенуированным фенотипом, чем используемый на настоящий момент штамм B/СССР/60/69 (B/60). Для подготовки вакцинных реассортантов на основе нового

донора аттенуации необходим отработанный протокол генетического анализа.

Цель и задачи. В связи с вышесказанным, целью данной работы была оптимизация протокола, разработанного нами ранее для анализа происхождения генов, кодирующих внутренние белки вирусов гриппа В, для эффективной работы с резервным донором аттенуации ЖГВ В/14.

В рамках данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Анализ последовательности генов резервного донора аттенуации В/14, полученной методом секвенирования по Сэнгеру, для определения возможности применения ранее разработанной тест-системы для генотипирования реассортантов, полученных на основе данного донора аттенуации и циркулирующих эпидемических вирусов гриппа В.

2. Разработка новых комплектов праймеров и программ для пиросеквенатора для анализа происхождения тех генов, для которых разработанная ранее тест-система непригодна.

3. Постановка реакций пиросеквенирования с донором аттенуации В/14, современными вирусами гриппа В, а также их смесями, для проверки корректности работы тест-системы.

4. Анализ происхождения генов реассортантов, полученных при подготовке вакцинного штамма на основе В/14 и современного эпидемического вируса.

5. Сравнение результатов анализа происхождения генов реассортантов методом пиросеквенирования с использованием новых праймеров и методом секвенирования по Сэнгеру.

Материалы и методы. *Вирусы.* В работе были использованы: холодоадаптированный донор аттенуации В/14, вирусы гриппа B/Indiana/25/2015, B/Phuket/3073/2013, рекомендованные для включения в состав противогриппозных вакцин в 2016-2017 эпидемическом сезоне.

Методы. Получение пула вирусных частиц и определение инфекционного титра производили в 10-11-дневных развивающихся куриных эмбрионах. РНК выделяли из хориоаллантоисной жидкости с использованием комплекта реагентов АмплиСенс Рибо-Сорб. кДНК на матрице РНК получали с помощью RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit. Для постановки ПЦР использовали комплект праймеров, разработанных на основе современных эпидемических вирусов и зарегистрированного донора аттенуации отечественной ЖГВ В/60. Один из каждой пары праймеров этапа ПЦР нес биотиновую метку на 5'-конце. Температура отжига праймеров составляла 55ºС. Реакция пиросеквенирования выполнялась в соответствии с протоколом PyroMark Q24. Комплект праймеров и соответствующие им последовательности внесения нуклеотидов в реакционную смесь были адаптированы под цели настоящего исследования. Секвенирование по Сэнгеру производилось с использованием автоматического капиллярного анализатора 3130x Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

Результаты. Анализ последовательности генов PB2, PB1, PA, NP, M и NS вируса В/14 выявил значительные отличия от донора аттенуации В/60, для которого была создана разработанная нами ранее тест-система. Праймеры этапа ПЦР подбирались нами к участкам последовательности, высоко консервативным среди вирусов гриппа В, в связи с чем не потребовалась адаптация праймеров этапа ПЦР к новому донору аттенуации. В генах PB1, PB2, NP, M и NS вирус В/14 сохранил консервативные области, общие с вирусом В/60, к которым были подобраны праймеры этапа пиросеквенирования. Для определения происхождения гена PA был разработан новый праймер, позволяющий дифференцировать гены вируса В/14 и современных эпидемических вирусов. Потребовалась корректировка протокола на этапе учета результатов реакции для всех генов – высоковариабельные области, расположенные за праймером этапа секвенирования, у донора аттенуации В/14 отличаются от таковых как вируса В/60, как и циркулирующих вирусов. Для оценки чувствительности и специфичности разработанного протокола было произведено пиросеквенирование смесей вируса В/14 с вирусами B/Indiana/25/2015 и B/Phuket/3073/2013. Компоненты, приведенные к одинаковому показателю инфекционного титра вируса ($ЭИД_{50}$) смешивали в соотношениях 10:1, 1:1, 1:10. Детекция наличия примеси в образцах, содержащих смешанную вирусную РНК в количестве, не превышающем 10%, была успешной в 100% случаев. Ни в одном из образцов, содержащих вирус без примесей, не было детектировано флуоресценции в позициях, встройка нуклеотидов в которых для данного вируса не предполагалась дизайном анализа (100% специфичность). Были подготовлены вакцинные реассортанты на основе вирусов В/14 и B/Indiana/25/2015. Пиросеквенирование применялось для определения состава генома образцов вирусов, начиная со стадии 1-го клонирования (18 реассортантов, представляющих собой смешанную популяцию по крайней мере по одному из генов, из них в 81 случае сегменты генома принадлежали В/14, в 22 - B/Indiana/25/2015 и 41 образец представлял собой смесь сегментов указанных вирусов), до генотипирования реассортантов (18 реассортантов, из них у 16 хотя бы один из генов полимеразного комплекса унаследован от B/Indiana/25/2015). Для подтверждения состава генома реассортантов-кандидатов в вакцинные штаммы было произведено полное секвенирование генетических сегментов по Сэнгеру, происхождение генов реассортантов в 100% случаев соответствовало определенному методом пиросеквенирования. Показано соответствие последовательностей генетических сегментов и соответствующих генов донора аттенуации В/14 или вируса B/Indiana/25/2015.

Заключение. Оптимизация протокола определения состава генома реассортантов на основе резервного донора аттенуации В/Ленинград/14/17/55 и современных эпидемических вирусов методом пиросеквенирования позволила оперативно и с минимальными затратами адаптировать метод пиросеквенирования для новой задачи. Разработанная нами тест-система позволяет быстро и точно определять состав генома вакцинных реассортантов и детектировать наличие минимальных примесей генов эпидемических вирусов в образце.

ЭТИОЛОГИЯ ТЯЖЕЛОЙ ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИИ У ВЗРОСЛЫХ В РФ: ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ МНОГОЦЕНТРОВОГО ИССЛЕДОВАНИЯ SEPIA

Рачина С.А.[1], Захаренков И.А.[2], Дехнич Н.Н.[2], Бобылев А.А.[3], Иванчик Н.В.[2], Козлов Р.С.[2,3], Яцышина С.Б.[4], Елькина М.А.[4], Лебедева М.С.[5], Портнягина У.С.[6], Гордеева С.А.[7], Якунина М.А.[7]

[1]ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия
[2]ГБОУ ВПО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава России, Смоленск, Россия
[3]Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии, Смоленск, Россия
[4]ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия
[5]НУЗ «Дорожная клиническая больница на станции Новосибирск-Главный ОАО «РЖД», Новосибирск, Россия
[6]ГБУ Республики Саха (Якутия) «Республиканская больница № 2 - Центр экстренной медицинской помощи», Якутск, Россия
[7]ГОБУЗ «Мурманская областная клиническая больница имени П.А. Баяндина», Мурманск, Россия

Введение. Внебольничная пневмония (ВП) – одно из наиболее распространенных острых инфекционных заболеваний у взрослых. Наибольшую проблему с медицинской точки зрения представляет тяжелая ВП, так как, несмотря на небольшой удельный вес (<5% в общей популяции), летальность у данной категории больных может достигать 20-50%. Своевременное начало и адекватный режим антимикробной терапии (АМТ) являются независимыми факторами благоприятного прогноза при тяжелой ВП. Совершенствование методов этиологической диагностики расширяет возможности по ранней идентификации возбудителей ВП, в том числе выявлению трудно-и некультивируемых микроорганизмов, что, в свою очередь, способствует оптимизации этиотропной терапии и исходов лечения заболевания.

Цель. Изучить структуру возбудителей тяжелой ВП у взрослых в многопрофильных стационарах РФ с использованием различных методов этиологической диагностики.

Материалы и методы. В исследование проспективно включались взрослые пациенты с верифицированным с помощью стандартных методов диагнозом ВП тяжелого течения, не получавшие системной АМТ по поводу данного эпизода респираторной инфекции, без признаков выраженной иммуносупрессии. У всех пациентов в как можно более ранние сроки после установления диагноза ВП (≤ 12 ч с момента госпитализации) собирались: респираторный образец (мокрота или трахеальный аспират, по показаниям – бронхо-альвеолярный лаваж) для бактериоскопии, культурального исследования и исследования методом ПЦР (при непродуктивном кашле исследовался комбинированный назо-и орофарингеальный мазок только методом ПЦР); два образца венозной крови из разных периферических вен для бактериологического исследования и один образец венозной крови для исследования методом ПЦР; образец мочи для проведения быстрых тестов с целью выявления растворимых антигенов *Legionella pneumophila* 1 серогруппы и *S.pneumoniae*); в случае фатальной ВП проводилось дополнительно культуральное исследование аутопсийного материала (ткань легкого, кровь из полости сердца и крупных сосудов). Культивирование и идентификация аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов проводилась в соответствии со стандартными методами и процедурами. ПЦР-диагностика предусматривала выявление ДНК/РНК *M.pneumoniae*, *C.pneumoniae*, *L.pneumophila*, *C.psittaci*, респираторных вирусов (вирусы гриппа А, В, парагриппа, коронавирусы, респираторно-синцитиальный вирус (РС-вирус), риновирусы, аденовирус, метапневмовирус, бокавирус человека). Дополнительно выполнялось исследование респираторных образцов и крови методом количественной ПЦР с целью выявления ДНК типичных бактериальных возбудителей (*S.pneumoniae, S.aureus, H.influenzae*) с использованием диагностических наборов и методик ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора и сопоставления результатов данного исследования с культуральной диагностикой и быстрыми тестами.

Основные результаты. Всего в исследование включено 83 пациента с тяжелой ВП в возрасте ≥18 лет. Госпитальная летальность в исследуемой популяции составила 18%. Этиологически значимые возбудители ВП обнаружены у 50 больных (60%), из них у 30 пациентов (60%) выявлена монокультура, у 20 (40%) - ассоциация возбудителей. В структуре возбудителей преобладали *S.pneumoniae* и риновирусы - 32,4 и 14,9%, соответственно. Далее следовали *S.aureus* (9,5%), метапневмовирусы (6,8%), *K.pneumoniae* (6,8%), вирусы гриппа (6,8%), *P.aeruginosa* (4,1%), *A.baumannii* (4,1%), РС-вирус (2,7%), *E.coli* (2,7%), коронавирусы (2,7%), *L.pneumophila* (2,7%). Среди комбинаций превалировало сочетание бактериальных возбудителей и вирусов 12/20 (60%), из них чаще встречались ассоциации риновирусов с *S.pneumoniae* и/или энтеробактериями (6 случаев, соответственно). Среди ассоциаций бактериальных возбудителей, выявленных у 7/20 (35%) пациентов, наиболее частым являлось сочетание *S.pneumoniae*+*S. aureus* (3/7) и *P.aeruginosa*+*A.baumannii* (2/7). В случае моноинфекции наиболее частыми возбудителями были *S.pneumoniae* - 13/30 (43%), *S.aureus* - 5/30 (17%), метапневмовирус - 3/30 (10%) риновирус - 3/30 (10%). Бактериемия выявлена в 11% случаев, при этом наиболее часто (4/9) из крови выделялся *S.pneumoniae.* Пневмококковая этиология ВП была верифицирована только культуральным методом у 4/24 (17%), быстрым тестом на антигенурию у 10/24 (42%) пациентов; в 10/24 (42%) случаев были положительными как культура на *S.pneumoniae,* так и экспресс-тест. Выявленный при культуральном исследова-

нии *S.pneumoniae* обнаружен методом ПЦР (респираторный образец и/или кровь) у 12/14 (86%), *S.aureus* – у 4/6 пациентов. У больных с положительным экспресс-тестом на пневмококковую антигенурию в 19/20 случаев (95%) *S.pneumoniae* был обнаружен при ПЦР-исследовании. Среди 45 пациентов с отрицательными результатами бактериологического исследования и экспресс-тестов при ПЦР-исследовании дополнительно обнаружены ДНК *S.pneumoniae* в 17 случаях, *S.aureus* и *H.influenzae* в 8 случаях для каждого возбудителя, соответственно.

Выводы. В структуре возбудителей тяжелой ВП у взрослых пациентов, госпитализированных в многопрофильные стационары РФ, преобладал *S.pneumoniae.* Необходимо отметить высокую распространенность в исследуемой популяции респираторных вирусов, которые выявлялись как в ассоциации с бактериальными возбудителями, так и в качестве единственных патогенов. Использование ПЦР в комплексной диагностике тяжелой ВП позволяет существенно увеличить долю пациентов с установленным этиологическим диагнозом за счет идентификации респираторных вирусов. Заслуживает внимания дальнейшее изучение места и роли ПЦР-исследования в алгоритме диагностики ВП, вызванной типичными возбудителями (*S.pneumoniae, H.influenzae* и др.) у взрослых.

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ «ФЛУ-ГЕН» И «ОРВИ-ГЕН» ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ГРИППА И ОРВИ У ДЕТЕЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Шмелёва Н.П., Сивец Н.В., Грибкова Н.В., Лапо Т.П.

Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, Республика Беларусь

Введение. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), острые респираторные инфекции (ОРИ) занимают лидирующее положение в структуре инфекционных заболеваний и являются ежегодно причиной около 4 миллионов смертей в мире [1]. Наиболее распространенными возбудителями ОРИ являются вирусы гриппа А и В, парагриппа 1-4 типов (ПГ), респираторно-синцитиальный (РС), адено- (АД) и рино- (РВ), бока – (БоВ) и метапневмо- (МПВ) вирусы. Самой уязвимой категорией, в отношении риска возникновения заболевания, являются дети первых лет жизни. Частые, затяжные ОРИ могут способствовать формированию хронической бронхолегочной патологии. В связи с этим ранняя этиологическая расшифровка заболевания играет важную роль для назначения эффективной этиотропной терапии. Среди существующих методов диагностики ОРИ несомненное преимущество принадлежит методу полимеразной цепной реакции (ПЦР), а для некоторых респираторных вирусов это единственный метод индикации. В 2015 г. в Республике Беларусь зарегистрированы в установленном порядке диагностические наборы для дифференциальной диагностики гриппа и острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) методом ПЦР в режиме реального времени «Флу-ген» и «ОРВИ-ген». Поэтому определенный практический интерес представляло их использование для диагностики гриппа и ОРВИ на клиническом материале от пациентов с симптомами респираторного заболевания.

Целью настоящего исследования являлось определение этиологии ОРВИ у детей от 0 до 18 лет в рамках проведения дозорного надзора за гриппом и ОРВИ в Республике Беларусь на протяжении эпидемического сезона 2015-16 гг.

Задачи исследования: установление роли основных респираторных вирусов в формировании заболеваемости ОРВИ в эпидемическом сезоне 2015-16 гг. в целом и с учетом стадии эпидемического процесса по гриппу, а также определение спектра наиболее часто встречаемых респираторных вирусных агентов в различных возрастных группах детского населения Республики Беларусь.

Материалы и методы. В качестве материала для исследования использовали назофарингеальные мазки, полученные от детей с симптомами ОРВИ в рамках проведения дозорного надзора за гриппом и ОРВИ в период эпидемического сезона 2015-16 гг.

Выявление и дифференциацию нуклеиновых кислот респираторных вирусов в клинических образцах проводили методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени с использованием диагностических наборов «Флу-ген» и «ОРВИ-ген» (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Республика Беларусь). Детекцию продуктов амплификации проводили на приборе RotorGene 6000 (Corbet Research, Австралия) в соответствии с рекомендациями производителя. Для анализа полученных данных разбивку по возрастным группам проводили в соответствии с рекомендациями ВОЗ [2].

Результаты. За период эпидемического сезона 2015-2016 гг. было исследовано 336 клинических образцов от детей от 0 до 18 лет с диагнозами ОРИ, ларингит, ринофарингит, бронхит, пневмония. В результате проведенных исследований в 271 образце (80,7%) были выявлены искомые возбудители. В этиологической структуре возбудителей ОРВИ доминировали вирусы гриппа А и РВ (19,9% от общего количества положительных находок каждый). Вирусы гриппа В обнаружены в 46 образцах (16,9%), бокавирус – в 39 (14,3%). Вирусы парагриппа, адено-, метапневмо- и респираторно-синцитиальный вирусы были выявлены в 16 (5,9%), 14 (5,1%), 8 (2,9 %) и 18 (7,0 %) образцах соответственно. В 22 образцах (8,1%) обнаружено несколько возбудителей одновременно. В случаях смешанной инфекции в качестве этиологического агента чаще выявляли РВ и БоВ в сочетании друг с другом или с другими вирусами.

Изучение структуры возбудителей ОРВИ в зависимости от стадии эпидемического процесса по гриппу показало, что в предэпидемический период с 40 календарной недели (к.н.) 2015 г. по 2 к.н. 2016 г. основной вклад в формирование заболеваемости ОРВИ вносили бока-, рино- и респираторно-синцитиальный вирусы. Причем БоВ был выявлен в 34 образцах (31,5%), РВ и РС в 32 и 14

образцах соответственно (29,6% и 13%). В период эпидемии 2016 г. (3-10 к.н.) в структуре возбудителей ОРВИ доминировал вирус гриппа A(H1N1)pdm09, в этот период 73,4 % положительных образцов содержали данный возбудитель. Другие этиологические агенты ОРВИ выявлялись спорадически. В постэпидемический период (11-20 к.н. 2016 г.) заболеваемость ОРВИ была связана с активной циркуляцией вируса гриппа В и риновирусов, которые лидировали в этиологической структуре возбудителей ОРВИ (46,5 и 19,2% соответственно).

Удельный вес возбудителей ОРВИ в различных возрастных группах представлен в таблице.

Таблица. Структура возбудителей ОРВИ у детей 0-18 лет

Возрастная группа	Удельный вес возбудителя в этиологической структуре ОРВИ,%									Всего
	Грипп А	Грипп В	ПГ	АД	РС	РВ	БоВ	МПВ	Смеш. инф	
0-1	16,4	7,3	7,3	3,6	9,1	25,5	20,0	3,6	7,3	55
2-4	16,7	9,8	7,8	8,8	6,9	12,7	20,6	3,9	12,7	102
5-14	25,9	25,9	2,4	2,4	7,1	27,1	5,9	0	3,5	85
15-18	20,7	34,5	6,9	3,4	0	13,8	6,9	6,9	6,9	29

Как следует из приведенных в таблице данных, структура возбудителей ОРВИ различалась в зависимости от возрастной группы. Так, например, заболевания, обусловленные вирусами гриппа, преобладали среди детей старше 5 лет, тогда как бокавирусную инфекцию значительно чаще регистрировали у детей первых лет жизни (0-4лет). Вклад вирусов ПГ, АД и РВ в развитие ОРИ не претерпевал существенных колебаний в зависимости от возраста детей.

Заключение. В ходе проведенного исследования показано, что в период эпидемического сезона 2015-2016 гг. респираторные вирусы являлись причиной 80,7% заболеваний ОРВИ. В предэпидемический период в этиологической структуре возбудителей ОРВИ преобладали бока-, рино- и респираторно-синцитиальный вирусы, в период эпидемии 2016 г. доминировал вирус гриппа A(H1N1)pdm09, тогда как в постэпидемический период активно циркулировали вирус гриппа В и риновирусы. Выявлено преобладание вирусов гриппа в качестве этиологического агента ОРВИ среди детей возрастных групп 5-14 и 15-18 лет. Для БоВ наиболее уязвимыми являлись дети возрастных групп 0-1 и 2-4 лет.

Список литературы

1. WHO. World Health Report 2004 Statistical Anne. 2004.

2. WHO. A Manual for Estimating Disease Burden Associated With Seasonal Influenza. 2015.

ПЦР В АЛГОРИТМЕ ДИАГНОСТИКИ КОКЛЮШНОЙ И ПАРАКОКЛЮШНОЙ ИНФЕКЦИИ

Яцышина С.Б.[1], Прадед М.Н.[1], Малинина С.В.[2]

[1] ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора

[2] Филиал ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Москве» в ВАО, Москва

Введение. Во всем мире в последнее время наметилась тенденция к росту количества случаев заболевания коклюшной и паракоклюшной инфекцией. Так, в США в 2012 году заболеваемость коклюшем составила 14,8 случая на 100 тысяч населения, и к 2014 году снизилась лишь незначительно до 10,1 на 100 тысяч населения. По совокупным данным, в Европе отмечен двукратный рост заболеваемости коклюшем в период с 2010 (4,4 случая на 100 тысяч населения) по 2014 год (9,09 на 100 тысяч населения).

По данным Роспотребнадзора, в Российской Федерации в 2015 году произошло снижение заболеваемости вакциноуправляемыми инфекциями, за исключением заболеваемости коклюшем. Количество больных данной инфекцией, напротив, увеличилось на 35% по сравнению с 2014 годом, заболеваемость составила 4,42 случая на 100 тысяч населения.

Основными методами борьбы с коклюшной инфекцией являются вакцинация и ранняя диагностика с целью своевременного назначения специфической антибактериальной терапии, которая эффективна только в катаральном периоде (не позднее 14 дней после появления первых симптомов), а также изоляции инфицированных для предотвращения дальнейшего распространения возбудителя.

Согласно нормативно-методическим документам (СП 3.1.2.3162-14 «Профилактика коклюша» и МР 3.1.2.0072-13 «Диагностика коклюша и паракоклюша») основными методами диагностики коклюша и паракоклюша служат выделение культуры возбудителей, выявление ДНК возбудителей и обнаружение специфических антител. Культуру возбудителя можно выделить только в катаральном периоде, при этом возбудитель прихотлив (требователен к условиям транспортирования биоматериала и питательным средам). ДНК возбудителя дольше сохраняется в организме, поэтому метод ПЦР возможно применять при большей продолжительности болезни. Выявление специфических антител возможно, начиная с 3-й недели после появления симптомов заболевания.

Целями нашего исследования являлись: оценка эффективности выявления ДНК возбудителей коклюшной инфекции в сравнении с выделением культуры бактерий, и установление оптимальных и максимальных сроков от начала заболевания для проведения ПЦР.

Материалы и методы. Для сравнения эффективности лабораторных методов исследовали мазки с задней стенки глотки детей (n=478), которые направлялись на стандартное бактериологическое исследование во ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» с диагностической либо с профилактической целью.

Чтобы установить оптимальные сроки проведения ПЦР-исследования, была сформирована выборка 320 детей, имевших на момент первого обращения за медицинской помощью в детские городские поликлиники симптомы, не исключающие коклюшную инфекцию. На приеме у них проводился сбор мазков из носоглотки и задней стенки ротоглотки для ПЦР-исследования и опрос относительно даты появления симптомов заболевания.

ДНК возбудителей коклюша (*B.pertussis*), паракоклюша (*B.parapertussis*) определяли с применением набора реагентов «АмплиСенс Bordetella-multi-FL» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва) на основе ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

Основные результаты. Культуру возбудителя удалось выделить в материале 4 (0,8%) пациентов. ДНК представителей рода *Bordetella* была обнаружена у 81 (17%) пациента, из них в 52 образцах была идентифицирована ДНК *B.pertussis*, в 4 образцах - *B.parapertussis*, в 25 случаях была выявлена последовательность гена коклюшного токсина, но при этом ДНК было недостаточно для проведения видовой дифференциации. Для всех пациентов, у которых была выделена культура *B.pertussis*, результаты ПЦР были также положительны.

У пациентов, обследованных на амбулаторном приеме, ДНК возбудителей коклюша обнаруживалась при заболевании продолжительностью с 3-го по 31-й день от появления симптомов заболевания на момент взятия материала для исследования. Среди положительных находок 69% пришлось на детей, обратившихся за медицинской помощью в пределах 2 недель с момента появления симптомов, 85% - в пределах 3 недель, и 15% положительных случаев было выявлено в более поздние сроки.

Заключение. Показано, что ПЦР эффективнее бактериологического исследования по диагностической чувствительности более чем в 15 раз.

Оптимальными сроками для проведения ПЦР являются три недели от момента появления симптомов инфекции. У пациентов, болеющих более 3 недель, выявление ДНК возбудителей коклюша и паракоклюша возможно, но в случае получения отрицательного результата ПЦР, необходимо провести также исследование по обнаружению специфических антител.

Направление больных на ПЦР-исследование в ранние сроки (первая-вторая неделя) заболевания позволит эффективно применять этиотропную терапию, что поможет сокращать продолжительность болезни, предотвращать осложнения и вспышки.

НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ В ОПРЕДЕЛЕНИИ ЭТИОЛОГИИ ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИИ У ДЕТЕЙ

Яцышина С.Б. [1], **Спичак Т.В.** [2], **Ким С.С.** [3], **Воробьева Д.А.** [4], **Елькина М.А.**, **Горелов А.В.** [1]

[1] *ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия*
[2] *Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия*
[3] *Детская городская поликлиника № 138, Москва, Россия*
[4] *Российский Национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия*

Введение. По данным Европейского респираторного общества, вирусные внебольничные пневмонии (ВП) составляют около 40% ВП у детей [1]. Кроме того вирусные инфекции часто предшествуют развитию вирусно-бактериальных и бактериальных ВП, вызывая воспалительные и деструктивные изменения слизистой оболочки дыхательных путей и способствуя проникновению бактериальных патогенов в паренхиму легких. Респираторно-синцитиальный вирус (hRSv) в большинстве исследований признан значимым возбудителем ВП, часто обнаруживаемым при инфекции нижних дыхательных путей, включая бронхиолит и пневмонию. Роль других респираторных вирусов: риновирус (hRv), вирусы парагриппа (hPiv1-4), коронавирусы (hCov) и бокавирус (hBov) при ВП - неоднозначна. Идентификация возбудителей ВП возможна с помощью культуральных, иммунологических и молекулярно-генетических (ПЦР) методов исследования. К выявлению специфических антител к *Mycoplasma pneumoniae* следует относиться критически, поскольку их наличие в некоторых случаях может быть признаком инаппарантной или перенесенной ранее инфекции. При сравнении с ПЦР, и принимая результаты ПЦР за «референтные», результаты ИФА в 12,8% случаев являются ложноположительными и в 2,6% случаев – ложноотрицательными [2].

В настоящее время при обнаружении вирусных и основных атипичных возбудителей ВП предпочтение отдано ПЦР-диагностике как методу, обладающему высокой чувствительностью и специфичностью.

Разработка тестов количественного определения ДНК условно-патогенных агентов открывает возможности использования нестерильного биологического материала (образцы из дыхательных путей) для изучения этиологии ВП. Для выявления вирусной этиологии ВП считается допустимым использование мазков из носо- и ротоглотки [1], однако бактериальная этиология в связи с широким носительством условно-патогенной флоры может быть определена только при исследовании материала из ниж-

них дыхательных путей (мокроты, эндотрахеальных аспиратов или БАЛ) [1].

Целями нашего исследования были: установление этиологической значимости при ВП у детей разного возраста 16 респираторных вирусов, *M.pneumoniae* и *Clamydophila pneumoniae* путем сопоставления частоты их обнаружения методом ПЦР у больных ВП и здоровых детей разного возраста за десятилетний период наблюдения; оценка диагностических возможностей комбинации тестов ПЦР для выявления вирусных, атипичных и условно-патогенных бактерий; определение доли вирусной и вирусно-бактериальной этиологии в структуре ВП средней тяжести.

Материалы и методы. Обследовано 365 детей в возрасте от 1 мес. до 17 лет (4,95±3,97) больных среднетяжелой рентгенологически подтвержденной ВП и 583 условно-здоровых ребенка, сопоставимых по полу и возрасту. Методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени исследовали мазки из носо- и ротоглотки, мокроту либо эндотрахеальный аспират (у 66 больных) - на наличие нуклеиновых кислот 16 вирусов: гриппа (Inf A,B,C), hRSv, hPiv1-4, метапневмовируса (hMpv), hBov, аденовирусов (hAdv виды B,C,E), hCov (E229, OC43, NL63, HKUI), hRv и ДНК *M. pneumoniae* и *C. pneumoniae*. В материале из нижних дыхательных путей у 66 детей (8,5 лет ± 4,3 года) дополнительно определялось количество ДНК *Streptococcus pneumoniae* и *Haemopholus influenzae* с помощью набора реагентов «АмплиСенс Пневмо-квант-FL» (новая разработка ФБУН ЦНИИЭ), а также количество ДНК *S.aureus* и *S.pyogenes*. В работе использованы наборы реагентов производства ФБУН ЦНИИЭ, Москва.

Результаты исследования указывают на широкую распространенность вирусов при ВП, обнаруженных у 80,0% больных детей в возрасте до 2х лет, 68% - от 2 до 6 лет. У больных с достоверным отличием (p<0,0001) по сравнению с группой контроля превалировали: hRSv (19,9% *vs* 2,2%), hBov (6,6% *vs* 1,2%), hAdv (5,9% *vs* 0,5%), InfA (5,1% *vs* 0,5%) и hMpv (4,6% *vs* 0,2%). HRSv встречался с максимальной частотой в группах больных до 2х и 2-6 лет, с достоверным отличием от контроля (35,4% *vs* 7,4%, p=0,005 и 24,1% *vs* 1,3%, p<0,0001). Средний возраст инфицированных hRSv больных составил 3,2 ± 2,7 лет (медиана 2,6 лет). HBoV чаще обнаружен у больных в возрасте до 2х лет (15,4% при отсутствии в контроле, p = 0,031), причем 79,9% случаев в виде моноинфекции. Средний возраст инфицированных hBov больных составил 2,3 ± 1,1 года (медиана 2,3 года). HMpV выявлен у больных преимущественно в возрасте 2-6 лет (6,2%) и отсутствовал у здоровых детей этого возраста. Средний возраст инфицированных hMpv больных составил 4,3 ± 3,7 лет (медиана 3,1 лет). Частота инфицирования Inf A больных была невысокой, без существенных различий в возрастных группах, средний возраст составил 5,1 ± 4,1 лет (медиана 3,1 лет). HAdv чаще обнаруживался у больных 2-6 лет, и крайне редко в группе контроля (0-1,0%), средний возраст инфицированных составил 3,2 ± 1,6 года (медиана 3,0 года). Риновирусы, напротив, чаще обнаруживались у здоровых детей, чем при ВП (27,1% *vs* 15,9%, p<0,0001). Подробнее с результатами исследования можно ознакомиться в публикации (Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. 2016. Т. 95. № 2. С. 43-50.). ДНК *M.pneumoniae* выявлялась во всех возрастных группах больных с максимальной частотой (28,6%) у школьников, и крайне редко (0,2%) - у здоровых детей. Доля в структуре ВП *M.pneumoniae* варьировала в разные годы наблюдения.

Этиология ВП определялась в группе 66 детей, для которых был доступен материал из нижних дыхательных путей. Вирусная этиология идентифицирована у 17% обследованных детей, вирусно-бактериальная – в 23 % случаев. Условно-патогенные бактерии (преимущественно *S.pneumoniae* и *H.influenzae*), в этиологической структуре ВП составили 13%, и дополнительно обнаруживались в сочетании с вирусами в 23% случаев. *M.pneumoniae* в данной выборке, сформированной в год эпидемического подъема данной инфекции, заняла 37,5 % случаев.

Заключение. Комбинация использованных наборов реагентов, способных выявлять как вирусные, так и бактериальные агенты ВП, позволила определить этиологию ВП у 91 % детей, для которых был доступен материал из нижних дыхательных путей. Показана широкая распространенность вирусов при ВП средней тяжести у детей. Доказана этиологическая роль при ВП у детей респираторно-синцитиального вируса, метапневмовируса, бокавируса, вируса гриппа А, аденовируса, *M. pneumoniae* и не исключена - для вируса гриппа В и вируса парагриппа 3. Установлена возрастная зависимость распределения возбудителей респираторной инфекции в этиологической структуре ВП.

Список используемой литературы

1. Rohde G.G.U. The role of viruses in CAP. Eur Respir Monogr 2014; 63: 74-87.

2. Спичак Т.В., Катосова Л.К., Яцышина С.Б., Ким С.С., Прадед М.Н., Пономаренко О.А., Зубкова И.В. Критический взгляд на результаты лабораторной диагностики внебольничной пневмонии микоплазменной этиологии у детей. Журнал им. Сперанского «Педиатрия» 2014 г; №3:46-55.

Раздел 5. МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ИЗУЧЕНИИ ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГРУПП-СПЕЦИФИЧНЫХ ПРАЙМЕРОВ НА ГЕН 16S рДНК ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ МАРКЕРНЫХ ФИЛОТИПОВ В КИШЕЧНОМ МИКРОБИОМЕ ПОДРОСТКОВ С ОЖИРЕНИЕМ

Белькова Н.Л.[1,2], Немченко У.М.[1], Кравцова О.В.[1], Мандзяк Т.В.[1], Погодина А.В.[1], Рычкова Л.В.[1]

[1] ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», Иркутск, Россия
[2] ФГБУН «Лимнологический институт» СО РАН, Иркутск, Россия

Ключевые слова: кишечный микробиом, генетические маркеры, 16S рДНК, вариабельные районы, подростки, ожирение

Введение. Для понимания сложных взаимосвязей человека с микробными сообществами, населяющими его тело, требуется развернутая характеристика микроорганизмов, ассоциированных с различными органами и тканями – информация о микробиоме. Кишечный микробиом является одним из наиболее изученных в настоящее время, благодаря реализации нескольких крупномасштабных проектов – Human Microbiome Project, International Human Microbiome Standards и др. Разработанные стандартные операционные процедуры (СОП) по забору материала, его транспортировке и хранению, выделению нуклеиновых кислот позволяют получать в разных проектах максимально сопоставимые результаты. Именно поэтому на разных объектах адаптируются методы детекции и количественной оценки представленности основных доминирующих или ключевых групп микроорганизмов (Matsuki et al., 2002, 2004; Guo et al., 2008; Bacchetti De Gregoris et al., 2011; Yang et al., 2015 и др.).

Цели и задачи. Апробировать систему детекции некоторых представителей анаэробных микроорганизмов в кишечном микробиоме в режиме реального времени на примере подростков с ожирением и нормальной массой тела.

Материалы и методы. Образцы биологического материала были получены из клиники ФГБНУ «НЦ ПЗСРЧ». Основную и контрольную группы составили, соответственно, 6 и 5 подростков в возрасте от 11 до 16 лет. Критерием включения в основную группу был установленный диагноз экзогенно-конституционального ожирения (индекс массы тела ≥ 95 перцентиля для данного роста, возраста и пола). В контрольную группу вошли дети с нормальным весом. Подростки обеих групп были рождены от естественных родов и находились на грудном вскармливании по меньшей мере 4 месяца.

Пробы отбирали, транспортировали и хранили согласно СОП, разработанным в рамках проекта International Human Microbiome Standards (IHMS). Геномную ДНК из фекалий выделяли коммерческим набором Qiagen Genomic Stool DNA isolation согласно инструкции производителя и с модификациями согласно протоколу IHMS_SOP 06 V2. Количество выделенной ДНК оценивали спектрофотометрически на приборе NanoVue (Biochrom, США). Долю бактериальной ДНК оценивали в ПЦР в реальном времени, где в качестве стандарта использовали ДНК *Escherichia coli*. Детекцию таких групп, как *Clostridium coccoides* group, *Clostridium leptum* subgroup, *Atopobium* cluster, *Bacteroides fragilis, Bifidobacterium,* вели только с помощью групп-специфичных праймеров с электрофоретической детекцией результата амплификации. Дополнительно использовали ПЦР в реальном времени с детекцией результата с помощью SybrGreen для полуколичественной оценки представленности *Bacteroides, Verrucomicrobia, Akkermansia* и *Prevotella* с групп-специфичными праймерами (Matsuki et al., 2002, 2004а,б; Guo et al., 2008; Dao et al., 2015). Дополнительно на основании собственных метагеномных данных и данных сервера NCBI были модифицированы праймеры на доминирующие в кишечных микробиомах филотипы *Bacteroides, Verrucomicrobia, Akkermansia* и *Prevotella*.

Основные результаты. Концентрация бактериальной ДНК составила от 0,5 до 7,1 нг/мкл. Получена положительная детекция *Bacteroides, Verrucomicrobia, Akkermansia, Bifidobacterium* и *Prevotella*. Результаты детекции в варианте классической ПЦР показали отсутствие в кишечном микробиоме детей обоих групп ДНК таких условно-патогенных бактерий, как *Clostridium, Atopobium* cluster и *Bacteroides fragilis.* Представители *Akkermansia* и *Prevotella* были детектированы в обоих группах, но их количества различались. *Akkermansia* детектирована у всех детей контрольной группы с усредненной долей в кишечном микробиоме от 5 до 13%, в то время как в основной группе ДНК детектирована в 5 образцах из 6 и доля не превышала 7%. Следует отметить сопоставимость данных, полученных на праймерах, разработанных нами и используемых ранее. Детекция представителей *Bacteroides* и *Verrucomicrobia* отличалась в зависимости от используемых праймеров, на новых праймерах в среднем получены немного меньшие значения. Мы считаем, что праймеры, используемые ранее, менее селективны, позволяют детектировать больший спектр бактерий этих двух фил и дают завышенные оценки индигенной кишечной микробиоты. Основная задача данного исследования заключалась в преимущественной детекции анаэробных представителей кишечного микробиома.

Представители этой анаэробной микробиоты человека активно изучаются в настоящее время в связи с такими заболеваниями, как ожирение, рак кишечника, диабет. Так, например, показано, что в фекалиях больных диабетом 2-го типа представленность таких облигатных анаэробов, как *Clostridium coccoides* group, *Atopobium* cluster и *Prevotella,* достоверно ниже, чем факультативных анаэробов *Lactobacillus*.

Заключение. Таким образом, адаптирована система детекции представителей одиннадцати групп бактерий, относящихся к индигенной анаэробной микробиоте. Детектирована более низкая доля *Akkermansia* в кишечном микробиоме подростков с ожирением. Показано, что использование таких чувствительных методов, как ПЦР в реальном времени, позволяет определить состав и представленность целевых групп микроорганизмов в кишеч-

ном микробиоме человека и выявить их взаимосвязь с различными клиническими параметрами.

Работа выполнена в рамках выполнения государственной бюджетной темы № 0542-2014-0002.

Литература

1. Bacchetti De Gregoris T., Aldred N., Clare A.S., Burgess J.G. Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. // J. Microbiol. Methods 2011. V. 86. P. 351–356.

2. Guo X., Xia X., Tang R., Zhou J., Zhao H., Wang K. Development of a real-time PCR method for Firmicutes and Bacteroidetes in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. // Lett. Appl. Microbiol. 2008. V. 47. P. 367–373.

3. Matsuki T., Watanabe K., Fujimoto J., Miyamoto Y., Takada T., Matsumoto K., Oyaizu H., Tanaka R. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68, No. 11. P. 5445–5451.

4. Matsuki T., Watanabe K., Fujimoto J., Takada T., Tanaka R. Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real time PCR analysis of predominant bacteria in human feces. // Appl. Environ. Microbiol. 2004a. V. 70. P. 7220–7228.

5. Matsuki T., Watanabe K., Fujimoto J., Kado Y., Takada T., Matsumoto K., Tanaka R. Quantitative PCR with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers for analysis of human intestinal bifidobacteria. // Appl. Environ. Microbiol. 20046. V. 70, No. 1. P. 167–173.

6. Yang Y.W., Chen M.K., Yang B.Y., Huang X.J., Zhang X.R., He L.Q., Zhang J., Hua Z.C. Use of 16S rRNA Gene-Targeted Group-Specific Primers for Real-Time PCR Analysis of Predominant Bacteria in Mouse Feces. //Appl. Environ. Microbiol. 2015. V. 81, No. 19. P. 6749–6756.

7. Dao M.C., Everard A., Aron-Wisnewsky J., Sokolovska N., Prifti E., Verger E.O., Kayser B.D., Levenez F., Chilloux J., Hoyles L., MICRO-Obes Consortium, Dumas M.-E., Rizkalla S.W., Doré J., Cani P.D., Clément K. *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. // Gut 2015. 65(3): 426–436.

ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ ЭНТЕРОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В РЕСПУБЛИКЕ БАШКОРТОСТАН

Галиева А.Т., Хунафина Д.Х., Валишин Д.А., Шайхуллина Л.Р., Бурганова А.Н., Асадуллина О.А., Мурзабулатова И.Х.

ФГБОУ ВО «Башгосмедуниверситет» МЗ РФ, Уфа, Россия

Энтеровирусные инфекции на сегодняшний день остаются неуправляемыми инфекциями. Эта большая группа острых вирусных инфекций человека за последние годы имеет тенденцию к повышению заболеваемости практически на всей территории Российской Федерации. За последние три года в Республике Башкортостан отмечается рост заболеваемости энтеровирусными инфекциями. Максимальный подъем заболеваемости отмечался в 2014 году, что составило 5,28 случая на 100 тыс. населения (в РФ – 6,43 на 100 тыс. населения), тогда как в 2013 году заболеваемость составляла 5,0 на 100 тыс. населения (в РФ – 11,26 на 100 тыс. населения). Надо отметить, что с улучшением диагностической базы инфекционной больницы города увеличилось число подтверждаемых случаев этой инфекции. Проблемы с реактивами для ПЦР-диагностики совпали со снижением количества выявляемых случаев в 2015 году – 2,06 на 100 тыс. населения (РФ – 5,38 на 100 тыс. населения). За сентябрь 2016 года на территории восточной части РФ было зафиксировано значительное повышение заболеваемости энтеровирусными инфекциями, что вынудило временно закрыть доступ для детей в бассейны.

Надо отметить, что более 85% заражений энтеровирусами проходит без клинических проявлений, и лишь 15% больных имеют клинически выраженные формы этой инфекции.

За последние 5 месяцев текущего года в ГБУЗ РБ ИКБ№ 4 г. Уфа госпитализированы 34 больных энтеровирусной инфекцией. Первые пациенты были выявлены уже в апреле, что указывает на возможное неблагополучие и будущий эпидемиологический подъем этой кишечной инфекции. Сезонность энтеровирусных инфекций приходится на летне-осенний период, но, как правило, перед подъемом заболеваемости уже с весны выявляются первые больные. Максимум заболеваемости приходится на конец июля – август, что связано с длительной жаркой погодой до конца августа, что способствовало удлинению купального сезона. Возрастной состав пациентов: с большой частотой заболевание закономерно отмечается у детей от 1 до 5 лет, чаще неорганизованного контингента (до 53%), чем организованного (до 34%). При уточнении эпиданамнеза чаще указывалось на купание в водоемах – до 31%, контакт в семье с болеющими родственниками – до 16%. Из клинических форм преобладали типичные для энтеровирусной инфекции варианты: герпангина (59%), экзантема (25%); атипичные: энтеровирусный гастроэнтерит (6%), энтеровирусная лихорадка («малая болезнь» у 3%), полиомиелитоподобная форма (3%). Неврологические нарушения и поражение ЦНС в этом сезоне не были преобладающими. В результатах обследования крови и мочи выявлялись типичные для энтеровирусной инфекции сдвиги: умеренный лейкоцитоз или нормоцитоз, перед выпиской сменяющийся лимфоцитозом. Диагноз подтверждался во всех случаях методом ПЦР-исследования на РНК энтеровируса в нестерильных материалах из зева и кала. Типирование энтеровирусов не проводилось в связи со сложностью проведения таких исследований.

Этиотропной терапии энтеровирусной инфекции на сегодняшний день не существует. Предложенный препарат плеконарил на территории РФ не зарегистрирован.

Попытки назначения иммунных препаратов, интерферонов, индукторов интерферонов на сегодняшний день доказательной базы не имеют. Основное лечение кишечной инфекции патогенетическое, симптоматическое. В анализируемых историях болезни с противовирусным эффектом назначался виферон (66% случаев), аперфлю (3%). Антибиотик цефалоспоринового ряда цефтриаксон назначался 41% больных длительностью от 4 до 7 дней. Глюкокортикостероиды назначались при фебрильных цифрах лихорадки и проявлении неврологических нарушений (31%).

Таким образом, для современного течения энтеровирусной инфекции сохраняются типичные клинические симптомы. Учитывая изменение климатических условий, миграционные процессы среди населения, улучшение диагностической базы медицинских организаций, выявляемость больных с атипичными клиническими формами энтеровирусной инфекции возрастет. Остается актуальной проблемой решение вопроса этиотропной терапии при развитии тяжелых форм с поражением паренхиматозных органов и ЦНС, особенно среди младшего детского возраста.

ОТКРЫТАЯ БАЗА ДАННЫХ СУБВИДОВОГО ТИПИРОВАНИЯ САЛЬМОНЕЛЛ НА ТЕРРИТОРИИ РФ

Гусева А.Н., Рожнова С.Ш., Христюхина О.А., Кулешов К.В., Шипулин Г.А.

ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение. Сальмонеллезы продолжают оставаться одной из наиболее часто регистрируемых диарейных инфекций, в том числе в очагах с групповой заболеваемостью. Оценка гетерогенности изолятов сальмонелл, как в пределах одного очага, так и между различными очагами, является важным инструментом эпидемиологического расследования, позволяющего реконструировать эпидемиологические связи между источниками, факторами передачи и пострадавшими на различных территориях. Высокие требования по дифференцирующей способности и обеспечению воспроизводимости используемых методов субтипирования, связанные с высокой юридической ответственностью при проведении данных исследований, обуславливают преимущественное применение методов и протоколов субтипирования, валидированных на международном уровне. Несмотря на широкое внедрение в зарубежную практику эпидемиологического надзора методов высокопроизводительного секвенирования (WGS), обеспечивающего максимальную информативность исследований, рутинные методы субтипирования (PFGE, MLVA) остаются широко востребованными в силу своей низкозатратности и наличия большого объема информации, накопленной в специализированных базах данных. При этом одним из главных недостатков при использовании рутинных методов субтипирования является отсутствие доступа к полученным данным, в частности, информации о географической территории, на которой были выделены те или иные субтипы бактериального патогена.

Цель и задачи. Целью работы явилось создание геоинформационной системы на основе национальной базы данных субтипирования сальмонелл для ее использования в практике эпидемиологического надзора.

Материалы и методы. Сбор, обработка и обобщение первичной информации проводились на базе референс-центров Роспотребнадзора по мониторингу возбудителей ОКИ и сальмонеллезов, функционирующих на базе ФБУН ««ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора. В исследование включались изоляты *Salmonella spp.,* выделенные из очагов групповой заболеваемости, и отдельные серотипы, имеющие относительно малую распространенность в популяции.

Субтипирование изолятов Salmonella spp. проводилось с применением унифицированных протоколов PFGE-анализа (*Standard operating procedure for Pulsenet PFGE of Escherichia coli O157:H7, Escherichia coli non-O157 (STEC), Salmonella serotypes, Shigella sonnei and Shigella flexneri*). Обозначение PFGE-паттернов проводилось в соответствии с принципами номенклатуры, предложенной в протоколе.

Пополнение, валидация и присвоение унифицированных названий PFGE-паттернов для исследуемых изолятов осуществлялась на платформе Bionumerics v6.6 (Applied Math, Бельгия). Разработка веб-приложения проведена специалистами лаборатории молекулярной диагностики и эпидемиологии кишечных инфекций отдела молекулярной диагностики.

Основные результаты. За период с 2010 по 2017 г. в базе данных накоплена информация о 2500 изолятах с 54 субъектов РФ, дифференцирующихся на 495 уникальных сочетаний *Xba*I-*Bln*I PFGE-профилей. Разработанное веб-приложение позволяет при получении пользователем информации о сочетании PFGE-профилей провести анализ временного и территориального распределения случаев его выявления, содержит информацию о серотиповой принадлежности изолята и их количестве в пределах каждого очага. Пользовательский интерфейс базы данных позволяет выбирать диапазон дат для проведения анализа, результаты которого отражаются как в графическом виде на карте, так и в виде диаграммы распределения случаев выявления искомого PFGE-профиля.

Разработанная база данных и пилотный алгоритм ее использования в практике эпидемиологического надзора позволяют существенно оптимизировать межрегиональное взаимодействие специалистов эпидемиологических служб, что подтверждается неуклонным возрастанием обращений к данному разделу сайта референс-центра (www.epid-oki.ru /Сервисы /ГИС-PFGE) на протяжении последних лет.

ОСОБЕННОСТИ ЦИРКУЛЯЦИИ НОРОВИРУСА ГЕНОТИПА GII.P17_GII.17 В НИЖЕГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ В 2016 ГОДУ

Епифанова Н.В., Калашникова Н.А., Зверев В.В., Сашина Т.А., Кашников А.Ю., Хохлова Н.М., Новикова Н.А.

ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Нижегородской области», Нижний Новгород, Россия

Введение. Норовирус генотипа GII.17 привлек к себе внимание в конце 2014 года как возможный новый пандемический вариант, способный вытеснить доминирующий в мире в течение двух последних десятилетий норовирус генотипа GII.4 [1]. В этот период новый вариант генотипа GII.17 распространился в Китае, Японии, Корее, Таиланде, Гонконге и вызвал существенный рост числа вспышек норовирусной инфекции (НВИ) [1]. В России описаны водные вспышки НВИ, обусловленные GII.17, в Хабаровском крае в марте – апреле 2015 года [2] и в Республике Северная Осетия – Алания в июне 2015 года [3]. В Нижнем Новгороде норовирус генотипа GII.17 был впервые обнаружен нами в июне 2015 года и по итогам года занял четвертое место в спектре генотипов после GII.6, GII.4 и GII.2 [4].

Целью данной работы явилась идентификация норовируса генотипа GII.17, циркулировавшего на территории Нижегородской области в 2016 году, и оценка его эпидемической значимости.

Материалы и методы. За период с января по декабрь 2016 года на наличие норовирусов были исследованы образцы фекалий 1635 детей в возрасте до 14 лет, госпитализированных с острыми кишечными инфекциями (ОКИ) в детский инфекционный стационар г. Нижнего Новгорода. Проведено также генотипирование норовирусов, обнаруженных при расследовании группового заболевания ОКИ в оздоровительном лагере в Нижегородской области в июле 2016 года. Для обнаружения норовирусов использовали наборы реагентов «АмплиСенс Norovirus 1,2 genotypes-EPh», «АмплиСенс Rotavirus/Norovirus/Astrovirus-FL» (ЦНИИЭ, Москва) и лабораторные методики. Определение генотипа норовирусов проводили путем секвенирования кДНК участка вирусного генома размером 600 н.о., кодирующего N/S-домен капсидного белка VP1, и участка размером 319 н.о., кодирующего РНК-зависимую РНК-полимеразу. Ампликоны очищали с помощью набора для выделения ДНК из геля производства ООО «Фрактал Био» (Санкт-Петербург). Определение первичной структуры фрагментов кДНК генома норовирусов осуществляли в автоматическом режиме с использованием генетического анализатора Beckman Coulter CEQ8000 и набора реагентов DTCS Quick Start Kit («Beckman Coulter», США).

Нуклеотидные последовательности фрагментов кДНК анализировали с помощью веб-сервиса для автоматического генотипирования норовирусов Norovirus Genotyping Tool Version 1.0 [http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool] и пакета программ BLAST. Выравнивание нуклеотидных последовательностей, построение филогенетических деревьев и анализ выведенных аминокислотных последовательностей осуществляли с помощью программного обеспечения MEGA, версии 5.2 и 6.0. Для сравнения использовали нуклеотидные последовательности генома норовирусов, имеющиеся в базах данных GenBank. Филогенетический анализ проводили методом объединения ближайших соседей (Neighbor-joining) с использованием двухпараметрической модели Kimura.

Основные результаты. В 2016 году норовирусы были обнаружены у 20,4% из 1635 обследованных детей, госпитализированных с ОКИ. Для 25 изолятов норовирусов был установлен генотип. Норовирус генотипа GII.17 составил 20,0% от числа типированных изолятов и занял второе место после генотипа GII.4, который был определен в 60,0% случаев. Норовирус GII.17 был идентифицирован также у лиц, инфицированных в ходе вспышки ОКИ в оздоровительном лагере в июле 2016 года. Все случаи выявления норовируса GII.17 пришлись на январь – июль 2016 года, во второй половине года этот генотип в Нижнем Новгороде нами не обнаруживался. Снижение его выявляемости наблюдалось и в других регионах мира – в Южной Корее [5], в США (по данным CDC Calicinet [https://www.cdc.gov/norovirus/reporting/calicinet/data.html]), в Японии (по данным Национального Института по инфекционным болезням [http://www.niid.go.jp/niid/en/iasr-noro-e.html]).

В настоящее время норовирусы генотипа GII.17 разделяют на четыре варианта – A, B, C и D [6]. К вариантам A и B относятся норовирусы, спорадически выявляемые в единичных случаях начиная с 70-х годов прошлого века в странах Африки, Азии, Европы, Северной и Южной Америки. С возникновением варианта C в 2013 году и его распространением связан рост вспышечной заболеваемости НВИ в Юго-Восточной Азии в 2014-2015 годах. Несколько позже появился вариант D, который, кроме азиатских стран, обнаружен в США, Канаде и Европе (Германия, Словения).

Филогенетический анализ нуклеотидной последовательности участка, кодирующего N/S-домен капсидного белка VP1 нижегородских изолятов норовируса генотипа GII.17, позволил установить, что все они относятся к варианту D. Норовирусы, выявленные при спорадической заболеваемости, родственны изолятам из Китая (гомология 99,5%-100%). Норовирусы, обнаруженные при групповом заболевании, идентичны друг другу по исследуемому участку генома и наиболее близки к изоляту 15-G1200/Ger/2015 (номер в GenBank KX244853), выявленному в Германии в октябре 2015 года (гомология 99,5%).

При анализе участка гена, кодирующего РНК-зависимую РНК-полимеразу, установлено, что нижегородские изоляты имеют специфичность GII.P17.

Заключение. Показано, что в 2016 году на территории Нижегородской области циркулировал норовирус генотипа GII.P17_GII.17, вариант D, внесший определенный вклад в заболеваемость норовирусной инфекцией в регионе. Однако резкое снижение его выявляемости во второй половине 2016 года позволяет предположить, что норовирус GII.17 в основном исчерпал свой эпидемический потенциал. Аналогичная ситуация складывалась в 2009-2011 годах с норовирусом генотипа GII.12. Развитие эпидемического процесса норовирусной инфекции в 2017 году, по всей вероятности, будет вновь определяться в большей мере молекулярной эволюцией норовируса генотипа GII.4.

Список используемой литературы

1. De Graaf M., van Beek J., Vennema H. et al. Euro Surveill. 2015 Jul 2; 20(26). pii: 21178.

2. Зайцева Т.А., Каравянская Т.Н., Чистяк В.М. и соавт. Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2015. № 29. С. 17-25.

3. Малецкая О.В., Тибилов А.Г., Прислегина Д.А. и соавт. ЖМЭИ. 2016. № 2. С. 69-74.

4. Епифанова Н.В., Зверев В.В., Новикова Н.А. Инфекционные болезни. 2016. Т. 14. № S1. С. 96.

5. Choi Y.S., Koo E.S., Kim M.S. et al. Food Environ Virol. 2017 Jan 24. doi: 10.1007/s12560-017-9278-4. [Epub ahead of print]

6. Parra G.I., Squires R.B., Karangwa C.K. et al. PLoS Pathog. 2017 Jan 19; 13(1): e1006136. doi: 10.1371/journal.ppat.1006136.

ИЗМЕНЕНИЕ СОСТАВА МИКРОФЛОРЫ ПРИ РАКЕ ЖЕЛУДКА

Кит О.И., Зыкова Т.А., Геворкян Ю.А., Легостаев В.М., Богомолова О.А.

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия

Введение. Одним из важнейших факторов риска канцерогенеза при раке желудка признано хроническое носительство потенциально онкогенных инфекционных агентов (*H. pylori, EBV*). В то же время роль изменений микробиоценоза слизистой оболочки желудка (СОЖ) в опухолевой трансформации не до конца изучена.

Цель. Сравнить частоту микробной колонизации СОЖ при раке желудка и гастритах.

Материал и методы. Исследование проводили на базе клиники ФГБУ «РНИОИ» МЗ РФ. Исследовали интраоперационно взятые опухолевые и условно здоровые ткани по линии резекции при раке желудка, а также биоптаты СОЖ при гастритах. Для экстракции ДНК использовали сорбционный метод. Проводили определение ДНК *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Enterobacteriaceae*, *H. pylori*, *Bacteroides spp., в т.ч.B. fragilis*, продуцирующих энтеротоксин *(BFT), Candida spp.* Выявление ДНК проводили методом ПЦР в реальном времени, использовали наборы реагентов, разработанные ЦНИИЭ Роспотребнадзора. Всего было исследовано 59 образцов опухолевой и условно здоровой ткани у больных раком желудка, 33 биоптата СОЖ у больных гастритами.

Результаты исследований. Из 30 пациентов с раком желудка у 12 (40,0%) была аденокарцинома, 4 (13,3%) – перстневидноклеточный рак, 2 (6,7%) – недифференцированный рак, 2 (6,7%) – НХЛ, 1 (3,3%) – плоскоклеточный рак, 2 (6,7%) – сочетание перстневидноклеточного с нейроэндокринным или недифференцированным раком, 7 (23,3%) – сочетание аденокарциномы с нейроэндокринным, перстневидноклеточным или недифференцированным раком. Группой сравнения были 33 пациента с морфологически подтвержденными поверхностными гастритами.

В ткани опухоли и здоровой ткани ДНК бактероидов была обнаружена у 80,0% больных, при гастритах – ни у одного. Во всех образцах ткани опухоли была обнаружена ДНК *B. fragilis*, и только в 8,3% из них – *BFT*. Помимо этого, в 25,0% позитивных образцов была обнаружена ДНК бактероидов других групп. В литературе обсуждается вопрос о том, что фрагилизин, за счет деградации Е-кадгерина и активации транскрипционных факторов, обладающих разнонаправленным онкогенным действием, может промотировать развитие опухоли.

Среднее количество энтеробактерий в ткани опухоли составило $6,7x10^5$ ГЭ/мл, в здоровой ткани – $7,0x10^5$ ГЭ/мл, в биоптате СОЖ при гастритах – $4,0x10^2$ ГЭ/мл, стафилококков – $3,4x10^2$ ГЭ/мл, $2,6x10^2$ ГЭ/мл и $8,7x10^1$ ГЭ/мл, стрептококков – $9,1x10^5$ ГЭ/мл, $1,3x10^5$ ГЭ/мл и $5,1x10^3$ ГЭ/мл соответственно. Таким образом, количество энтеробактерий в ткани опухоли при раке желудка превышало аналогичный показатель при гастритах в 1675 раз, стафилококков – в 3,9 раза, стрептококков – в 178 раз. Гены антибиотикорезистентности группы bla_{TEM} были обнаружены у 50,0% больных при раке желудка и 8,7% при гастритах.

При раке желудка ДНК *H. pylori*, как в ткани опухоли (50,0%), так и в условно здоровой слизистой (58,6%), была обнаружена чаще, чем при гастритах (40,6%). Примечательно, что средние показатели Ct, косвенно отражающие количество ДНК в образцах, в ткани опухоли (25) и биоптатах (24) отличались незначительно. В условно здоровой ткани при раке желудка средний Ct был на 3-4 цикла меньше (21), что говорит о большей бактериальной нагрузке в этих образцах.

ДНК *Candida spp*. при раке желудка была обнаружена у 40% пациентов в опухолевой и у 31,0% в здоровой ткани, при гастритах у 8,3% больных. ДНК *C.albicans* в опухолевой ткани была обнаружена в 36,7%, *C.glabrata* у 13,3%, *C.krusei* у 3,3% образцов, в 25,0% всех позитивных проб обнаружена ДНК *C.albicans* и *C.glabrata*. Среднее количество *C.albicans* в опухолевой ткани составило $1,5x10^4$ ГЭ/мл,

в здоровой - 4,3x10^2 ГЭ/мл, *C.glabrata* – 3,0x10^3 ГЭ/мл и 4,9x10^3 ГЭ/мл соответственно. В образцах СОЖ при гастритах ДНК *Candida spp*. была обнаружена в единичных копиях.

ДНК ЦМВ была обнаружена в 43,3% образцов опухолевой и 24,1% здоровой ткани. Вирусная нагрузка составила 3,0x10^2 копий ДНК/10^5 клеток в опухолевой и 14 копий ДНК /10^5 клеток в здоровой ткани. Для ВЭБ частота выявления ДНК составила 86,7% в опухолевой и здоровой ткани, вирусная нагрузка 7,2x10^5 и 4,1x10^4 копий ДНК/10^5 клеток соответственно. ДНК ВГЧ 6 типа была выявлена в 63,3% образцов опухолевой и 82,8% здоровой ткани, вирусная нагрузка составила 2,0x10^2 и 1,0x10^2 копий ДНК/10^5 клеток соответственно. При гастритах частота выявления ДНК ЦМВ составила 2,0%, ВЭБ – 55,0%, ВГЧ 6 типа – 10,2%. Во всех случаях были обнаружены единичные копии ДНК вируса.

Заключение. Установлено значительное преобладание частоты инфицирования ткани опухоли желудка по сравнению с гастритами представителями семейства *Enterobacteriaceae, Streptococcus spp., Bacteroides spp., Candida spp*., в большинстве случаев эти возбудители находились в ассоциации. Значительно чаще в опухолевой ткани были обнаружены гены bla_{TEM}. Частота инфицирования ткани опухоли вирусами группы герпеса и уровень вирусной нагрузки при раке желудка превышали эти показатели при гастритах. Установленные различия микробиоценоза слизистой оболочки при раке желудка по сравнению с гастритами свидетельствуют о возможном участии вирусной и бактериальной микрофлоры в процессах опухолевой трансформации.

ПРЕВАЛИРУЮЩИЕ КЛОНЫ ШТАММОВ *S. TYPHI* НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ

Кафтырева Л.А., Егорова С.А., Макарова М.А.

ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Введение. В последние годы в РФ сложилась стабильная эпидемиологическая ситуация на фоне продолжающейся тенденции к снижению заболеваемости брюшным тифом. Заболеваемость носила спорадический характер и регистрировалась, как правило, среди приезжих из различных стран, лиц из социально неблагополучных групп населения, а также среди жителей России, выезжавших в страны, неблагополучные по брюшному тифу. За последние 10 лет в 62 субъектах РФ было зарегистрировано более 800 случаев брюшного тифа. Завоз инфекции отмечен из Азербайджана, Таджикистана, Абхазии, Кыргызстана, Узбекистана, Индии, Бангладеш, Камбоджи, Египта, ОАЭ, Пакистана и Непала. Клиническая картина брюшного тифа характеризовалась типичными классическими проявлениями болезни. Поздняя госпитализация больных служила потенциальной угрозой развития тяжелых осложнений, требующих хирургического вмешательства, и ухудшения прогноза брюшного тифа. Недооценка эпидемиологических и клинических данных затрудняла догоспитальную клиническую диагностику у пациентов с лихорадкой неясного генеза, приехавших из стран с теплым и жарким климатом, а также у лиц без определенного места жительства.

Целью исследования было изучение штаммов S.Typhi, выделенных на административных территориях Российской Федерации в 2005-2015 гг. от больных брюшным тифом в манифестной форме: определение чувствительности к клинически значимым антибиотикам и характеристика превалирующих клонов возбудителя.

Материалы и методы. В исследование включили 303 штамма S.Typhi из коллекции референс-центра по мониторингу за возбудителем брюшного тифа (ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург). Определение чувствительности к антибиотикам (бета-лактамам, хинолонам, аминогликозидам, хлорамфениколу, ко-тримоксазолу, азитромицину) проводили диско-диффузионным методом согласно КР «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» 2015 г. Механизм резистентности к хинолонам выявляли путем детекции мутаций в генах *gyr*A, *gyr*B, *par*C и *parE* на основе данных полногеномного секвенирования, полученных с использованием наборов реагентов Nextera XT DNA Sample Prep Kit и MiSeq Reagent Kit v2500 (Illumina, США). Сборку и анализ геномов проводили с помощью CLC Genomics. Оценку генетического родства штаммов проводили методом гель-электрофореза в пульсирующем электрическом поле (PFGE) по стандартному международному протоколу PulseNet.

Основные результаты. Проведенные исследования показали, что популяция штаммов S. Typhi, выделенных в 2005-2012 гг. в Санкт-Петербурге и на 16 других территориях РФ, характеризовалась различными фенотипами резистентности к антибиотикам и генетической неоднородностью. Чувствительными ко всем препаратам были 10,6% (32 из 303 штаммов), множественной резистентностью (ампициллин, ко-тримоксазол, хлорамфеникол и налидиксовая кислота) обладали 2,3% (7 штаммов). Большинство штаммов (85,4%, 259 штаммов) характеризовались глобально распространенным во многих странах фенотипом: устойчивостью низкого уровня к фторхинолонам (МПК ципрофлоксацина 0,19-0,5 мг/л). Кроме того, у пяти штаммов (1,7%) отмечена устойчивость высокого уровня к фторхинолонам (МПК ципрофлоксацина 32,0 мг/л). Молекулярно-генетические исследования показали, что устойчивость к хинолонам была обусловлена мутациями в кодонах 83 и 87 гена *gyr*A (Asp87Asn, Ser83Tyr, Ser83Phe). Генотипирование методом PFGE позволило выявить 11 кластеров, объединяющих близкородственные PFGE-профили. 78,5% штаммов, характеризующихся ведущим фенотипом резистентности (устойчивость низкого уровня к ципрофлоксацину, обусловленная мутацией Asp87Asn), относились к одному кластеру. Такие штаммы ежегодно выделялись от заболевших брюшным тифом на различных террито-

риях РФ. Штаммы с другими фенотипами резистентности, включая чувствительные к АМП, принадлежали к индивидуальным PFGE-профилям.

Заключение/выводы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что популяция возбудителей брюшного тифа, выделенных на территории Российской Федерации, представлена штаммами, которые различаются по фенотипу (генотипу) резистентности к антибиотикам и PFGE-генотипу. В настоящее время комбинация фенотипической и молекулярно-генетической характеристики при исследовании гетерогенной популяции возбудителя брюшного тифа обладает высокой информативностью и эпидемиологической конкордантностью, представляет собой оптимальную схему субтипирования штаммов в целях эпидемиологического надзора, позволяет выявлять клональный характер возбудителя, вызвавшего спорадические или групповые случаи заболевания. Выявленные однонуклеотидные замены в хромосомных генах возбудителя могут служить эпидемиологической меткой для выяснения происхождения и подтверждения завоза штаммов S.Typhi на территорию РФ. Результаты исследования легли в основу создания российской базы данных биологических свойств, включая чувствительность к антибиотикам и генетическую характеристику, штаммов возбудителя брюшного тифа, зарегистрированного в Российской Федерации.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ REAL-TIME ДЕТЕКЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ВИРУСНЫХ ДИАРЕЙ

Гусева А.Н., Веселова О.А., Курочкина Д.Е., Шипулин Г.А.

ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение. Активное применение методов амплификации нуклеиновых кислот (МАНК) в диагностике вирусных гастроэнтеритов и их высокая аналитическая чувствительность требуют навыков грамотной интерпретации результатов исследований (Corcoran MS et al. 2014; Elfving K.1. et al. 2014). Формат ОТ-ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени (real-time PCR) может успешно использоваться как при обследовании пациентов в острой фазе заболевания, так и при тестировании образцов, характеризующихся низкими концентрациями патогенов (образцы окружающей среды, бессимптомные выделители). Правильная интерпретация результатов выявления вирусной РНК в образцах фекалий должна учитывать диапазоны естественной вариабельности ее концентрации у пациентов в острой фазе заболевания.

Цель и задачи. Определение значений параметров, характеризующих концентрации патогенов (пороговый цикл (Ct)), коррелирующих с клиническими проявлениями острой фазы вирусных гастроэнтеритов.

Материалы и методы. Обследованы группы пациентов со спорадической (n=2456) и групповой (n=497) заболеваемостью ОКИ, с применением наборов реагентов Амплисенс (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии», Россия) в формате real-time (ОТ)ПЦР на наличие Rotavirus grA, Norovirus GII, Astrovirus, Adenovirus grF, Shigella spp, EIEC, Salmonella spp, Campylobacter spp (термофильная группа). Анализировалось распределение Ct в зависимости от изолированного и сочетанного выявления патогенов в клинических образцах. Проводилась оценка влияния на значения Ct ингибиторов ПЦР, содержащихся в фекалиях, и применения различных амплификаторов: Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия), CFX 96 (Bio-Rad, США), «ДТ-96» («ДНК-технология», Россия).

Основные результаты. Выявлен асимметричный или бимодальный характер распределения значений Ct, связанный со случаями сочетанного выявления нескольких патогенов. Были установлены следующие показатели, характерные для пациентов с моноинфекциями (Ct mean±SD): Rotavirus grA (Ct 20,63±6,35 n=978); Norovirus GII (Ct 23,09±6.,4 n=794); Astrovirus (Ct 21,06±6,54, n=54); Adenovirus grF (Ct 8,42±2,4 n=42). Соответствующие значения для пострадавших при вспышках составили Norovirus GII (24,19±5,29 n=447), Rotavirus grA (18,65±4,16, n=50) [3].

Распределение значений Ct при тестировании внутреннего контрольного образца (ВКО), характеризующего влияние потенциальных ингибиторов ПЦР в клинических образцах, носило правильный характер. Среднее значение Ct составило 28,87±1,64 (ДТ-96 среднее значение ± стандартное отклонение, n=3570).

Доля ОКО в общем количестве образцов составила 7,69%. Процент ОКО, давших положительный результат при тестировании, составил для Rotavirus grA 0,37%, Norovirus GII – 0,13%, Astrovirus – 0,24% и Adenovirus grF – 0,5%. Средние значения Ct (ДТ-96 среднее значение ± стандартное отклонение) для данных образцов составили для Rotavirus grA – 30,2±2,4; Norovirus GII – 30,4±2,88, Astrovirus – 34,3±1,82 и для Adenovirus grF – 29,0 ±3,9.

Предполагаемое количество ложнопозитивных образцов оценивалось как произведение общего количества протестированных проб клинического материала на частоту (%) позитивных результатов тестирования ОКО на соответствующий патоген. Их предполагаемая доля от общего количества положительных образцов клинического материала составила для Rotavirus grA 2,5%, Norovirus GII – 2,0%, Astrovirus – 5,0% и Adenovirus grF – 14,0%.

Следует отметить, что реально возможная доля ложнопозитивных образцов в исследовании была многократно ниже в связи с обязательным повторным тестированием образцов с Ct >28 вне зависимости от наличия в панели образцов с высокой вирусной нагрузкой.

При оценке влияния используемых моделей амплификаторов на различия получаемых значений был выявлен сдвиг Ct по отношению к амплификатору «ДТ-96» («ДНК-технология», Россия) на амплификаторах Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия), CFX 96 (Bio-Rad, США) и iCycler iQ5 (Bio-Rad, США) по каналу FAM на +1,46±0.29; +2,98±0,44 и -3,08±0,34 и по каналу HEX на -1,34±0,46;

+1,1±0,60 и -1,23±0,93 соответственно (среднее значение ± стандартное отклонение (p=0,05, n=16)).

Заключение. Можно констатировать, что в качестве максимальных значений Ct, которые могут быть ассоциированы с острой фазой заболевания, можно рекомендовать следующие величины (ДТ-96, mean + 2SD, p=0,05): для ротавирусной инфекции – 27, норовирусной инфекции – 35, астровирусной инфекции – 34 и аденовирусной инфекции – 13 (с учетом отсутствия значений в медианной области, значение может быть увеличено до 20).

Список литературы

1. Corcoran M.S., van Well G.T., van Loo I.H. Diagnosis of viral gastroenteritis in children: interpretation of real-time PCR results and relation to clinical symptoms. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014 Oct; 33(10): 1663-73.

2. Elfving K. I., Andersson M., Msellem M.I., Welinder-Olsson C., Petzold M., Björkman A., Trollfors B., Mårtensson A., Lindh M. Real-time PCR threshold cycle cutoffs help to identify agents causing acute childhood diarrhea in Zanzibar. J Clin Microbiol. 2014 Mar; 52(3) :916-23. doi: 10.1128/JCM.02697-13. Epub 2014 Jan 8.

3. Интерпретация результатов детекции возбудителей вирусных диарей в режиме real-time. Подколзин А.Т., Гусева А.Н., Веселова О.А., Курочкина Д.Е., Шипулин Г.А. Клиническая лабораторная диагностика. 2015. Т. 60. № 6. С. 52-57.

РЕЗУЛЬТАТЫ МОНИТОРИНГА АНТИГЕННЫХ ТИПОВ РОТАВИРУСОВ ГРУППЫ А НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В ПЕРИОД 2011-2015 ГГ.

Зайцева Е.В., Ольнева Т.А., Кулешов К.В., Шипулин Г.А.

ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение. Ротавирусная инфекция является одной из приоритетных мишеней для применения средств специфической профилактики. Потенциальная эффективность применения живых ротавирусных вакцин, по традиционным представлениям, определяется в том числе и антигенным разнообразием циркулирующих ротавирусов.

Цель и задачи. Оценка стабильности популяции ротавирусов на протяжении нескольких эпидемических сезонов в предвакцинальный период.

Материалы и методы. Исследование проводилось на территориях 7 федеральных округов и 13 субъектов РФ (Московская, Ленинградская, Томская, Нижегородская, Иркутская, Свердловская, Новосибирская, Оренбургская области, Республика Дагестан, Красноярский, Хабаровский, Камчатский край, Ненецкий АО). Сбор образцов клинического материала проводился в период сезонного подъема заболеваемости РВИ, характерного для большей части регионов РФ (февраль – апрель) от детей в возрасте младше 5 лет, госпитализированных в отделения острых кишечных инфекций. [P]G генотипирование ротавирусов группы А проводилось с использованием ранее описанных методик [1, 2].

Основные результаты. За весь исследованный период времени наибольшую распространенность в Российской Федерации имели следующие генотипы: G4[P]8 – 47,8%; G1[P]8 – 22,9%; G3[P]8 – 8,2%; G9[P]8 – 7,2% и G2[P]4 – 7,0%. Распределение доминирующих генотипов ротавирусов по сезонам наблюдения представлено в таблице.

Доля случаев сочетанного выявления в клинических образцах ротавирусов различных генотипов составила для четырех исследованных сезонов соответственно 4,8%, 6,4%, 4,8% и 1,7%.

Таблица. Распределение доминирующих генотипов ротавирусов по сезонам наблюдения 2011-2015 гг.

Сезоны наблюдения	G1P[8]	G3P[8]	G4P[8]	G2P[4]	G9P[8]	Прочие	Mixt
сезон 2011-2012 (n=207)	26,6%	4,3%	50,2%	7,7%	4,3%	1,9%	4,8%
сезон 2012-2013 (n=266)	14,3%	23,7%	36,5%	7,9%	5,3%	6,0%	6,4%
сезон 2013-2014 (n=377)	27,3%	4,2%	43,8%	9,0%	10,1%	0,8%	4,8%
сезон 2014-2015 (n=294)	22,4%	2,0%	61,6%	3,1%	7,1%	2,0%	1,7%

Заключение. Полученные в работе результаты демонстрируют отличия в превалировании генотипов ротавирусов на территории РФ и в соседних государствах. По данным Европейской сети надзора за ротавирусами, в период 2011-2014 гг. в 14 странах Евросоюза, на территории которых проводился мониторинг антигенных типов ротавирусов, отмечалось доминирование G1P[8] генотипа, составлявшего 40-42% от всех выявленных изолятов [3] (EuroRotaNet: Annual report 2014). На территории Китая в 2012-2013 гг. отмечалось превалирование генотипа G9P[8], в более ранние периоды – G3P [4, 5]. Частота сочетанного выявления в образцах различных генотипов ротавирусов, создающая условия для реализации рекомбинационной и реассортационной изменчивости, может служить потенциальным критерием активности их эволюции на определенной территории. В период 2006-

2013 гг. для стран Евросоюза данный показатель суммарно составлял 7% [3]. В нашем исследовании для периода 2011-2015 гг. его величина составила 4,4% (50 из 1144 образцов) [6]. В целом полученные в предвакцинальный период результаты подтверждают естественный характер сезонно-географических изменений популяции ротавирусов и могут быть использованы для последующей оценки возможного влияния на нее масштабного применения ротавирусных вакцин.

Список литературы

1. Podkolzin A.T. et al. Hospital-Based Surveillance of Rotavirus and Other Viral Agents of Diarrhea in Children and Adults in Russia, 2005-2007. The Journal of Infectious Diseases. 2009. 200, S228-S233. http://dx.doi.org/10.1086/605054

2. Veselova O.A. et al. Rotavirus Group A Surveillance and Genotype Distribution in Russian Federation in Seasons 2012-2013 International Journal of Clinical Medicine, 2014, 5, 407-413.

3. EuroRotaNet: Annual report 2014.

4. Zhang J., Liu H., Jia L., Payne D.C., Hall A.J., Xu Z., Gao Z., Chang Z., Jiang B., Parashar U.D., Meng L., Yu H., Duan Z. Active, population-based surveillance for rotavirus gastroenteritis in Chinese children: Beijing Municipality and Gansu Province, China. Pediatr Infect Dis J. 2015 Jan; 34(1): 40-6. doi: 10.1097/INF.0000000000000505. Erratum in: Pediatr Infect Dis J. 2015 Oct; 34(10): 1137.

5. Liu N., Xu Z., Li D., Zhang Q., Wang H., Duan Z.J. Update on the disease burden and circulating strains of rotavirus in China: a systematic review and meta-analysis. Vaccine. 2014 Jul 31; 32(35): 4369-75. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.06.018. Epub 2014 Jun 20. Review.

6. Результаты мониторинга антигенных типов ротавирусов группы А на территории Российской Федерации в период 2011-2015 гг. Зайцева Е.В., Ольнева Т.А., Кулешов К.В. и др. Клиническая лабораторная диагностика № 7, с. 445-448.

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНОВ ИНГИБИТОРОВ ЛИЗОЦИМА КАК МАРКЕРОВ ПЕРСИСТЕНТНОГО ПОТЕНЦИАЛА ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ

Андрющенко С.В.

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия

Введение. В настоящее время у бактерий различных таксономических групп выявлены как специфические, так и неспецифические механизмы, обеспечивающие либо пассивную устойчивость к лизоциму, либо активное ингибирование его гидролитического эффекта. Антилизоцимная активность (АЛА), являясь одним из универсальных фенотипических маркеров персистентного профиля бактерий, отражает главным образом способность клетки к продукции экскретируемых соединений, обеспечивающих инактивацию лизоцима в питательной среде.

Вместе с тем рассматривается феномен лизоцимрезистентности штаммов-продуцентов, кодирующийся у энтеробактерий двумя семействами генов: ivyC (inhibitor of vertebrate lysozyme type C – ингибитор лизоцима позвоночных типа С) и pliC/mliC (periplasmic / membrane lysozyme inhibitor type C – периплазматический / мембраносвязанный ингибитор лизоцима типа С).

Известно, что продукт гена mliC является мембраносвязанным белком, тогда как белки PliC и IvyC описаны как имеющие периплазматическую локализацию. Несмотря на то, что не исключена возможность выхода молекул, обеспечивающих лизоцимрезистентность бактерий, за пределы наружной мембраны грамотрицательной клетки-продуцента, где их ингибирующий эффект и может быть выявлен в виде антилизоцимной активности, на данный момент аспект их дистантного действия не изучен.

Целью работы стало выявление генетических детерминант секретируемых ингибиторов лизоцима патогенных и условно-патогенных энтеробактерий и определение их взаимосвязи с антилизоцимным фенотипом.

Материалы и методы. 42 культуры негемолитических *E. coli*, 19 штаммов *K. pneumoniae*, изолированных из испражнений пациентов с I–II степенью дисбиоза кишечника, и 8 музейных культур *S. enterica* сероваров Enteritidis и Typhimurium, выделенных от больных острой кишечной инфекцией и реконвалесцентных сальмонеллезных бактерионосителей. Выделение матричной ДНК исследуемых штаммов для ПЦР проведено комплектом «ДНК-Экспресс» (НПФ «Литех», Россия). ПЦР-скрининг генов секретируемых ингибиторов лизоцима ivyC и pliC осуществлен на основе праймеров и реагентов ООО «Синтол». Детекция ампликонов производилась методом агарозного гель-электрофореза. Определение общей антилизоцимной активности (АЛА) осуществлялось чашечным методом по О.В. Бухарину (1999), секретируемого компонента АЛА – фотометрическим методом по скорости лизиса тест-штамма *M. luteus*.

Результаты. Скрининг наличия генов хромосомной локализации: ivyC у эшерихий и клебсиелл и pliC у сальмонелл – методом ПЦР показал их присутствие у всех исследованных культур. Поиск гомолога гена pliC, характерного для плазмиды вирулентности K. pneumoniae, выявил положительный результат в 19±5,5% случаев. Наиболее низкий уровень АЛА отмечался у носителей только гена ivyC и составлял в среднем 2,8±0,6 мкг/мл*ОП, тогда как у всех энтеробактерий, имеющих ген pliC, значения АЛА в среднем составляли 5±0,8 мкг/мл*ОП.

Заключение. Антилизоцимная активность энтеробактерий является частью общего механизма лизоцимрезистентности микроорганизмов и определяется наличием генов секретируемых ингибиторов лизоцима. Применение разработанной экспериментальной ПЦР-тест-системы позволило выявлять гены секретируемых ингибиторов лизоцима. Наиболее высокий уровень секреторной АЛА энтеробактерий сопряжен с наличием гена pliC плазмидной локализации, тогда как у носителей только гена ivyC выявлялись низкие значения признака.

СЕЗОННЫЕ И ТЕРРИТОРИАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ РОТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ В РФ В 2012-2015 ГГ.

Ольнева Т.А., Кулешов К.В., Подколзин А.Т., Шипулин Г.А.

ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение. Сезонность ротавирусной инфекции (РВИ) для территории Российской Федерации традиционно описывается как зимне-весенняя [1]. Данный тип сезонного распределения заболеваемости РВИ является характерным для регионов северного полушария, относящихся к умеренному климатическому поясу [2]. Однако территория РФ характеризуется широким разнообразием климатических условий, объединяя зоны холодного степного (BSk), субтропического (Cfa), континентального (Dfa, Dfb, Dfc, Dfd, Dwa, Dwb, Dwc) и полярного (ET) климата (по системе классификации Köppen–Geiger). Территории страны также различались по показателям среднего дохода на душу населения, рождаемости/доли детского населения и выраженности сезонной миграции.

Цель и задачи. Целью работы явилась оценка сезонности РВИ на различных территориях страны и оценка факторов, которые могли обуславливать ее территориальные различия.

Материалы и методы. Внутригодовое распределение случаев РВИ оценивалось по данным 60 ТУ Роспотребнадзора в субъектах РФ (от 55 до 60 ежегодно) с регистрацией не менее 300 случаев РВИ на протяжении года (2012-2015 гг. – 353843 случая РВИ). Выраженность сезонного подъема заболеваемости рассчитывалась как

$$s = \left(\frac{x_{max} - x_{avg}}{x_{avg}}\right) \times 100\%,$$

где x_{max} – пиковое месячное число и x_{avg} – среднее месячное число случаев РВИ, зарегистрированных за пятилетний период.

Результаты. Большая часть точек наблюдения (44 – 73%) располагалась в зонах континентального (Dfa и Dfb) климата, что обуславливало общую для страны картину сезонности с превышением средногодового уровня с января по май. Другие 16 точек наблюдения располагались в менее типичных для страны климатических зонах (3 – Dwc, 2 – Dfa и остальные в Dwa, Dwb, Dfd, Bsk зонах). В семи случаях – на границах двух климатических зон, в т.ч. в двух регионах (Республика Крым и Краснодарский край) с проживанием основной части населения на территориях с субтропическим климатом. Для данных территорий типичный для основной части страны зимне-весенний сезонный пик заболеваемости отсутствовал, но наблюдался летне-осенний сезонный подъем с пиком в августе. На граничащих с ними территориях – в Ростовской области и Ставропольском крае – наблюдались два сезонных пика, свойственных основной территории страны и соседним регионам с субтропическим климатом. Следует отметить, что курортные зоны Крыма и Краснодарского края, расположенные на черноморском побережье, испытывают высокую туристическую нагрузку в курортный сезон, с превышением численности оседлого населения в 2,41–2,68 раза, с пиковыми значениями туристического потока в июле-августе. Данный фактор, наряду с климатическими особенностями, может иметь ключевое значение для формирования специфики сезонности на данных территориях. Похожее расположение сезонного пика описано для некоторых государств Центральной Азии (Кыргызстана, Узбекистана) с пиковыми подъемами заболеваемости в октябре [3].

Колебания показателя сезонности для разных территорий составили от 32,6 до 153,1% (медиана 98%), количество новорожденных на 1000 – от 9,7 до 18,6 (медиана 12,9), средний доход на душу населения от 194760 до 756430 руб./год на человека.

Была выявлена умеренная прямая корреляция сезонности с рождаемостью (Spearman's correlation: $r = 0.46$, $p < 0.01$), корреляции с доходами на душу населения выявлено не было (Spearman's correlation: $r = -0.195$, $p < 0.14$).

Список литературы

1. Mirzayeva Radmila et al. Rotavirus burden among children in the newly independent states of the former Union of Soviet Socialist Republics: literature review and first-year results from the rotavirus surveillance network. The Journal of Infectious Diseases. 2009; 200: 203–14.

2. Cook S.M., Glass R.I., LeBaron C.W., Ho M.S. Global seasonality of rotavirus infections. Bull World Health Organ. 1990; 68: 171–177. PMID: 1694734

3. Semeiko G.V., Yermalovich M.A., Poliakova N., Mijatovic-Rustempasic S., Kerin T.K., Wasley A., Videbaek D., Gentsch J.R., Bowen M.D., Samoilovich E.O. Rotavirus genotypes in Belarus, 2008-2012. Infect Genet Evol. 2014; 28: 480-5. DOI: 10.1016/j.meegid.2014.09.007. PMID: 25218086

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ОСНОВНЫХ СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ *HELICOBACTER PYLORI*

Казакова Л.А.[1], Короткова А.Ф.[2], Валиулин И.Р.[2], Елекова Е.Ю.[1], Болтунова О.В.[1], Винчковская Е.Е.[1]

[1] ООО «Кабинет лабораторных исследований «Овум», Кемерово, Россия

[2] ЧУЗ «Поликлиника Овум», Кемерово, Россия. Директор ООО «Кабинет лабораторных исследований «ОВУМ» – к.м.н. Тимощук Г.И.

Helicobacter pylori колонизирует слизистую оболочку желудка и двенадцатиперстной кишки (ДПК), является основным этиологическим фактором хронического гастрита, приводит к развитию язвенной болезни желудка

и ДПК, вызывает атрофический гастрит, который в большинстве случаев приводит к раку желудка.

Диагностика инфекции *H. pylori* проводится с применением прямых и непрямых методов выявления возбудителя. Оптимальными для диагностики являются прямые методы.

На сегодняшний день наиболее надежным, позволяющим определять ДНК *H. pylori* в пробах биопсий желудка и ДПК, является метод ПЦР Real time. Преимуществами метода являются:

- высокая чувствительность, специфичность и универсальность,
- возможность количественного определения возбудителя инфекции,
- гарантированное отсутствие контаминации,
- автоматизация технологического процесса и стандартизация регистрации результатов,
- быстрота получения ответа.

Цель исследования. Сравнение частоты выявления инфицирования *H.pylori* методом ПЦР Real time из биоптатов слизистой желудка или ДПК с определением *H.pylori* в образцах кала и традиционным исследованием суммарных антител к *H. pylori* в крови методом ИФА.

Материалы и методы. Обследование было проведено у 65 человек с проявлениями диспепсии, из них женщин – 20, мужчин – 45, возраст обследованных – от 25 до 69 лет (средний возраст – 42 года).

Пациентам выполнялась ЭГДС (видеогастроскоп Olympus GIF-HI70), проводилось взятие биопсии из участка с максимальным поражением слизистой оболочки (отек, гиперемия, край эрозии или язвы) для проведения ПЦР на *H.pylori*.

Параллельно у всех пациентов проводилось взятие пробы кала для ПЦР на *H.pylori*. и взятие крови для исследования уровня антител методом ИФА – определялись суммарные антитела к антигену CagA *H.pylori*.

Для проведения исследования методом ПЦР Real time использовались тест-системы АО «Вектор-Бест», Новосибирск, Россия. Результаты реакции регистрировались на детектирующем амплификаторе «CFX 96» фирмы «Bio-Rad», США. ИФА-анализ был произведен тест-системами АО «Вектор-Бест», Новосибирск, Россия, на анализаторе «Lazurite» фирмы «Dynex Technologies, Inc.», США.

Результаты исследования. По данным ЭГДС выявлялись следующие патологические изменения или их сочетание: в 7,7% (5) выявлен поверхностный слабо выраженный гастрит, умеренный гастрит – в 53,8% (35), эрозии желудка – в 33,8% (22), язва желудка – в 1,5% (1), атрофический гастрит – в 15,4% (10), дуоденит – в 35,4% (23), эрозивный бульбит – в 20% (13), язва ДПК – в 3% (2).

Методом ПЦР в биоптатах ДНК *H. pylori* была выявлена у 93,8% (61) обследованных.

Методом ПЦР в образцах кала ДНК *H. pylori* была выявлена у 73,8% (48) обследованных.

Выявляемость ДНК *H. pylori* из образцов кала была на 20% ниже, чем из биопсийных образцов, что может быть объяснено потерей концентрации возбудителя при длительном пассаже по кишечнику, особенно в случаях малой обсемененности слизистой.

Методом ИФА суммарные антитела к CagA *H.pylori* выявлены в 78,5% (51) случаев.

Отмечается меньшая чувствительность ИФА-теста по сравнению с исследованием ПЦР из биоптатов на 15,3%, у 10 пациентов, положительных по ПЦР, не было выявлено антител, что может быть связано с ранними стадиями инфекции, невыраженным поражением слизистой, не приведшим к выработке антител, или особенностями иммунного ответа человека.

У всех пациентов с положительными результатами определения ДНК *H.pylori* в образцах кала и антител в крови в биоптатах была выявлена ДНК *H. pylori*.

У пациентов, при исследовании биоптатов которых отмечались отрицательные результаты на ДНК *H. pylori*, образцы кала и крови также показывали отрицательный результат, а по данным ЭГДС регистрировалась картина поверхностного слабо выраженного гастрита.

Выводы. Оптимальным для скрининга и диагностики инфицирования *H.pylori* является метод ПЦР Real time с использованием в качестве исследуемого материала биоптатов слизистой желудка или ДПК. При взятии материала со слизистой желудка или ДПК регистрировался максимальный (93,8%) процент положительных результатов определения *H.pylori*.

Врачебное решение о назначении эрадикационной терапии должно приниматься с учетом комплекса данных: состояния слизистой при проведении ЭГДС, наличия ДНК *H.pylori* в пробах биопсий желудка и ДПК.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИГЕНОВ НОРОВИРУСОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РФ

Сакалкина Е.В.[1], Паркина Н.В.[1], Ольнева Т.А.[1], Тагирова З.Г.[2], Шипулин Г.А.[1]

[1] ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, Москва, РФ

[2] ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный медицинский университет» МЗ РФ

Введение. Норовирусная инфекция является наиболее распространенным острым диарейным заболеванием среди лиц всех возрастов [1] (Mounts A.W. et al. 2000). Норовирусы как группа патогенов характеризуются высокой антигенной и генетической вариабельностью и более низкими (в сравнении с другими возбудителями вирусных гастроэнтеритов) среднеклиническими концентрациями в образцах фекалий [2]. Данные особенности объясняют трудности, возникающие при разработке и применении диагностикумов, детектирующих антигенные детерминанты норовирусов.

Цель и задачи. Целью данной работы явилось сравнение аналитических характеристик разрешенных к использованию на территории РФ в установленном по-

рядке наборов реагентов для выявления антигенов норовирусов в образцах фекалий.

Материалы и методы. Для сравнительного тестирования были взяты следующие наборы реагентов, разрешенных к использованию на территории РФ: RIDAQUICK® Norovirus test (R-Biopharm AG, Германия), RIDASCREEN® Norovirus test (R-Biopharm AG, Германия), Норовирус-антиген ИФА-БЕСТ (ЗАО «ВЕКТОР-БЕСТ», РФ). В качестве референтного метода в отношении норовирусов GII геногруппы использовался набор реагентов «АмплиСенс ОКИ скрин» № ФСР 2008/02265 от 17.11.11, для норовирусов GI геногруппы – методика, представленная в ISO/TS 15216-1:2013. В качестве подтверждения лабораторной методики использовалось секвенирование участка ORF 2 (для норовирусов II геногруппы 387 п.н.о., для норовирусов I геногруппы 392 п.н.о). Панель включала 90 клинических образцов фекалий, полученных от пациентов с групповыми случаями норовирусной инфекции, которые были зарегистрированы в период с 20.09.2012 по 22.06.2016 на различных территориях Российской Федерации, и 30 образцов от пациентов с ОКИ другой этиологии. В панели были представлены следующие генотипы/геноварианты норовирусов: GI.2, GI.3, GI.4, GI.6, GII.1, GII.2, GII.3, GII.4 (в т.ч. GII.4_New_Orlean_2009 и GII.4_Sydney_2012), GII.5, GII.6, GII.7, GII.10, GII.15 и GII.17. Среднеклинические концентрации норовирусов в представленной панели косвенно характеризовались следующими значениями пороговых циклов (Ct mean±SD) 24.9 ± 5.13, что соответствовало ранее полученным данным по распределению значений на более обширной выборке из 447 образцов – 24.2 ± 5.29 [2]

Основные результаты. Показатели диагностической чувствительности и специфичности составили для набора RIDASCREEN® Norovirus test 26,7% и 100%, для набора RIDAQUICK® Norovirus test 12,2% и 100% и для набора Норовирус-антиген ИФА-БЕСТ 17,8% и 73,3% соответственно.

Результаты тестирования панели с применением сравниваемых наборов реагентов представлены в таблице.

В наборах реагентов на основе ИФА не наблюдалось зависимости значений оптической плотности (ОП) от величины Ct (обратно пропорциональной концентрации патогенов). Значения ОП, полученной при использовании набора Норовирус-антиген ИФА-БЕСТ на референтно-отрицательных образцах, варьировали в широком диапазоне (0.262; 0.443; 0.490; 0.567, 0.811, 1.234, 1.280, 1.286), не располагаясь вблизи граничных значений положительного результата.

Таблица. Результаты тестирования панели клинических образцов с примененим сравниваемых наборов

	RIDASCREEN®		RIDAQUICK®		Норовирус-антиген ИФА-БЕСТ	
	положит.	отрицат.	положит.	отрицат.	положит.	отрицат.
Референтно позитивные (n=90)	24	66	11	79	16	74
Референтно негативные (n=30)	0	30	0	30	8	22

Заключение. В работах разных авторов приводятся данные по диагностической чувствительности тестируемых наборов, варьирующей в широком диапазоне. Для набора RIDASCREEN Norwalk-like virus EIA (R-Biopharm, Darmstadt, Germany) приводятся данные о диапазоне диагностической чувствительности от 36,0% до 68,3% [3, 4]. При относительно низкой диагностической чувствительности для большинства указанных наборов в сравнительных исследованиях подтверждается высокая диагностическая специфичность (85,7 – 100%). На этом фоне вполне закономерными звучат рекомендации по лабораторной диагностике норовирусной инфекции, представленные на сайте «Центра по контролю и профилактике заболеваний» (CDC – США): «…these kits (enzyme immunoassays) have poor sensitivity (50%) and are not recommended for diagnosing norovirus infection…» (данные тесты (иммуноферментные) имеют низкую чувствительность (50%) и не рекомендованы для диагностики норовирусной инфекции) [http://www.cdc.gov/norovirus/lab-testing/diagnostic.html]. Несмотря на вышеизложенное, необходимо признать, что низкозатратность и потенциальная возможность широкого использования наборов на основе ИФА и особенно ИХА делают их особо привлекательными для применения в клинической, а также в амбулаторной практике. Необходимо отметить, что на момент исследования стоимость зарубежного набора ИФА (RIDASCREEN) на порядок превышала стоимость отечественного набора (Норовирус-антиген ИФА-БЕСТ). Различия в диагностической чувствительности между ними были существенными (26,7 и 17,8%), но с данным фактом можно было бы мириться, с учетом их низкой себестоимости. Однако полученные данные о низкой диагностической специфичности отечественного набора (73,3%), при которой доля ложноположительных образцов (26,7%) оказалась выше доли правильно выявленных положительных образцов, (17,8%), делают его применение неприемлемым для практики. Остается выразить надежду на усовершенствование производителями отечественного теста, имеющего потенциально высокую востребованность на практике.

Список литературы

1. Mounts A.W., Ando T., Koopmans M., et al. Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses. *J Infect Dis.* 2000; 181(2): 284–7.

2. Практическая интерпретация результатов real-time детекции возбудителей вирусных диарей. Подколзин А.Т., Гусева А.Н., Веселова О.А., Курочкина Д.Е., Шипу-

лин Г.А. Клиническая лабораторная диагностика 2015. № 6. с. 52-57.

3. Castriciano S., Luinstra K., Petrich A., Smieja M., Lee C., Jang D., Portillo E., Chernesky M. Comparison of the RIDASCREEN norovirus enzyme immunoassay to IDEIA NLV GI/GII by testing stools also assayed by RT-PCR and electron microscopy. *J Virol Methods*. 2007 May; 141(2): 216-9.

4. Erwin B., Erwin D., Harry V., Marion P.G. Diagnosis of Norovirus outbreaks by commercial ELISA or RT-PCR. *Journal of Virological Methods.* 2006; 137: 259–264.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИГЕНОВ РОТАВИРУСОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РФ

Гусева А.Н., Веселова О.А., Курочкина Д.Е., Шипулин Г.А.

ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение. При отсутствии специфической профилактики ротавирусная инфекция (РВИ) является наиболее частой причиной требующих госпитализации диарей у детей первых лет жизни [1]. Широкая распространенность и выраженность клинических проявлений РВИ обуславливают высокую востребованность наборов реагентов для ее этиологической диагностики и потребность в их сравнительной характеристике [2, 3].

Цель и задачи. Целью работы явилось сравнение аналитических характеристик наиболее часто используемых на территории Российской Федерации наборов реагентов для выявления антигенов ротавирусов в образцах фекалий.

Материалы и методы. Проведены оценка и сравнение аналитических характеристик наборов реагентов для выявления антигенов ротавирусов SD BIOLINE Rotavirus (Standard Diagnostics, Корея), RIDA®Quick Rotavirus (R-Biopharm AG, Германия), RotaStick One-Step Test (Novamed Ltd, Израиль), QuickStripe™ Rotavirus (Savyon Diagnostics Ltd., Израиль), Ротавирус-антиген-ИФА-БЕСТ (ЗАО «ВЕКТОР-БЕСТ», РФ), Рота-антиген (ООО «Аквапаст», РФ) на панели, включавшей 84 положительных и 43 отрицательных по содержанию ротавирусов grA образца. В качестве методики сравнения использовался набор реагентов «Амплисенс ОКИ скрин-FL», с подтверждающим [P]G типированием положительных образцов [4, 5]. Концентрации РНК ротавирусов в тестируемой панели (Ct 21.05±5.70 n=84) достоверно не отличались от характерных для острой фазы РВИ (Ct 20.63±6.35 n=978) [6]. Аналитическая чувствительность наборов оценивалась на титровке клинического образца, содержащего Rotavirus grA [P]8G4 генотипа. Концентрация ротавируса в образце определялась с применением метода капельной цифровой ПЦР (Droplet Digital PCR (ddPCR)).

Основные результаты. Испытуемые наборы характеризовались следующими значениями диагностической специфичности (SPC), диагностической чувствительности (TPR), позитивного предсказательного значения (PPV) и негативного предсказательного значения (NPV):

SD BIOLINE Rotavirus: SPC – 100%, TPR – 84,52%, PPV – 100%, NPV – 76,79%;

RIDA®Quick Rotavirus: SPC – 100%, TPR – 84,52%, PPV – 100%, NPV – 76,79%;

RotaStick One-Step Test: SPC – 100%, TPR – 71,43%, PPV – 100%, NPV – 64,18%;

QuickStripe™ Rotavirus: SPC – 100%, TPR – 75,00%, PPV – 100%, NPV – 67,19%;

Ротавирус-антиген-ИФА-БЕСТ: SPC – 100%, TPR – 83,33%, PPV – 100%, NPV – 75,44%;

Рота-антиген (ООО Аквапаст, РФ). SPC-90,91%, TPR – 83,33%, PPV-94,59%, NPV – 74,07%.

При работе с инструкциями к наборам реагентов были выявлены следующие особенности.

В наборах RIDA®Quick Rotavirus (R-Biopharm AG, Германия) и QuickStripe™ Rotavirus (Savyon Diagnostics Ltd., Израиль) потребителю предоставляется англоязычная инструкция.

В англоязычной инструкции к набору RotaStick One-Step Test (Novamed Ltd, Израиль), представленной на сайте компании-производителя, заявленная область применения сформулирована как качественный скрининг образцов фекалий человека на наличие антигенов ротавируса («the qualitative screening of human fecal samples for detection of the presence of rotavirus antigen»). В инструкции, предоставляемой российскому потребителю, область применения очерчена шире: «для лабораторной диагностики заболеваний ротавирусной этиологии, осуществления эпидемиологического надзора за инфекцией и обнаружения антигенов ротавирусов в воде».

Заключение. Применение иммунохроматографических наборов реагентов характеризуется большой оперативностью и низкой трудозатратностью. Ложнопозитивные результаты исследований при их использовании в данном исследовании не отмечались. Наборы SD BIOLINE Rotavirus, RIDA®Quick Rotavirus показали идентичные результаты тестирования, совпадавшие в том числе и по дискордантным образцам.

При использовании ИФА-АГ наборов ложнопозитивные результаты исследований отмечались только при применении набора Рота-антиген, причем в значительном проценте случаев (4 из 43 отрицательных образцов), что соответствует более ранним наблюдениям (Подколзин А.Т. с соавт. 2005).

Распределение значений оптической плотности в иммуноферментных наборах существенно различалось. В диапазон значений 0,5–2,0 OD при использовании набора Рота-антиген попали 20 образцов, а при использовании набора Ротавирус-антиген-ИФА-БЕСТ – только 6. Отдельной характеристики заслуживают образцы, давшие ложнопозитивные результаты тестирования на наборе Рота-антиген. Если в двух из четырех образцов значения

OD были близки к критическому значению, то в двух других – приближались к 1,0 (максимально регистрируемое значение OD).

Следует отметить, что в рамках такой заявленной области применения набора реагентов RotaStick One-Step Test (Novamed Ltd, Израиль), как «осуществление эпидемиологического надзора и обнаружения ротавирусов в воде», при исследовании образцов от бессимптомных носителей и концентратов воды основная доля образцов характеризуется значительно более низким содержанием ротавирусов, со значениями Ct, превышающими 30 цикл. Потенциальная эффективность методов выявления антигенов ротавирусов в данных случаях будет крайне низкой, что не соответствует рекомендуемым областям применения набора.

Список литературы

1. Parashar U.D., Gibson C.J., Bresee J.S., Glass R.I. Rotavirus and severe childhood diarrhea. Emerg Infect Dis. 2006 Feb; 12(2): 304-6.

2. Gautam R.1., Lyde F., Esona M.D., Quaye O., Bowen M.D. Comparison of Premier™ Rotaclone®, ProSpecT™, and RIDASCREEN® rotavirus enzyme immunoassay kits for detection of rotavirus antigen in stool specimens. J Clin Virol. 2013 Sep; 58(1): 292-4.

3. Tate J.E., Mijatovic-Rustempasic S., Tam K.I., Lyde F.C., Payne D.C., Szilagyi P. et al. Comparison of 2 assays for diagnosing rotavirus and evaluating vaccine effectiveness in children with gastroenteritis. Emerg Infect Dis. 2013 Aug; 19(8): 1245-52.

4. Podkolzin A.T., Fenske E.B., Abramycheva N.Y., Shipulin G.A., Sagalova O.I., Mazepa V.N. et al. Hospital-based surveillance of rotavirus and other viral agents of diarrhea in children and adults in Russia, 2005-2007. J Infect Dis. 2009 Nov 1; 200 Suppl 1: S228-33.

5. Veselova O.A., Podkolzin A.T., Petukhov D.N., Kuleshov K.V., Shipulin G.A. Rotavirus Group A Surveillance and Genotype Distribution in Russian Federation in Seasons 2012-2013. International Journal of Clinical Medicine, 2014, 5, 407-413.

6. Практическая интерпретация результатов real-time детекции возбудителей вирусных диарей. Подколзин А.Т., Гусева А.Н., Веселова О.А., Курочкина Д.Е., Шипулин Г.А. Клиническая лабораторная диагностика 2015. № 6. С. 52-57.

ВЫЯВЛЕНИЕ ДНК ВИРУСОВ СЕМЕЙСТВА *HERPESVIRIDAE* У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ГАСТРИТОМ И КИШЕЧНОЙ МЕТАПЛАЗИЕЙ

Филиппова Ю.Н., Андреев А.А., Самусенко И.А., Михайлова И.А.

Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

Одной из актуальных проблем современной медицины является увеличение частоты заболеваний, обусловленных герпесвирусными инфекциями. Проникая в организм, вирус локализуется в клетках различной природы, где пожизненно персистирует, вызывая латентную, хроническую или медленную инфекцию. Особое значение имеет медленная инфекция, характеризующаяся взаимодействием вируса и макроорганизма с развитием патологического процесса, как правило, в одном органе или одной тканевой системе после многолетнего инкубационного периода. Показано, что примером такого взаимодействия является развитие гастродуоденальной патологии, ассоциированной с вирусами семейства *Herpesviridae*. Персистенция этих вирусов создает благоприятные условия для развития других патогенных микроорганизмов в слизистой оболочке желудка (СОЖ).

Цель исследования. Определить частоту встречаемости вирусов семейства *Herpesviridae* (HSV 1/2 типа, EBV, CMV, HHV6 типа) в слюне и биопсийном материале слизистой оболочки желудка (СОЖ), полученном в процессе эзофагогастродуоденоскопии (ЭГДС), у пациентов с хроническим HP-неассоциированным гастритом (ХГ) и кишечной метаплазией.

Материалы и методы. Проведено динамическое обследование 31 пациента (средний возраст 38,4 года) с диагнозом ХГ с кишечной метаплазией, верифицированным по совокупности клинических, лабораторных, инструментальных и гистологического методов исследования. Контрольную группу составили пациенты с HP-неассоциированным ХГ без кишечной метаплазии. Выявление ДНК вирусов герпеса (*HSV 1/2*, *EBV*, CMV, HHV 6) проводили методом ПЦР в режиме «реального времени» с использованием тест-систем «АмплиСенс *EBV/CMV/HHV6*-FL» и «АмплиСенс *HSV*-FL» (ЦНИИ эпидемиологии, Москва). Отсутствие H.Pylori подтверждено иммуноцитохимическим методом.

Результаты. При гистологическом исследовании с гистохимическим окрашиванием биоптатов на кишечную слизь в 23 случаях (74,2%) была выявлена очаговая неполная кишечная метаплазия, в 7 (22,6%) – сочетание полной и неполной кишечной метаплазии, в 5 (16,1%) – была диагностирована атрофия СОЖ. По данным обследования, у пациентов с ХГ с кишечной метаплазией в слюне ДНК вируса герпеса 6 типа (*HHV 6*) обнаружена в 47,8%, ДНК вируса Эпштейна – Барр (*EBV*) – 86,9%, ДНК цитомегаловируса (*CMV*) – 8,7% случаев. IgG в крови пациентов к данным вирусам определялись у 100% обследованных. В ходе анализа полученных данных было показано, что ДНК *EBV* и *HHV6* в слюне выявляется достоверно чаще у пациентов с ХГ с кишечной метаплазией по сравнению с контрольной группой (ДНК *HHV 6* – 15,7%, ДНК *EBV* – 23,5% ($p<0,05$)). Вирусные ДНК в биоптатах СОЖ при ХГ с кишечной метаплазией обнаружены в 78,2% случаев: *EBV* – 55,6%, *HSV1/2* – 5,6%, *HHV6* – 33,3%, *CMV* – 5,6%, сочетание двух инфекций – 27,8%, трех инфекций – 11,1%. При атрофическом гастрите и наличии кишечной метаплазии I и II типа преимущественно выявлялась ДНК *EBV* и *HHV6* типа.

Выводы. Выявление вирусов *Herpesviridae* (*HSV 1/2, EBV, CMV, HHV* 6 типа) в слюне и биопсийном материале слизистой оболочки желудка у пациентов с HP-неассоциированным ХГ могут свидетельствовать об участии этих вирусов в этиологии и патогенезе кишечной метаплазии слизистой оболочки желудка.

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ЭПИДЕМИОЛОГИИ ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ НА ОСНОВЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКОГО ИЗУЧЕНИЯ

Жалейко З.П., Резник В.И., Присяжнюк Е.Н., Лебедева Л.А., Савосина Л.В., Исаева Н.В., Харин В.Е.

ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Хабаровском крае», Хабаровск, Россия

Заболеваемость острыми кишечными инфекциями (ОКИ) в Хабаровском крае в последние годы регистрируется на высоких цифрах – от 527,70 на 100 тыс. населения в 2011 г. до 802,4 в 2016 г. Острые кишечные заболевания, вызванные кишечными вирусами, остаются весьма актуальной проблемой инфекционной патологии в крае. За последние годы доля ОКИ вирусной этиологии в структуре ОКИ установленной этиологии увеличилась с 77,5% в 2011 году до 89,8% в 2016 году, в то же время снизилась заболеваемость дизентерией, ОКИ бактериальной этиологии. Ежегодно отмечается высокая заболеваемость ОКИ, вызванными неустановленными возбудителями, которая составляет в структуре острых кишечных инфекций более 70%. Показатель заболеваемости ОКИ неустановленной этиологии в крае превышает показатель по РФ на 61,3%. В 2016 году ОКИ неустановленной этиологии в структуре прочих ОКИ составили 81,9%. Несмотря на высокие показатели заболеваемости прочими ОКИ, на вирусные инфекции обследуется лишь часть заболевших, в основном это дети, госпитализированные в инфекционные отделения г. Хабаровска и г. Комсомольска-на-Амуре. Расшифровка этиологии вспышек ОКИ очень важна для проведения адекватных противоэпидемических мероприятий и этиотропной терапии. С появлением диагностических тест-систем для определения РНК рота-, норо-, астровирусов стало возможным расширить этиологическую структуру острых кишечных заболеваний.

Цель исследования. Изучить частоту вирусной этиологии острых кишечных инфекций, возрастную, сезонную заболеваемость, характерную для каждого вида возбудителя. Сопоставить выявление вирусных агентов среди больных в очагах ОКИ. Оценить вирусную обсемененность сточных вод, воды открытых водоемов.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили фекалии от больных ОКИ. Пробы воды концентрировались методом мембранной фильтрации. Сточные воды обрабатывались методом мембранной фильтрации. Исследования были проведены методом ОТ-ПЦР с использованием диагностической тест-системы «АмплиСенс Rotavirus/Norovirus/Astrovirus-FL» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора № ФСР 2008/02268). Для проведения ПЦР использовали амплификатор «Rotor-Gene 6000».

Результаты. Проведен анализ диагностических исследований острых кишечных заболеваний (ОКЗ) в Хабаровском крае в 2015-2016 гг. В течение этих двух лет было обследовано 969 и 888 больных ОКЗ соответственно. В 2015 г. ротавирусные РНК были выявлены в 34,8% случаев, а в 2016 г. процент оказался несколько выше и составил 42,0% случаев. Анализ возрастной структуры показал, что ротавирусы чаще всего выявлялись у детей до 2-летнего возраста, как в 2015 г. (54,2%), так и в 2016 г. (55,7%). У детей в возрасте 3-6 лет ротавирусная РНК выявлялась реже – 29,7% (2015 г.), 31,5% (2016 г.). В старших возрастных группах (до 15 лет) процент положительных находок уменьшился до 16,7%. Норовирусная этиология ОКЗ выявлена во всех возрастных группах. У детей от 0 до 1 года выявлено 11,6% в 2015 г., 16,7% в 2016 г. положительных находок; 1-2 лет – 14,6% и 29,5%; 3-6 лет – 28,9% и 32,4%; 7-14 лет – 45,3% и 20,7%; 15 лет и старше – 40,0% и 23,8% соответственно. Норовирусная инфекция преобладала в 2015 г. в возрастных группах 7-14 лет и 15 лет и старше в связи со вспышками. Астровирусы были определены в 1,4% случаев обследованных больных в 2015 г. и в 1,1% в 2016 г. Выявить преобладание этих возбудителей в какой-либо возрастной группе не удается.

Сезонность циркуляции вирусных возбудителей ОКИ имеет ряд особенностей. Так, циркуляция ротавирусов отличается выраженной зимне-весенней сезонностью. Подъем заболеваемости приходится на вторую половину зимы – с января и весной до мая включительно. В этот период в 2015 г. ежемесячно диагностировались от 63,2% до 24,2% случаев ротавирусной этиологии от общего числа ежемесячно обследованных больных. Пик пришелся на март – 73,0%. В 2016 г. в аналогичный период времени диагностировалось от 58,1% до 28,5% случаев, наибольшее количество положительных находок было в феврале – 68,2%. Норовирусы, по нашим материалам, циркулируют в течение всего года, в пределах 17,3% и 26,3% в январе – апреле и 23,2% и 18,3% в сентябре – декабре. В летний период, май – август, выявлялось 40,2% и 36,2% случаев норовирусных заболеваний. Астровирусы также циркулируют в течение всего года, но на более низком уровне инфицированности. Наши исследования не выявили статистически значимой сезонной зависимости при спорадических случаях ОКИ.

В 2015-2016 гг. был проведен анализ длительности вирусовыделения у больных рота- и норовирусной инфекциями по нахождению РНК. Ротавирусы выделяются в большинстве случаев в первые 5 дней заболевания – 77,2% (2015 г.), 70,5% (2016 г.). Во вторую пятидневку – в 11,2% (2015 г.), 19,1% (2016 г.), а после 11-го дня болезни в пределах 10,4-11,5%. Норовирусы выделялись в первые 5 дней заболевания в 55,7% случаев в 2015 г. и в 46,6% случаев в 2016 г. В сроки 6-10 дней – в 24,2% случаев (2015 г.) и в 27,3% (2016 г.). Больше 11 дней от начала заболевания – в 20,0% (2015 г.), в 26,5% (2016 г.). Существенным моментом при норовирусной инфекции является значительно более активное вирусовыделение возбудителя в период после 11 дня болезни. Наиболее длительный период выделения норовирусов из проб фекалий пришелся на 28-33 день от начала болезни.

В течение двух лет было проведено исследование клинического материала из очагов групповых заболеваний ОКИ. В 2015 г. на территории Хабаровского края, в семи административных поселениях, зарегистрировано 15 эпидвспышек ОКЗ. Материал поступал от больных ОКЗ из организованных детских коллективов и при груп-

повых заболеваниях. Во всех случаях лабораторно установлена вирусная этиология заболеваний. Ротавирусная этиология выявлена в 10 вспышках, норовирусная – в 4, смешанная рота- и норовирусная в 1 случае. Наиболее крупная вспышка зарегистрирована в мае-июне 2015 г. в пос. Многовершинный Николаевского р-на – в числе 80 заболевших, из них 33 ребенка. При исследовании материала от 33 заболевших у 31 была выделена РНК норовирусов. Среди 68 контактных норовирусная РНК выявлена у 38 человек и в 2 случаях выявлена ротавирусная РНК. При исследовании 11 проб воды в одной пробе также выявлено ротавирусное загрязнение. Впоследствии материал от этих пациентов был передан в Референс-центр по мониторингу за возбудителями ОКИ (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, г. Москва) для субвидового типирования патогенов. Из заключения, присланного из Референс-центра, следует, что заболеваемость была вызвана генотипом GII.17. Идентичные изоляты были выделены при вспышке в провинции Гуандун (ноябрь 2014 г.), а также в п. Заветы Ильича Советско-Гаванского района Хабаровского края (март – апрель 2015 г.). В 2016 г. на территории Хабаровского края была зарегистрирована 21 эпидвспышка ОКЗ. В 20 случаях лабораторно подтверждена вирусная этиология заболеваний. Ротавирусная этиология выявлена в 11 вспышках, норовирусная – в 6, смешанная рота- и норовирусная в 3 случаях.

Для оценки обсемененности водных объектов кишечными вирусами в течение 2015-2016 гг. были проведены санитарно-вирусологические исследования проб сточной воды и воды открытых водоемов. При исследовании 104 проб сточной воды в 2015 г. в Хабаровском крае были обнаружены все три вида изучаемых вирусов. Ротавирусные РНК найдены в 64,4%, норовирусные – в 61,5%, астровирусные – в 43,0%. В 2016 г. наибольшее количество положительных находок пришлось на норовирус: из 149 исследованных проб они составили 51,6%. Ротавирусные РНК выявлены в 36,3%, астровирусные – в 21,4%. В воде открытых водоемов Хабаровского края (р. Амур и р. Уссури) из 335 исследованных проб в 2015 г. РНК ротавирусов определялись в 10 случаях, норовирусов – в 1 случае, астровирусов – в 2 случаях. В 2016 г. было исследовано 472 пробы воды открытых водоемов, РНК ротавирусов определены в 22 случаях, норовирусов – в 7 случаях, астровирусов – в 2 случаях.

Таким образом, использование метода ОТ-ПЦР для диагностики и выявления возбудителей во внешней среде позволяет решать различные аспекты эпиднадзора за острыми кишечными инфекциями.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА СМЕШАННЫХ И СОЧЕТАННЫХ ФОРМ РЕСПИРАТОРНЫХ И КИШЕЧНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ У ДЕТЕЙ

Петруша О.А.[1], Мескина Е.Р.[2], Ушакова А.[2], Целипанова Е.[2], Медведева Е.[2], Ергучева И.Д.[1], Файзулоев Е.Б.[1], Зверев В.В.[1], Никонова А.А.[1]

[1] ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова», Москва, Россия
[2] ГБУЗ МО «МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского», Москва, Россия

Введение. Острые респираторные и кишечные вирусные инфекции (ОРВИ, ОКИ) представляют серьезную медико-социальную проблему и являются одной из основных причин обращений за медицинской помощью, особенно в детском возрасте. Несмотря на большой прогресс в изучении ОКИ и ОРВИ, достигнутый за последние десятилетия, существует множество нерешенных проблем. Особый интерес представляют смешанные инфекции, когда два и более вирусов поражают респираторный или желудочно-кишечный тракт, сочетанные инфекции, развивающиеся при одновременном инфицировании различными респираторными и кишечными вирусами, а также формы инфекционных заболеваний с различной локализацией места репродукции одного и того же вируса.

В связи с этим **целью** работы является проведение клинико-эпидемиологической характеристики сочетанных и смешанных респираторных и кишечных вирусных инфекций у детей, госпитализированных в стационар с симптомами ОКИ и/или ОРВИ.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили назальные мазки, сыворотки крови и образцы фекалий от 81 ребенка (от 2 месяцев до 17 лет), госпитализированного в ГБУЗ «ДГКБ Святого Владимира» ДЗМ (г. Москва) с симптомами ОРВИ (N=30), ОКИ (N=28) и сочетанием симптомов ОКИ/ОРВИ (N=23) в период с сентября 2015 по сентябрь 2016 года. Образцы собирали в день госпитализации.

Для выявления в назальных мазках нуклеиновых кислот вирусов гриппа А и В (ВГА и ВГВ), вирусов парагриппа 1-4 типов (ВПГ1-4), аденовирусов (АДВ), респираторно-синцитиального вируса (РСВ), риновирусов (РВ), энтеровирусов (ЭВ), коронавирусов (КВ) и бокавирусов (БВ) использовали набор реагентов «ОРВИ-Монитор». Фекальные образцы анализировали на наличие нуклеиновых кислот АДВ, ЭВ, ротавирусов А (РВА), норовирусов (НВ) и астровирусов (АВ) набором реагентов «ОКИ-Монитор» «Стандарт». Оба набора реагентов разработаны в ФГБНУ «НИИВС им И.И. Мечникова» и основаны на мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

Образцы сывороток (N=25) анализировали только у тех пациентов, в фекалиях или назальных мазках которых были обнаружены нуклеиновые кислоты вирусов в высокой концентрации (значение порогового цикла в ПЦР-РВ не более 25).

Результаты. По результатам исследования нуклеиновые кислоты разных вирусов были обнаружены в клинических образцах 53 пациентов (65,4%), у 13 из них (16% от общего числа пациентов) было выявлено более одного вируса (таблица 1).

В группе ОРВИ (N=30) вирусные нуклеиновые кис-

лоты были выявлены в 16 (53%) назальных мазках и 5 (17%) фекальных образцах. В мазках были выявлены: РВ – в 17% случаев, БВ – 13%, ВПГ1, АДВ и КВ – по 10%, ВГА – 7%, ВПГ3 – 3%. Также в мазках было выявлено пять случаев микст-инфекций (17%), в том числе сочетание РВ и КВ, ВГА с ВПГ3, а также в трех наблюдениях сочетание АДВ с РВ, БВ и КВ. В фекалиях пациентов с ОРВИ АВ был обнаружен в 7% случаев; РВА, ЭВ и АДВ – по 3%. Также встречались случаи сочетанных инфекций, а именно: АВ был детектирован в фекалиях, а ВПГ1 в назальных мазках; АДВ – в фекалиях, КВ – в мазке; РВА – в фекалиях, АДВ и БВ – в назальном мазке.

В группе ОКИ (N=28) вирусные нуклеиновые кислоты были выявлены в 20 (71%) фекальных образцах и 3 (11%) назальных мазках. В фекальных образцах чаще всего выявлялись НВ (36%) и РВА (29%); в 7% были детектированы АДВ, а в 4% ЭВ. Микст-инфекции обнаружены в двух фекальных образцах: в одном случае НВ сочеталася с ЭВ, в другом – РВА с АДВ. В назальных мазках были обнаружены АДВ (7%) и ВПГ3 (4%). В одном наблюдении регистрировалась сочетанная инфекция: ВПГ3 – в назальном мазке, НВ – в фекалиях. И у одного ребенка АДВ был обнаружен и в фекалиях, и в мазке из носа.

В группе ОКИ/ОРВИ (N=23) положительными оказались 12 (52%) фекальных образцов и 5 (22%) назальных мазков. В фекалиях в 26% случаев был обнаружен РВА, в 17% – НВ, а в 9% – АДВ. В 9% мазков был выявлен РВ, по 4% приходилось на КВ, АДВ и ВПГ3. У одного пациента с положительным по РВА фекальным образцом в назальном мазке детектировали АДВ.

Таблица 1. Доля (%) различных респираторных и кишечных вирусов в этиологической структуре ОКИ и ОРВИ (по результатам ПЦР-РВ)

Симптомы	Образец	Количество образцов	Количество положительных образцов	Положительные образцы	ВГА	ВПГ1	ВПГ3	АДВ	РВ	ЭВ	КВ	БВ	РВА	НВ	АВ	Микст
				Доля от общего количества образцов в группе, %												
ОКИ	Фекалии	28	20	71	0	0	0	7	0	4	0	0	**29**	**36**	0	7
	Назальный мазок	28	3	11	0	0	4	**7**	0	0	0	0	0	0	0	0
ОРВИ	Фекалии	30	5	17	0	0	0	3	0	3	0	0	3	0	7	0
	Назальный мазок	30	16	53	7	10	3	10	**17**	0	10	13	0	0	0	17
ОКИ + ОРВИ	Фекалии	23	12	52	0	0	0	9	0	0	0	0	**26**	17	0	0
	Назальный мазок	23	5	22	0	0	4	4	**9**	0	4	0	0	0	0	0

Положительными оказалось 4 образца сывороток: 2 РВА, 1 НВ (у пациентов с диагнозом ОКИ) и 1 БВ (у пациента с диагнозом ОРВИ). Выявление вирусов в сыворотке было ассоциировано с выявлением тех же вирусов в назальных мазках или образцах стула.

Заключение. В ходе проведенных исследований было установлено, что самыми распространенными патогенами в группе ОРВИ являются БВ и РВ в назальных мазках, в фекалиях – АВ; в группе ОКИ – НВ и РВА в фекалиях и АДВ в мазках; в группе с симптомами ОКИ/ОРВИ – НВ и РВА в фекалиях и РВ в назальных мазках. Микст-инфекции одного локуса регистрировались в группе ОРВИ у 17% пациентов, в группе ОКИ – у 4% и не встречались в группе ОКИ/ОРВИ ($p>0.05$). Оказалось, что у детей с клиническими симптомами сочетанного поражения респираторного и кишечного трактов возбудители вирусных инфекций в назальных мазках и фекалиях одновременно обнаруживались не чаще (4%), чем у детей только с ОРВИ (10%) или ОКИ (4%). Лишь у одного пациента (из группы ОКИ) в фекалиях и мазке из носа был выявлен АДВ. В назальных мазках ни у одного пациента из общего числа обследованных не был обнаружен РВА.

КОНСТЕЛЛЯЦИИ ГЕНОВ VP7, VP4, VP6 И NSP4 В НИЖЕГОРОДСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ РОТАВИРУСОВ ГРУППЫ А

Сашина Т.А., Морозова О.В., Епифанова Н.В., Зверев В.В., Новикова Н.А.

ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия
ФГБОУ «ННГУ им. Н.И. Лобачевского», Нижний Новгород, Россия

Введение. Ротавирусы (род *Rotavirus*, сем. *Reoviridae*), являющиеся ведущей причиной острого гастроэнтерита у детей младше пяти лет во всем мире, характеризуются экстраординарным генетическим разнообразием. На основе бинарной классификации выделены 27 G (VP7) и 37 P (VP4) генотипов ротавируса, кроме того, разработана полногеномная классификация, учитывающая генотипы всех 11 сегментов генома. В Российской Федерации наиболее распространены ротавирусы человека пяти генотипов (G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] и G9P[8]), однако сведения о генотипах других сегментов генома и внутригенотиповом разнообразии ротавирусов недостаточны. Эти знания необходимы для оценки влияния вакцинации на популяцию ротавируса в России.

Цель работы. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов ротавируса А, циркулировавшего в Нижнем Новгороде в сезон 2015-2016 гг.

Задачи. Методом ПЦР определить G- и P-генотипы ротавирусов и их долевое распределение; установить нуклеотидные последовательности генов VP7, VP4, VP6 и NSP4 ротавирусов разных G- и P-генотипов; определить I- и E-генотипы ротавирусов на основе полученных нуклеотидных последовательностей генов VP6 и NSP4; провести филогенетический анализ нижегородских штаммов и оценить их внутритиповое разнообразие.

Материалы и методы. В работе использовали ротавирус-содержащие образцы фекалий детей, госпитализированных с ОКИ. Определение G- и P-генотипа проводили методом мультиплексной ПЦР в собственной модификации. Секвенирование кДНК фрагментов генов VP7, VP4, VP6 и ОРС гена NSP4 ротавирусов осуществляли по двум цепям с использованием набора реагентов Beckman Coulter GenomeLabTM DTCS-Quick Start Kit на приборе Beckman Coulter CEQTM 8000 (Beckman Coulter, США). Генотипирование штаммов на основе полученных нуклеотидных последовательностей проводили с помощью сервиса RotaC 2.0. Филогенетические деревья с использованием 282 нуклеотидных последовательностей строили в программах BEAST 1.8., TreeAnnotator 1.8 и FigTree 1.4. Принадлежность к филогенетическим линиям и сублиниям внутри разных генотипов определяли согласно [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7].

Основные результаты. G- и P-генотип установлен в 405 изолятах ротавируса. Идентифицированы шесть G-генотипов (G1, G2, G3, G4, G6 и G9) и три P-генотипа (P[4], P[8] и P[9]), которые были представлены семью комбинациями: G9P[8] (44,4%), G4P[8] (27,9%), G1P[8] (14,3%), G2P[4], G1P[9], G3P[9] и G6P[9] (в сумме 6,7%). Доля GxP[8] составила 6,7%. Методом секвенирования генов VP6 и NSP4 при анализе выборки из 15 нижегородских ротавирусов определены два I-генотипа (I1 и I2) и три E-генотипа (E1, E2 и E3). Показаны шесть сочетаний генотипов: G1, G4, G9-P[8]-I1-E1, G2-P[4]-I2-E2 и G3, G6-P[9]-I2-E3.

VP7 является основным структурным компонентом наружного капсида вириона. С использованием 17 нуклеотидных последовательностей гена VP7 нижегородских штаммов было построено филогенетическое дерево. На основе расположения референтных последовательностей внутри каждого G-генотипа были выделены кластеры, соответствующие общепринятым линиям и сублиниям. У ротавирусов генотипов G1 и G2 показана вариабельность гена VP7, определившая в каждом случае их принадлежность к двум сублиниям (G1-IA, G1-IIC и G2-a1, G2-a3). Ротавирусы генотипов G3, G4, G6 и G9 принадлежали к одной внутритиповой сублинии (G3-3e, G4-IC, G6-I и G9-IIId). Таким образом, в нижегородской популяции было выявлено восемь аллелей гена VP7.

Домен VP8* белка VP4 формирует головку шипа наружного капсида вириона. Филогенетический анализ на основе нуклеотидных последовательностей фрагмента VP8* гена VP4 10 изолятов ротавируса показал наличие разных аллелей гена у штаммов генотипов P[4] и P[8], которые относились к двум сублиниям внутри каждого генотипа (P[4]-IVa, P[4]-IVb и P[8]-3.1, P[8]-3.6). Ротавирусы генотипа P[9] разных G-типов принадлежали одному кластеру на филогенетическом дереве. Таким образом, в нижегородской популяции было выявлено пять вариантов гена VP4.

VP6 представляет собой единственный структурный элемент внутреннего капсида ротавириона. По результатам филогенетического анализа на основе 15 нуклеотидных последовательностей гена VP6 нижегородских изолятов РВ выявлена вариабельность внутри генотипа I2, проявившаяся в принадлежности к двум сублиниям (I2-IV и I2-VII), в то время как все штаммы ротавируса генотипа I1 относились к одной сублинии I1-1. Таким образом, в нижегородской популяции идентифицированы три сублинии гена VP6.

Анализ гена NSP4, кодирующего ротавирусный энтеротоксин, 13 нижегородских ротавирусов показал наличие представителей двух сублиний генотипа E2 (E2-X и E2-XII). Штаммы генотипа E1 принадлежали одной сублинии (E1-I), ротавирусы генотипа E3 сформировали на филогенетическом дереве отдельный кластер. Таким образом, было выявлено четыре варианта гена NSP4.

Заключение. В сезон 2015-2016 гг. в нижегородской популяции ротавируса А человека были идентифицированы 8 вариантов со следующими сочетаниями генов: G1-IA/P[8]-3.1/I1-I/E1-I, G1-IIC/P[8]-3.1/I1-I/E1-I, G4-IC/P[8]-3.6/I1-I/E1-I, G9-IIId/P[8]-3.6/I1-I/E1-I, G2-a3/P[4]-IVb/I2-VII/E2-XII, G2-a1/P[4]-IVa/I2-VII/E2-X, G3-3e/P[9]/I2-IV/E3, G6-I/P[9]/I2-IV/E3. Доминировал вариант G9-IIId/P[8]-3.6/

I1-I/E1-I. Полученные результаты являются базой для мониторинга перестроек в генетической структуре популяции ротавируса А человека в Нижнем Новгороде и могут быть использованы для сравнительного анализа с ротавирусами, выделенными на других территориях.

Список используемой литературы

1. Bok K., Matson D.O., Gomez J.A. Genetic variation of capsid protein VP7 in genotype G4 human rotavirus strains: simultaneous emergence and spread of different lineages in Argentina // J. Clin. Microbiol. – 2002. – Vol. 40. – P. 2016–2022.

2. Giammanco G.M., Bonura F., Zeller M. et al. Evolution of DS-1-like human G2P[4] rotaviruses assessed by complete genome analyses // J. Gen. Virol. – 2014. – Vol. 95, Pt. 1. – P. 91–109.

3. Ianiro G., Delogu R., Fiore L. et al. Genetic variability of VP7, VP4, VP6 and NSP4 genes of common human G1P[8] rotavirus strains circulating in Italy between 2010 and 2014 // Virus Res. – 2016. – Vol. 220. – P. 117–128.

4. Phan T.G., Okitsu S., Maneekarn N., Ushijima H. Genetic heterogeneity, evolution and recombination in emerging G9 rotaviruses // Infect. Genet. Evol. – 2007. – Vol. 7, № 5. – P. 656–663.

5. Phan T.G., Khamrin P., Quang T.D. et al. Detection and genetic characterization of group A rotavirus strains circulating among children with acute gastroenteritis in Japan // J. Virol. – 2007. – Vol. 81, № 9. – P. 4645–4653.

6. Da Silva M.F., Gomez M.M., Rose T.L. et al. VP8*P[8] lineages of group A rotaviruses circulating over 20 years in Brazil: proposal of six different sub-lineages for P[8]-3 clade // Infect. Genet. Evol. – 2013. – Vol. 16. – P. 200–205.

7. Wang Y.H., Pang B.B., Ghosh S. et al. Molecular epidemiology and genetic evolution of the whole genome of G3P[8] human rotavirus in Wuhan, China, from 2000 through 2013 // PLoS One. – 2014. – Vol. 9, № 3. – P. e88850.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ШТАММОВ ДИАРЕЕГЕННЫХ *E.COLI*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ ЛЕЧЕБНЫХ УЧРЕЖДЕНИЙ И ДЕКРЕТИРОВАННОГО КОНТИНГЕНТА НА ТЕРРИТОРИИ СВЕРДЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Есаулкова А.Ю., Дурасова А.Л., Егорова Е.А.

ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Свердловской области», Екатеринбург, Россия

Введение. Заболеваемость ОКИ, обусловленных *E.coli*, в 2015 году по Свердловской области составила 21,31 на 100 тыс. населения, среднемноголетний уровень – 22,54 на 100 тыс. населения. По международной классификации диареегенные кишечные палочки разделены на шесть основных типов: ЭТКП, ЭИКП, ЭПКП, ЭГКП, ЭАггКП, ДАКП.

Общеизвестен факт неоднородности по генам вирулентности диареегенных *E.coli*, принадлежащих к одной серогруппе, диктующий необходимость дифференциального подхода в лечении эшерихиозов, различающихся патогенетически, клинически, эпидемиологически. Однако в рутинной лабораторной практике микробиологическая диагностика эшерихиозов базируется на классическом бактериологическом анализе с изучением биохимических свойств возбудителя и его антигенной структуры, на основании чего определяется принадлежность штамма к той или иной патогруппе.

Между тем прямыми критериями отнесения *E.coli* к патогенетическим группам являются ключевые факторы вирулентности: ЕНЕС – продукция шигаподобных токсинов (веротоксинов) 1 и/или 2 типа в сочетании с наличием интимина (eae-ген) или без него; ETEC – продукция термостабильного (ST) или термолабильного (LT) токсинов; EPEC – наличие так называемого A/E (attaching and effacing) эффекта, обеспечиваемого интимином (eae-ген) при отсутствии генов шигаподобных токсинов; EIEC – наличие плазмидных генов факторов вирулентности (inv, ipa и др.); EAgEC – наличие плазмидных генов факторов вирулентности aggR, aspU.

С учетом высокой частоты обмена генетической информацией среди микроорганизмов и приобретения ими новых детерминант вирулентности или потери таковых, формирования клонов с новыми свойствами и их распространения среди популяции применение молекулярно-биологических методов становится необходимым для адекватной диагностики эшерихиозов. Генетическая характеристика выделяемых штаммов *E.coli* на территории РФ изучается недостаточно, соответственно, высока вероятность гипердиагностики и, как следствие, искажения статистических данных о заболеваемости эшерихиозами.

Цель исследования. Анализ генетической гетерогенности по факторам вирулентности штаммов *E. coli*, выделенных из биологического материала от здоровых и больных людей на территории Свердловской области.

Материалы и методы. Объектом исследования послужили 198 штаммов *E. coli*, выделенных из биологического материала в ходе профосмотра декретированных контингентов – 123 (62,1%), диагностики ОКИ – 66 (33,4%) и обследования контактных с больными ОКИ лиц – 9 (4,5%) в период 2013-2015 гг. на территории Свердловской области. Спектр культур был представлен 13 серологическими вариантами, из которых группа *O144* составила 58,6%; *O26:K60* – 19,7%; *O157* и *O111:K58* по 4,6%; *O126:K71*, *O18:K77* и *O408* – по 2,1%; на долю оставшихся 6 вариантов приходилось 1,5% и менее. В когорте декретированных лиц исследовались в 86,6% *E. coli O144*, на долю других вариантов приходилось по 2-3% и менее. От заболевших 58,7% составили *E. coli O26:K60*, второе и третье места по удельному весу заняли *E. coli O157* и *O111:K58* – 15,9% и 11,1% соответственно. Выделение штаммов и их серотипирование проводились общепринятыми методами бактериологическими лабораториями филиалов ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Свердловской области» и медицинских организаций г. Каменск-Уральского.

На плотных питательных средах выделенные культуры доставлялись во ФБУЗ «Центр гигиены и эпи-

демиологии в Свердловской области» для генетического типирования. В ходе работы использовался набор реагентов для выявления и дифференциации ДНК диареегенных *E. coli* в объектах окружающей среды и клиническом материале методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® Эшерихиозы-FI», вариант FEP/FRT. Для проведения ПЦР со специфическими праймерами, фланкирующими фрагменты генов вирулентности, использовали культуральную взвесь штаммов в физрастворе. Экстракция ДНК проводилась в присутствии внутреннего контрольного образца, который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. Пробы выделенной ДНК использовались для амплификации. Присутствие в составе реакционной смеси флуоресцентно-меченых олигонуклеотидных зондов, гибридизующихся с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, определяло нарастание интенсивности флуоресценции. Накопление специфического продукта амплификации регистрировалось путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с использованием амплификатора Rotor-Gene 6000. Учет результатов тестирования исследуемых образцов проводился в соответствии с инструкцией к набору реагентов. Пробы, в которых определялось значение Ct, не превышающее пороговый цикл, считались положительными.

Результаты. В ходе исследования из 198 штаммов *E. coli* только 62 содержали генетические детерминанты факторов вирулентности, что составило 31,3%. По удельному весу на первом месте ранжировались энтеропатогенные культуры (58,1%), на втором месте – представители генетических микстов по энтеропатогенным и энтерогеморрагическим факторам (29,7%), 6,5% – доля энтероаггрегативных эшерихий.

Распределение штаммов в ходе генетического анализа факторов вирулентности по патогенетическим группам представлено в таблице.

Серогруппы *E.coli*	Изучено культур	Патогенетические группы						Всего культур с генами вирулентности	%
		EP	EP+ EH	EP+ Eagg	EI	EH	EAgg		
O144	116	17	1		1		3	22	19
O157	9	1	1			1		3	33
O111 K58	9	2	1					3	33
O26 K60	39	13	15	2				30	77
O126K71	4	1						1	25
O18acK77	4	2					1	3	75
Прочие	15							0	0
Итого:	198	36	18	2	1	1	4	62	31,3

Среди лиц, проходивших профосмотр, вирулентные культуры *E. coli* выявлялись в 17,1% (21 штамм), у контактных вирулентные штаммы не обнаруживались. От больных вирулентные штаммы определены в 62,1% (41 штамм). В структуре вирулентных штаммов, выделенных от больных, преобладала серогруппа *E. coli O26:K60* (64,4%), причем 51,7% из них генетически комбинированные по энтеропатогенным и энтерогеморрагическим факторам, а 3,4% – по энтеропатогенным и энтероаггрегативным.

Заключение. Отнесение выделенных изолятов *E.coli* к той или иной патогенетической группе только на основании их серопринадлежности не всегда правомерно из-за отсутствия безусловной корреляции между антигенной характеристикой штаммов и наличием в них факторов вирулентности. Современные популяции *E. coli* зачастую лишены генов энтеропатогенности и не могут квалифицироваться как возбудители ОКИ без генетической идентификации. В 37,9% культур *E.coli*, выделенных от больных с клиническими проявлениями ОКИ, не детектированы генетические компоненты вирулентности.

Учитывая высокую себестоимость и низкую диагностическую значимость серологической идентификации изолятов *E. coli* при установлении этиологии ОКИ, необходимо вводить в комплекс рутинных лабораторных исследований генетическую идентификацию эшерихий наряду или вместо изучения их антигенной характеристики.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В ЭПИДНАДЗОРЕ ЗА ЭНТЕРОВИРУСНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ В ХАБАРОВСКОМ КРАЕ

Резник В.И., Савосина Л.В., Лебедева Л.А., Жалейко З.П.

ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Хабаровском крае», г. Хабаровск, Россия

Введение. Энтеровирусные инфекции на протяжении многих десятилетий ежегодно регистрируются на территории Хабаровского края. Интенсивность заболеваемости резко различается по годам, но не было ни одного эпидсезона, свободного от энтеровирусных инфекций. В это же время в соседнем Приморском крае

показатели заболеваемости значительно ниже, а крупные вспышки энтеровирусной этиологии регистрируются значительно реже, чем в Хабаровском крае. В рамках эпиднадзора по программе ликвидации полиомиелита возрастает необходимость детального наблюдения за этиологией различных клинических форм заболеваний с подозрением на энтеровирусную природу. В применении к Хабаровскому краю актуальной является система выявления циркуляции *энтеровирусов* во внешней среде, в частности в водоемах. Это особенно значимо в связи с наличием в крае трансграничных рек – Амура и Уссури, на противоположных берегах которых проживает большое количество населения, где энтеровирусные инфекции регистрируются постоянно.

Задачи исследования. Изучить особенности циркуляции энтеровирусов как среди человеческой популяции, так и во внешней среде, в частности в водоемах и питьевой воде. Проведена расшифровка заболеваний с подозрением на энтеровирусную этиологию в 2016 году, в период крупной вспышки этих инфекций. Установлена интенсивность циркуляции *энтеровирусов* на территории края. Использование высокочувствительного метода полимеразно-цепной реакции (ПЦР) позволило выявить РНК *энтеровирусов* в пробах воды для оценки роли водного фактора в эпидпроцессе.

Материалы и методы. Для выявления РНК *энтеровирусов* методом ПЦР использовали наборы реагентов и тест-системы производства ООО «ИнтерЛабСервис», Россия. Выделение РНК осуществляли, используя наборы «АмплиПрайм РИБО-преп», «АмплиПрайм РИБО-сорб», «МАГНО-сорб». Амплификацию проводили с помощью тест-систем «АмплиСенс® Enterovirus-FL», вариант FRT, на приборах Rotor-Gene-6000.

Пробы клинического материала обрабатывались согласно МУ 3.1.1.2363-08. «Эпидемиологический надзор и профилактика энтеровирусной (неполио) инфекции». Исследовались фекальные пробы, носоглоточные мазки и пробы ликвора. Концентрацию вирусов из проб воды проводили методом фильтрации с использованием фильтрующих мембран марки ММПА.М+-0,20 производства ООО НПП «Технофильтр», Россия.

Результаты и обсуждение. В 2016 году в Хабаровском крае в летне-осенний период (с 30 мая по 23 октября) по первичным диагнозам был зарегистрирован 2231 случай энтеровирусных инфекций, в том числе 649 случаев серозно-вирусного менингита (СВМ). На территории края заболевания выявлены в 11 городах и районах из 15 муниципальных образований. Материал для исследования был собран в 9 территориальных субъектах – всего от 1452 заболевших. Методом ПЦР выявлена РНК *энтеровирусов* у 787 заболевших – 54,9%. В каждой территории диагностировано от 25,0% до 100,0% обследованных. Наибольшее число обследованных пришлось на два крупных города края – г. Хабаровск – 953 случая и 51,6% положительных случаев и г. Комсомольск-на-Амуре – 241 обследованный и 53,6% положительных. Среди видов проб клинического материала наибольшее число пришлось на носоглоточные мазки – 780 проб, из которых в 53,2% была выявлена РНК *энтеровирусов*. Фекальные пробы в количестве 632 были положительны по ПЦР в 59,0% случаев. Из 200 проб ликвора РНК *энтеровирусов* была выделена в 59 (29,5%). Всего из 1412 исследованных проб в 844 (52,9%) установлена РНК *энтеровирусов*. Все положительные пробы были посеяны на культуры клеток (RD, Hep-2, L-20B) и в 54,3% были изолированы *энтеровирусы*, в том числе из группы ECHO 54 штамма, *Коксаки А* – 183 штамма, *Коксаки В* – 231 штамм. Структура серотипов в различных территориях была неоднородна, однако анализ этого не входит в задачи данного сообщения. Методом ПЦР было исследовано 165 проб сточной воды – в 56,4% случаев установлено наличие РНК *энтеровирусов*, причем вирусологически (при изоляции на культуре клеток) преобладали вирусы *Коксаки В* тех же серотипов, что чаще всего выделены из клинических проб. Из 508 проб воды открытых водоемов в 28 случаях выявлены РНК энтеровирусов (5,5%), вирусологически в двух случаях изолированы вирусы *Коксаки В*.

Заключение. Таким образом, метод ПЦР позволил установить энтеровирусную этиологию у более чем половины заболевших. Показано частое обнаружение РНК *энтеровирусов* в носоглоточных пробах, что коррелирует с клиникой болезни – у подавляющего числа этих больных выставлен диагноз «Герпетическая ангина». Наличие в воде открытых водоемов в 5,5% проб РНК *энтеровирусов* является серьезным аргументом в пользу влияния водного фактора в эпидпроцессе на территории Хабаровского края.

ДИАГНОСТИКА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОКИ МЕТОДОМ ПЦР У ПАЦИЕНТОВ ИНФЕКЦИОННЫХ ОТДЕЛЕНИЙ МАУ «ГКБ № 40» Г. ЕКАТЕРИНБУРГА В 2016 Г.

Цыганко Е.В., Трусова И.В.

МАУ «ГКБ № 40», г. Екатеринбург, Россия

Введение. Острые кишечные инфекции (ОКИ) представляют собой серьезную проблему для здравоохранения в России и во всем мире. С каждым годом растет число случаев диареи вирусной этиологии, диагностика которых традиционными бактериологическими методами неэффективна [1]. Кроме того, прием антибиотиков до проведения анализа зачастую препятствует микробиологическому обнаружению бактериальных патогенов. В связи с этими причинами необходимо широкое введение в практику новых методов диагностики возбудителей ОКИ, одним из самых эффективных в ряду которых является ПЦР.

Цель и задачи. Изучить методом ПЦР этиологическую структуру острых кишечных инфекций у лиц, госпитализированных в МАУ «ГКБ № 40» в 2016 г. Для этого:

- оценить вклад различных возбудителей в заболеваемость у пациентов детских и взрослых инфекционных отделений;

- проанализировать причины спорадической и вспышечной заболеваемости;

- выявить случаи коинфекции (более одного возбудителя в одной пробе).

Материалы и методы. За период с января по декабрь 2016 г. в лаборатории ПЦР-диагностики МАУ «ГКБ № 40» г. Екатеринбурга было исследовано 1405 образцов кала и промывных вод желудка от пациентов из Екатеринбурга и Свердловской области, поступивших в инфекционные отделения стационара больницы с диагнозом «острый гастроэнтерит», «острый гастроэнтероколит», «острая кишечная инфекция». Детей до 14 лет среди них было 100 чел. (7,1%). Исследование в ПЦР назначалось врачом, исходя из клинической картины и тяжести заболевания. Пробы биоматериала доставлялись в лабораторию в стерильных флаконах в течение 1-2 суток после взятия. Выделение ДНК/РНК проводилось вручную набором «Рибо-преп» («АмплиПрайм», Москва) согласно методике производителя или на автоматической станции «NucliSENS® easyMAG®» (bioMérieux). Выделенные ДНК/РНК исследовались на возбудители ОКИ согласно назначениям врачей наборами реагентов «АмплиСенс® ОКИ-скрин-FL», «АмплиСенс® Rotavirus/Norovirus/Astrovirus-FL», «АмплиСенс® Yersinia enterocolitica/pseudotuberculosis-FL», «АмплиСенс® Эшерихиозы-FL» (все наборы – производства ЦНИИЭ, Москва). Обратную транскрипцию и ПЦР проводили на амплификаторе для ПЦР «в реальном времени» Rotor-Gene Q (QIAGEN).

Основные результаты. Данные по выявленным в 2016 г. возбудителям приведены в таблице 1.

Таблица 1

	Salmonella spp	***Shigella spp+EIEC***	***Campylobacter spp***	***Rotavirus гр. A***	***Adenovirus гр. F***	***Astrovirus***	***Norovirus 2-го генотипа***	**Диарогенные *E. coli***	***Y. enterocolitica***
Дети до 14 лет	1,4%	0%	1,4%	43,2%	2,7%	5,4%	33,8%	12,2%	0%
Старше 14 лет	13,4%	7,6%	14,3%	15,7%	1%	2,4%	44,1%	0,9%	0,7%
Всего	**12,1%**	**6,8%**	**13%**	**18.3%**	**1,2%**	**2,7%**	**43,2%**	**1,9%**	**0,6%**

В работу не были включены результаты исследования образцов на *Cl. difficile*, т.к. выявление этой бактерии методом ПЦР было прекращено в июне 2016 г. Из таблицы видно, что за исследуемый период почти в 2/3 случаев ОКИ возбудителем являлись вирусные агенты (65,4%). Наиболее часто встречающимися бактериальными возбудителями были *Campylobacter spp.* (13% всех проб).

В группе пациентов до 14 лет вирусные возбудители составляли 85,1%, с преобладанием ротавирусов (43,2%), что согласуется с литературными данными [1, 2]. Среди бактериальных возбудителей преобладали диарогенные *E. coli* (83,3% всех положительных находок). Диарогенные кишечные палочки дважды были обнаружены у детей до двухлетнего возраста в сочетании двух типов: *EHEC+EPEC* и *EAgEC+EPEC*. Подобные же случаи были зафиксированы и в 2015 г.: *EAgEC+EIEC* и *EHEC+EPEC*, причем в последнем случае пациентку спасти не удалось. Энтеротоксигенные *E. coli* не выявлялись ни разу с момента внедрения методики в нашей лаборатории.

У лиц старше 14 лет также преобладали кишечные вирусы (63,2%), но доминирующими уже стали норовирусы 2-го генотипа (44,1%). Суммарная доля традиционно выявляемых бактериологическими методами возбудителей (сальмонеллы, шигеллы, кишечные палочки) не превышала 21%, чем объясняется относительно низкая эффективность этого вида диагностики ОКИ.

В 2016 году наша лаборатория принимала участие в расшифровке шести вспышек ОКИ в Екатеринбурге: в апреле произошли 2 вспышки норовирусной инфекции (в кафе – 7 человек, в учебном заведении – 2 человека), в июле случаи заражения сальмонеллезом (кафе – 5 человек), в сентябре снова норовирусная инфекция (в вузе – 17 человек), в ноябре – вспышка дизентерии Флекснера (в вузе – 14 человек), в декабре – норовирусная инфекция (в вузе – 5 человек). Следует подчеркнуть, что исключение этих проб из общей статистики принципиально не меняло картины распределения возбудителей. Таким образом, не только спорадическая, но и вспышечная заболеваемость в Екатеринбурге, по нашим данным, в основном определялась кишечными вирусами (65,5%).

За 2016 г. выявлено 19 случаев коинфекции (более 1 возбудителя у одного пациента), 2 из них – у детей (вирус-вирусные ассоциации). У взрослых встречались как сочетания двух бактериальных агентов (2 случая), так и вирус-вирусные (6 проб) и бактериально-вирусные (9 проб) ассоциации. У одной беременной было выявлено одновременно 4 возбудителя (Shigella spp+EIEC, Campylobacter spp, Astrovirus, Norovirus). Вообще, вероятно, такие ассоциации встречаются весьма редко.

Заключение. В 2016 году в г. Екатеринбурге у пациентов с ОКИ преобладали вирусные возбудители (65,4%), причем у пациентов детских отделений доминировали ротавирусы (43,2% всех проб), а у взрослых – норовирусы 2-го генотипа (44,1%). Суммарная доля всех бактериальных возбудителей не превышала 34,4%, чаще всего из бактерий выявлялись *Campylobacter spp.* (13% всех проб). В нашей лаборатории в 2016 г. обследовались пациенты из шести вспышек ОКИ, 4 из которых были вызваны норовирусами 2-го генотипа, одна – сальмонеллами и одна – шигеллами. Рассмотрение данных только по спорадической заболеваемости ОКИ не меняло общей картины распределения возбудителей, приведенной в таб. 1. В 2016 г. нами было обнаружено 19 (1,4%) образцов кала, в которых выявлялись более одного возбудителя ОКИ, у

детей это были вирус-вирусные ассоциации, а у взрослых встречались все варианты (бактерия-бактерия, бактерия-вирус, вирус-вирус). Максимальное число возбудителей, обнаруженных нами в одном образце, – 4.

Список используемой литературы

1. Клинико-эпидемиологическая характеристика вирусных диарей у детей / Лукьянова А.М. и др. // Журнал инфектологии, 2014. Том 6. № 1. С. 60-66.

2. Изучение этиологии острых кишечных инфекций у детей, госпитализированных в инфекционные отделения стационаров Москвы / Подколзин А.Т. и др. // Инфекционные болезни, 2004. Том 2. № 4. С. 85-91.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТИПИРОВАНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ В СТАВРОПОЛЬСКОМ КРАЕ В 2016 Г.

Чекрыгина Е.В.[1], Волынкина А.С.[2], Котенев Е.С.[2], Васильева О.В.[2], Лисицкая Я.В.[2], Савельев В.Н.[2]

[1] ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» МЗ РФ, г. Ставрополь, Россия
[2] ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Введение. Качественное проведение эпидемиологического мониторинга за возбудителями инфекционных болезней, прогнозирование возможных осложнений эпидемиологической обстановки невозможны без эффективной системы идентификации штаммов патогенов. В последние годы широкое практическое применение для субвидовой характеристики микроорганизмов получили методы молекулярно-генетического анализа, обладающие большей дифференцирующей способностью по сравнению с фенотипическими методами типирования. Использование методов генетической идентификации возбудителей для эпидемиологического анализа ограничено рядом условий, в т.ч. наличием в открытом доступе баз данных, содержащих, наряду со сведениями о мировом генетическом разнообразии возбудителей, информацию о генетических особенностях штаммов, циркулирующих в исследуемом регионе. Создание баз данных генотипов региональных штаммов и осуществление генетического мониторинга популяций возбудителей актуально в первую очередь для патогенов, способных вызывать тяжелые формы заболеваний (возбудители особо опасных и природно-очаговых инфекций) и приводить к массовым вспышкам инфекционных болезней (возбудители острых кишечных и респираторных инфекций).

Важное значение для Ставропольского края в эпидемическом плане имеют острые кишечные инфекции (ОКИ), в 2015 г. интенсивный показатель заболеваемости бактериальной дизентерией составил 9,03, сальмонеллезом – 20,07, ОКИ бактериальной и вирусной природы установленной этиологии – 101,2, ОКИ неустановленной этиологии – 479,8, регистрировалась заболеваемость энтеровирусной инфекцией (ИП – 2,01), вирусным гепатитом А (ИП – 1,07).

Цель работы. Проведение субвидового генетического типирования изолятов ОКИ бактериальной и вирусной этиологии, накопление данных о генетических особенностях возбудителей ОКИ в Ставропольском крае.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили образцы суспензии фекалий от больных кишечными инфекциями в Ставропольском крае, положительные на наличие РНК возбудителей ОКИ вирусной этиологии, собранные в период с июля по октябрь 2016 г., штаммы *Salmonella enterica* (серотип *Enteritidis*) и *Shigella sonnei*, выделенные из клинического материала в указанный период.

Генетическое типирование штаммов *Salmonella enterica* (серотип *Enteritidis*) осуществляли методом MLVA по 5 локусам [1]. Размер амплифицированных локусов определяли методом электрофореза в 3% агарозном геле, с последующим точным определением размера различающихся по длине аллелей методом капиллярного секвенирования. Индивидуальный MLVA генотип штамма определяли на основании числа тандемных повторов в локусах: *SENTR7- SENTR5- SENTR6- SENTR4- SE3.*

Генетическое типирование штаммов *Shigella sonnei* проводили методом MLST [2]. Биоинформационный анализ результатов осуществляли с использованием базы данных E.coli MLST, доступной на сайте http://mlst.ucc.ie. Генетическую идентификацию изолятов РНК ротавирусов выполняли методом G[P] типирования на основе прямого секвенирования фрагментов генов VP7 и VP4 [3]. Субвидовую характеристику изолятов РНК норовирусов 2-го генотипа проводили методом секвенирования фрагментов генов полимеразы и нуклеокапсида вируса [4, 5]. Генотипирование изолятов РНК энтеровирусов осуществляли методом прямого секвенирования участков гена VP1 [6].

Основные результаты. Проведено MLVA-типирование 36 штаммов *Salmonella enterica*, серотипа *Enteritidis,* выделенных от больных ОКИ в Ставропольском крае в 2016 г. Исследуемые штаммы *Salmonella Enteritidis* отличались высокой генетической гетерогенностью и относились к 11 MVLA-генотипам. Преобладали штаммы с MLVA-генотипами 3-10-5-4-1 (9 штаммов, 25%), 3-9-5-4-1 (9 штаммов, 25%) и 3-11-5-4-1 (6 штаммов, 16,7%). Также выявлены MLVA-генотипы: 2-10-7-3-2 (3 штамма), 2-10-14-6-1 и 3-11-5-3-1 (по 2 штамма), 3-10-5-5-1, 3-10-6-3-1, 3-12-5-3-1, 3-13-5-4-1 и 3-7-5-4-1 (по 1 штамму).

Выполнено MLST-типирование 4 штаммов *Shigella sonnei.* Определена нуклеотидная последовательность фрагментов семи хромосомных генов: *adk, fumC, gyrB, icd, mdh, purA, recA*. В результате анализа установлено, что все анализируемые штаммы обладали одинаковым сиквенс-типом – ST-152 (*adk* – 11, *fumC* – 63, *icd* – 7, *mdh* – 14, *purA* – 7, *recA* – 7) – одним из наиболее распространенных генотипов шигелл.

Проведена генетическая идентификация изолятов РНК ротавирусов (16 образцов), энтеровирусов (3 образца) и норовирусов (2 образца), выявленных в образцах клинического материала. Исследуемые изоляты ротави-

русов принадлежали к 3 генотипам: G4[P8] – 11 образцов, G2[P4] – 3 образца, G9[P8] – 2 образца. Выявлено 2 генотипа норовирусов: GII.Pe – GII.4 Sydney_2012 и GII.P16 – GII.4 Sydney_2012. Исследуемые изоляты энтеровирусов относились к 2 генотипам: Echovirus 5 (2 образца) и Echovirus 3 (1 образец).

Выводы. В результате исследования изучена генетическая гетерогенность возбудителей ОКИ бактериальной и вирусной этиологии, циркулировавших в Ставропольском крае в 2016 г. Продолжение начатых исследований позволит уточнить характеристику фоновых генетических вариантов возбудителей ОКИ на этой территории, оценить стабильность популяций циркулирующих возбудителей.

Список используемой литературы

1. Hopkins K.L., Peters T.M., de Pinna E., Wain J. Standardisation of multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) for subtyping of Salmonella enterica serovar Enteritidis. Euro Surveill. 2011; 16(32): pii=19942.

2. Wirth T., Falush D., Lan R., et al. Sex and virulence in Escherichia coli: an evolutionary perspective. Molecular Microbiology. 2006; 60(5): 1136-1151.

3. Manual of rotavirus detection and characterization methods. WHO/IVB/08.17.

4. Gonin P., Couillard M., d'Halewyn M.A. Genetic diversity and molecular Epidemiology of Norwalk-like viruses. J Infect Dis. 2000 Sep; 182(3): 691-7.

5. Vinje J., Hamidjaja R.A., Sobsey M.D. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. J Virol Methods. 2004 Mar 15; 116(2): 109-17.

6. Nix W.A., Oberste M.S., Pallansch M.A. Sensitive, Seminested PCR Amplification of VP1 Sequences for Direct Identification of All Enterovirus Serotypes from Original Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006; 44(8): 2698-2704.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ В СТРУКТУРЕ ОПЕРАТИВНОГО ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ НАСЕЛЕНИЯ САЛЬМОНЕЛЛЕЗОМ

Шубин Ф.Н., Раков А.В., Кузнецова Н.А.

НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, Владивосток, Россия

Повышение эффективности эпидемиологического надзора является одной из насущных проблем современной эпидемиологии. В настоящее время в систему эпидемиологического надзора активно внедряются методы молекулярно-генетического типирования сальмонелл, основанные на анализе хромосомных маркеров сальмонелл. К сожалению, данные методы находят применение, прежде всего, при анализе групповой заболеваемости, когда необходимо установление эпидемиологической связи между источником инфекции и заболевшими людьми. При анализе спорадической заболеваемости, где в процессе мониторинга необходимо осуществлять динамическую оценку состояния популяции возбудителя сальмонеллеза в регионе и, соответственно, изучение значительного числа изолированных из различных источников штаммов микроба, эти методы вследствие их трудоемкости не находят широкого применения. Кроме того, применение молекулярно-генетических методов типирования сальмонелл в системе эпидемиологического надзора при сальмонеллезе имеет эффект лишь в случае его использования на стадии оперативного (текущего) эпидемиологического анализа заболеваемости, когда необходимо принимать управленческие решения.

Определены следующие основные задачи прикладных эпидемиологических молекулярно-генетических исследований: анализ генетической гетерогенности популяции сальмонелл у больных и оценка эпидемической значимости отдельных генотипов микроба в формировании заболеваемости; создание базы данных генотипов сальмонелл, циркулирующих на местных предприятиях животноводства; дифференцирование местной и завозной заболеваемости населения; молекулярно-генетический мониторинг спорадической и групповой заболеваемости населения.

Для внутривидового типирования сальмонелл нами использован плазмидный анализ, а основные наблюдения выполнены на примере *Salmonella* Enteritidis. Данный метод характеризуется хорошей воспроизводимостью результатов и высокой дифференцирующей способностью, вследствие присутствия более чем у 70% штаммов *Salmonella* Enteritidis 7 типов низкомолекулярных плазмид (Шубин Ф.Н. и др., 2006), а плазмида p1,4 идентична в штаммах микроба, изолированных у больных в Чехии и в Сибирско-Дальневосточном регионе России (Раков А.В. и др., 2013).

Цель данного исследования состоит в анализе возможностей, которые могут быть достигнуты на пути повышения эффективности эпидемиологического надзора за сальмонеллезом, при условии внедрения молекулярно-генетического типирования сальмонелл на стадии оперативного (текущего) эпидемиологического анализа заболеваемости населения.

Материалы и методы. В процессе централизованного микробиологического мониторинга за сальмонеллами в Приморском крае в 2004-2013 гг. изучена плазмидная характеристика штаммов *Salmonella* Enteritidis, изолированных от 7615 больных, что составило 92,3% от всех больных с бакподтвержденным диагнозом сальмонеллеза. Кроме того, изучены 108 штаммов *Salmonella* Enteritidis, изолированных из продукции местных предприятий промышленного птицеводства. В работе использован мониторинг за сальмонеллами, основанный на данных плазмидного анализа. Исследование плазмид выполнено по методу Kado и Liu (1981).

Основные результаты. Мониторинг за *Salmonella* Enteritidis в Приморском крае показал, что популяция микроба на протяжении всех 10 лет наблюдений оказа-

лась гетерогенной по плазмидным характеристикам и у большинства больных (более 80%) была представлена десятью основными плазмидными типами микроба. Значимость плазмидных типов *Salmonella* Enteritidis в формировании заболеваемости варьировала, но среди них доминирующее значение имели три типа микроба: 38 MDa, 38:1,4 MDa и 38:4.4 MDa, значимость которых в формировании ежегодной заболеваемости также различалась. Анализ штаммов микроба, выделенных из продукции местных яичной и бройлерной птицефабрик, показал, что эти плазмидные типы являются местными для края: среди кур яичной птицефабрики циркулируют штаммы плазмидных типов 38 MDa и 38:4,4 MDa, а бройлерной птицефабрики – 38:1,4 MDa. Штаммы остальных семи типов микроба признаны завозными для края, поскольку они не выделены из местной продукции.

Изучение динамики многолетней заболеваемости населения сальмонеллезом, вызванным каждым из местных плазмидных типов микроба, показало, что она носит типоспецифический характер. Заболеваемость населения, связанная с продукцией бройлерной птицефабрики и обусловленная плазмидным типом 38:1,4 MDa, характеризовалась ежегодным ее подъемом. За время наблюдения она возросла с показателя 2,9 на 100 тыс. населения в 2004 г. до 28,9 в 2013 г. Напротив, для местных типов микроба 38 MDa и 38:4,4 MDa, связанных с яичной птицефабрикой, были характерны не совпадающие по времени и по длительности периоды сниженной заболеваемости (для 38MDa – 2004-2006, 2008, 2009, 2012, 2013 гг., для 38:4.4 MDa – 2004-2011 гг.), когда среднегодовой показатель составлял соответственно 5,6 и 5,84 на 100 тыс. населения, и периоды резких подъемов (для 38 MDa – 2012, 2013 гг., для 38:4,4 MDa – 2007, 2010, 2011 гг.), когда средний показатель достигал соответственно 19,8 и 12,0.

Внедрение молекулярно-генетического мониторинга в процесс оперативного эпидемиологического анализа позволило раскрыть динамику ежемесячной заболеваемости и причину ее подъемов. Установлено, что подъем заболеваемости населения в 2007 г., обусловленный плазмидным типом *Salmonella* Enteritidis 38:4,4 MDa, был связан с обострением сальмонеллезного эпизоотического процесса среди ограниченной группы кур, и прекращение заболеваемости было достигнуто сразу после забоя кур. Напротив, в 2010 г. имело место обострение эпизоотического процесса среди кур на отдельных блоках птицефабрики, и прекращение заболеваемости было достигнуто выполнением ветеринарных мероприятий. Главное, что основанием для выполнения мероприятий явилось состояние заболеваемости населения, контролируемое посредством оперативного её анализа с включением генотипирования выделенных от больных штаммов микроба. Соответственно, ежемесячный эпидемиологический анализ заболеваемости населения явился показателем состояния эпизоотического процесса на местной птицефабрике. При этом ветеринарный производственный контроль не выявил изменений в состоянии эпизоотического процесса среди кур на предприятии.

Этот же методический приём оказался эффективным для создания базы данных о генотипах микроба, циркулирующего на местных предприятиях животноводства, для мониторинга групповой заболеваемости и для эпидемиологической диагностики завозной заболеваемости, но в этом случае лучший эффект достигается при подекадном её анализе.

Заключение. Таким образом, высокая дифференцирующая способность плазмидного анализа и хорошая воспроизводимость результатов типирования обеспечивают достаточный уровень генотипирования *Salmonella Enteritidis* для решения прикладных эпидемиологических задач в структуре эпидемиологического надзора.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ (ПЦР) ПРИ РАСШИФРОВКЕ ГРУППОВЫХ ВСПЫШЕК КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ В САО ГОРОДА МОСКВЫ

Бурханов Р.А., Черкасова Л.В., Пчелкина Е.В., Темирлиева Р.О., Блинникова А.Ю., Пасашкова Ю.А., Островская Н.А.

Филиал ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Москве» в САО города Москвы, Москва, Россия

Введение. Кишечные инфекции создают постоянную эпидемиологическую напряженность, поскольку для их предупреждения не применяется плановая специфическая вакцинопрофилактика. В этой связи своевременное выявление источников инфекции с помощью лабораторных методов является важнейшим звеном профилактических мероприятий. Среди лабораторных тестов ПЦР занимает особое место, так как обладает наилучшими аналитическими характеристиками чувствительности и специфичности. Кроме того, ПЦР относится к группе экспрессных тестов, что позволяет получить результаты в течение одного рабочего дня, последнее обстоятельство существенно при расшифровке групповых вспышек кишечных инфекций с неизвестной этиологией (КИНЭ).

Цель настоящего исследования заключалась в изучении эффективности применения ПЦР при расшифровке групповых вспышек кишечных инфекций в САО города Москвы в период с 2012 по 2016 г.

Материалы и методы. Всего была исследована 261 проба кала от больных, контактных лиц и обслуживающего персонала в детских дошкольных, образовательных и других учреждениях, расположенных на территории округа. В работе использовались тест-системы «АмплиСенс» Rotavirus/Norovirus/Astrovirus-FL, «АмплиСенс» ОКИ скрин-FL производства ЦНИИ эпидемиологии РФ с постановкой ПЦР в режиме реального времени на амплификаторе RotorGene 6000 (Corbett Research). Параллельно у всех указанных лиц проводилось классическое бактериологическое исследование.

Результаты и обсуждение. Как видно из представленных в таблице данных, основную долю кишечных инфекций за период с 2012 по 2016 г. составили *норовиру-*

сы – 85 случаев (87,6% от всех 97 положительных проб). В 2012 г. выявлено 7 *норовирусов* (8,2%), в 2013 г – 18 (21,2%), в 2014 г. – 43 (50,6%), в 2015 г. – 0 (0%), в 2016 г. – 17 (20%). Пик регистрации норовирусов пришелся на 2014 год. Доля других возбудителей инфекции была незначительной: *кампилобактер* – 4, *астровирусы* – 5, *ротавирусы* – 2, *сальмонелла* – 1. В большинстве случаев, предположительно, источником инфекции могли быть сотрудники пищеблока, у которых преимущественно также выявлялись *норовирусы*. В работе приведены данные по тем групповым вспышкам, по которым бактериологическое классическое исследование было отрицательным, что свидетельствует об эффективности ПЦР при расшифровке КИНЭ и поиске потенциального источника инфекции. Поскольку клинические проявления *норовирусной* инфекции у взрослых менее выражены, чем у детей, они представляют наибольшую эпидемиологическую опасность в плане длительного и скрытого распространения инфекции и контаминации объектов окружающей среды. В этой связи представляется весьма важным профилактическое обследование обслуживающего персонала, и в первую очередь сотрудников пищеблока.

Результаты ПЦР-исследования очагов КИНЭ

Год	Учреждение	Количество проб, всего (из них с положительным результатом +)	Пробы от детей (результат)	Пробы от взрослых/ пищевики/воспитатели/ (результат)
2012	Детский сад	14 (5+)	8 (5+*норовирус*)	6 – пищевики (-отр.)
-/-	Школа (начальные классы)	24 (2+)	24 (2+*норовирус*)	Не исследовались
2013	Школа (начальные классы)	41 (16+)	35 (11+*норовирус*)	6 – пищевики (5+норовирус)
-/-	Детский сад	7 (4+)	7 (2+*ротавирус* и 2+*норовирус*)	Не исследовались
-/-	Детский сад	11 (4+)	11 (4+*астровирус*)	Не исследовались
2014	Школа (начальные классы)	61 (32+)	46 (28+*норовирус*)	15 – пищевики (4+*норовирус*)
-/-	Детский сад	12 (2+)	8 (1+*норовирус*)	4 (1+*норовирус*)
-/-	Детский сад	14 (9+)	12 (9+*норовирус*)	2 – воспитатели (отр-)
2015	Школа (начальные классы)	46 (1+)	40 (1+*сальмонелла*)	6 – пищевики (-отр)
2016	Детский стационар	31 (22+)	14 (11+*норовирус*, 2+*кампилобактер* и 1+*астровирус*)	17 – пищевики (6+*норовирус* и 2+*кампилобактер*)
Итого		261 (97+)	205 (79+) (69+*норовирус*, 2+*ротавирус*, 5+*астровирус*, 2+*кампилобактер*, 1+*сальмонелла*)	56 (18+) (16+*норовирус*, 2+*кампилобактер*)

Заключение. Полученные данные свидетельствуют об эффективности применения ПЦР при расшифровке групповых вспышек КИНЭ, а также о целесообразности проведения периодического профилактического обследования обслуживающего персонала и пищевиков в детских учреждениях на *норовирусную* инфекцию.

Раздел 6. СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ И ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР ЗА ОСОБО ОПАСНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ

СОЗДАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА *ESCHERICHIA COLI* – ПРОДУЦЕНТА ХОЛЕРНОГО ИММУНОГЕННОГО БЕЛКА TCPA

Клавдиенко Е.В., Тучков И.В., Полунина Т.А., Гусева Н.П.

ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия

Холера – особо опасная инфекционная болезнь, вызываемая токсигенными штаммами *Vibrio cholerae*. Возникновение эпидемических осложнений по холере в России связано с реальной возможностью ее завоза из зарубежных стран, неблагополучных по этой инфекции. Основными факторами, определяющими патогенный потенциал возбудителя холеры, являются холерный токсин, или CT, вызывающий основной клинический симптом - диарею, а также токсин-коррегулируемые пили адгезии или (TCP), ответственные за колонизацию холерными вибрионами тонкого кишечника человека. Установлено, что, начиная с 1991 г. осложнение эпидемической ситуации по холере вызвано генетически измененными штаммами, у которых нуклеотидная последовательность генов, кодирующих основные факторы патогенности, изменена. Так, известно, что у штаммов, выделенных после 2006 года, ген *tcpA*, кодирующий основную субъединицу белка TCP, несет однонуклеотидную несинонимичную замену аденина на гуанин (A/G) в положении 266. Учитывая это, важным компонентом эпидемиологического надзора за холерой является эффективный мониторинг внешней среды, направленный на выявление эпидемически опасных штаммов возбудителя, продуцирующих помимо холерного токсина, токсин-коррегулируемые пили адгезии.

Для более полного решения этого вопроса необходимо не только выявлять указанные гены, но и проводить оценку их экспрессии. Однако в Российской Федерации до сих пор отсутствует штамм-продуцент TCP, что препятствует конструированию иммунодиагностической тест-системы для определения экспрессии генов *tcp* в выделяемых штаммах. Такая ситуация указывает на необходимость конструирования штамма-продуцента TCP с целью последующего его использования для получения этого чистого антигена и создания диагностических препаратов.

Целью нашей работы является конструирование рекомбинантного штамма *E.coli* - продуцента основной субъединицы токсин-коррегулируемых пилей адгезии (tcpA) холерного вибриона.

На основе проведенного сравнения нуклеотидной последовательности штамма *V.cholerae* M1430 биовара Эль Тор, взятого из ГКПБ РосНИПЧИ «Микроб», с таковой штамма *V.cholerae* CIRS101, представленной в GenBank и несущей замену A/G в позиции 266, было установлено отсутствие различий в нуклеотидной последовательности их гена *tcpA*. Далее были сконструированы праймеры, фланкирующие полную нуклеотидную последовательность гена *tcpA* со старт- и стоп-кодоном. Донором ДНК для амплификации гена *tcpA* служил указанный выше штамм *V. cholerae* M1430. В качестве вектора для клонирования использовали плазмиду pCR2.1 Плазмидную ДНК и ампликон гена *tcpA* лигировали с использованием T4 ДНК-лигазы, затем лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E.coli* TOP10. Нуклеотидные последовательности полученных клонов штамма *E.coli* TOP10pCR2.1*tcpA* были секвенированы. Результаты показали идентичность нуклеотидной последовательности клона и контрольного штамма.

Штамм *E. coli* BL21(DE3)Star pET302*tcpA* был создан на основе экспрессирующей системы реципиента *E. coli* BL21(DE3)Star путём трансформации бактериальных клеток плазмидным вектором pET302 с клонированным участком гена *tcpA* из штамма *E.coli* TOP10pCR2.1*tcpA* по сайтам рестрикции Xho1 и BamH1. В этой конструкции продуцента биосинтез целевого протеина находится под транскрипционным контролем промотора фага T7 и индуцируется с помощью изопропил-β-тиогалактопиранозида (ИПТГ). Нуклеотидная последовательность для клонирования не включала в себя лидерный пептид, состоящий из 25 аминокислот, который отщепляется в процессе посттрансляционного превращения в зрелый пептид. Также мы исключили альфа-спираль, которая характерна для всех пилей адгезии IV типа. Наличие в плазмиде pET302 полигистидиновой метки дает возможность выделения белка с помощью аффинной хроматографии на колонках с никель-хелатным сорбентом.

Содержание целевого белка в клетках штамма *E.coli* BL21(DE3) pET302*tcpA*, выращенных с индукцией, оценивали с помощью электрофореза в денатурирующих условиях в 12,5% ПААГ в присутствии 0,1% SDS с последующим окрашиванием геля раствором Кумасси G-250 по методу Лэммли. Рекомбинантный белок TcpA был получен в растворимой фракции, но основная часть белка экспрессировалась в виде телец включения.

Очистку растворимой фракции целевого белка проводили в нативных условиях при комнатной температуре. Для очистки нерастворимой фракции TcpA из телец включения использовали процедуру рефолдинга методом разведения, когда после лизиса клеток в денатурирующих условиях осуществляется постепенный переход из денатурирующего буфера в буфер, не содержащий хаотропных веществ (мочевины). Это позволяет белку приобретать нативную вторичную и третичную структуру с одновременным замыканием дисульфидных связей между остатками цистеина. Чистоту белковых фракций оценивали методом SDS-электрофореза. В результате исследования полученных растворимых фракций белка TcpA в нативных и денатурирующих условиях было показано, что все образцы целевого продукта идентичны и представляют собой электрофоретически гомогенный белок. При SDS-электрофорезе идентифицировано наличие мономерной формы рекомбинантного белка TcpA

с MV~19,0-20,5 кДа, которая отсутствует у контрольного штамма *E.coli* BL21(DE3)Star, содержащего векторную плазмиду без вставки гена *tcpA*. Исследование белка TcpA 2D-электрофорезом показало, что целевой белок фракционируется в виде группы белковых пятен с MV 17,0-20,5 кДа в пределах градиента pH 5-7.

Таким образом, сконструирован штамм–продуцент основной субъединицы токсин-коррегулируемых пилей адгезии (TcpA) холерного вибриона. Отработаны условия оптимальной продукции рекомбинантного белка TcpA и схема его очистки с помощью аффинной хроматографии на колонках с никель-хелатным сорбентом. Описанная технология позволяет использовать рекомбинантный штамм *E. coli* в качестве простого и эффективного способа получения очищенного препарата рекомбинантного белка TcpA для изучения его иммунологических свойств и разработки диагностических препаратов для определения уровня продукции TcpA у всех исследуемых природных штаммов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ И ПАРАМЕТРОВ СВЯЗЫВАНИЯ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ДНК-АПТАМЕРОВ С HC50 ТЯЖЕЛОЙ ЦЕПЬЮ НЕЙРОТОКСИНА БОТУЛИЗМА ТИПА А *CLOSTRIDIUM BOTULINUM* И IV ДОМЕНОМ ПРОТЕКТИВНОГО АНТИГЕНА *BACILLUS ANTHRACIS* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ СЕКВЕНИРОВАНИЯ, ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСА И МИКРОКАЛОРИМЕТРИИ

Зенинская Н.А., Колесников А.В., Козырь А.В., Рябко А.К., Марьин М.А., Шемякин И.Г., Дятлов И.А.

ФБУН «ГНЦ ПМБ», Оболенск, Россия

Аптамеры представляют собой одноцепочечные олигонуклеотидные последовательности - функциональные аналоги высокоаффинных и специфичных моноклональных антител, способные образовывать стабильные комплексы с мишенями различной природы. ДНК-аптамеры могут быть успешно применены для детекции практически любых молекул белковой природы, таких как антигены различного рода, и могут быть успешно использованы в диагностике особо опасных инфекций.

Целью работы являлось определение структуры и параметров связывания ранее отобранных индивидуальных ДНК-аптамеров с тяжелой цепью нейтротоксина ботулизма типа А (HC50 Btx A) и IV доменом протективного антигена (PA IV) возбудителя сибирской язвы. Задача, которую решает данная работа, относилась к проблеме биологической безопасности и эпидемического благополучия населения. В частности, к получению средств своевременной диагностики возбудителей данных заболеваний.

Наборы последовательностей ДНК, обладавших сродством к HC50 тяжелой цепи нейротоксина ботулизма типа А и IV домену протективного антигена *B. anthracis*, полученные в результате отбора оптимизированных структур, были проклонированы в плазмидный вектор pBluescript IISK(-) для наработки ДНК индивидуальных аптамеров. С применением ПЦР с праймеров к консервативным участкам олигонуклеотидов библиотеки, один из которых содержал на 5′-конце флуоресцентную метку для блокировки деградации под действием 5′-экзонуклеазы, с ДНК-матриц индивидуальных плазмидных клонов были получены двухцепочечные фрагменты ДНК. Далее одна из цепей фрагментов удалялась обработкой 5′-экзонуклеазой фага лямбда с получением одноцепочечной аптамерной последовательности. Очищенные с помощью хроматографии кандидатные аптамеры анализировали на взаимодействие с субъединицами токсинов при помощи иммуноаптамерного твердофазного сэндвич-варианта иммуноферментного анализа.

Второй вариант тестирования аптамерных кандидатов на связывание с рекомбинантными субъединицами токсинов проводили при помощи ПЦР-амплификации с использованием красителя SYBR Green I. Для этого рекомбинантные белки HC50 тяжелой цепи нейротоксина ботулизма типа А и IV домена протективного антигена *B. anthracis* иммобилизовали на ПЦР-планшете, инкубировали с индивидуальными одноцепочечными фрагментами ДНК, планшет промывали и проводили количественную детекцию связавшейся с мишенью ДНК при помощи ПЦР-амплификации в режиме реального времени. Первичные последовательности аптамеров, обладавших наибольшим сродством к мишеням по данным обоих тестов, определяли методом капиллярного секвенирования. На основе данных секвенирования осуществляли моделирование вторичных структур аптамеров с использованием программ RNAfold и RNAstructure.

Изучение параметров связывания индивидуальных аптамеров, обладавших наибольшей аффинностью к фрагменту HC50 тяжелой цепью нейротоксина ботулизма типа А и IV домену протективного антигена *B. anthracis*, проводилось на приборе ProteOn XPR 36 (Bio-Rad). На дорожку чипа, покрытого нейтравидином (NLC ProteOn Sensor Chip), наносили биотинилированный кандидатный аптамер, и регистрировали сигнал от нанесения рекомбинантной субъединицы токсина в фосфатно-солевом буфере pH 7,4, содержащем 137 мМ NaCl, 0,01 % Tween 20 и 100 мг/л бычьего сывороточного альбумина при скорости 75 мкл/мин. Величина сигнала при иммобилизации фрагментов ДНК находилась в диапазоне 500-600 RU, время ассоциации составляло 200 секунд, время диссоциации – 1800 секунд. Расчет констант связывания белок-аптамер проводился на основе модели Лангмюра с использованием программного обеспечения ProteOn Manager.

Анализ характеристик связывания наиболее высокоаффинных аптамеров с фрагментом HC50 тяжелой цепи нейротоксина ботулизма типа А и IV доменом протективного антигена *B. anthracis* осуществляли методом изотермической титрующей микрокалориметрии на приборе MicroCal ITC 200 System (GE Healthcare) при температурах 37 и 22 °C. Аптамер (лиганд) в различных концентрациях

наносили через шприц в ячейку, содержащую белок-мишень, порциями по 10 мкл в течение 5 сек с интервалом в 6 минут и регистрировали выделение тепла от реакции связывания. Обработку данных проводили с помощью программного обеспечения производителя. Расчеты показали, что отобранные кандидатные аптамеры взаимодействуют с белками-мишенями в стехиометрическом соотношении 1:1. Было установлено, что отобранные кандидатные аптамеры, способны взаимодействовать с фрагментом HC50 тяжелой цепи нейротоксина ботулизма типа A и IV доменом протективного антигена B. anthracis с константами диссоциации, находящимися в диапазоне от 10^{-8} до 10^{-9} М.

Результаты данной работы и последующих исследований могут в дальнейшем найти свое применение в практических разработках высокочувствительных и высокоэффективных систем детекции мишеней с использованием ДНК-аптамеров.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ в рамках соглашения № 14-15-00630.

МЕТОД АНАЛИЗА ЕДИНИЧНЫХ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ *BACILLUS ANTHRACIS* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИНИСЕКВЕНИРОВАНИЯ И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Еременко Е.И., Воропаев В.В., Котенева Е.А., Рязанова А.Г., Аксенова Л.Ю., Цыганкова О.И., Куличенко А.Н.

ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Введение. При эпидемиологическом расследовании вспышек сибирской язвы важно определить происхождение штаммов и пути распространения инфекции. Это позволяет сделать молекулярное типирование штаммов, в частности, анализ единичных нуклеотидных полиморфизмов (SNP). Система генотипирования *B. anthracis* с анализом 13 узловых так называемых «канонических» SNP (canSNP) дает возможность без исследования всего генома на основании анализа небольшого количества маркеров определить принадлежность штамма к одной из основных групп молекулярного разнообразия сибиреязвенного микроба, сделать предварительное заключение о его географическом происхождении и подтвердить идентичность изолятов из одной вспышки [1]. Предложено несколько методов SNP-генотипирования, в том числе минисеквенирование локусов с SNP в сочетании времяпролетной масс-спектрометрией с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS). Результаты определяются различиями в массе исходного и удлинившегося в реакции минисеквенирования праймера. Этот метод разработан для анализа SNP возбудителя туберкулеза [2], нейссерий [3,4], вируса гепатита С [5], однако для возбудителя сибирской язвы он не описан.

Цель и задачи исследования. Целью была разработка метода SNP-генотипирования *B. anthracis* с использованием минисеквенирования и MALDI-TOF MS. В задачи входила разработка дизайна праймеров и реакционных смесей для минисеквенирования ДНК *B. anthracis,* отработка алгоритма canSNP-генотипирования, сравнение результатов canSNP-генотипирования *B. anthracis*, полученных методами минисеквенирования в сочетании с MALDI-TOF MS и аллель-специфической амплификации, определение canSNP-генотипов штаммов *B. anthracis* разного географического происхождения и создание базы данных canSNP-генотипов штаммов *B.anthracis*.

Материалы и методы. В работе изучили 100 вирулентных штаммов *B.anthracis* из коллекции патогенных микроорганизмов ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора. Использовали питательные среды, реактивы и расходные материалы для ПЦР и масс-спектрометрии. Набор основного оборудования включал масс-спектрометр Microflex LT (Bruker Daltonics, Германия), термоциклер C-1000 DuoFast 48/48 (Bio-Rad, США), амплификатор RotorGene 6000 (Corbett Research, Австралия) и автоматический анализатор ДНК 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Результаты обрабатывали, пользуясь компьютерными программой MS Excel, PHYLOViZ с алгоритмом MLST, UniproUGENE (РФ) и PerlPrimer (Австралия) v1.1.21, on line ресурсами BLASTn и MLVA bank for Microbes Genotyping (адрес доступа http://mlva.u-psud.fr/mlvav4/genotyping/) в разделе SNP для *B. anthracis* и базой данных GenBank.

Основные результаты. Праймеры для удлинения в реакции минисеквенирования сконструировали, исходя из расположений 13 canSNP в геноме *B. anthracis*, описанных в работе [1], таким образом, чтобы единичный нуклеотидный полиморфизм локализовался непосредственно у 3'-конца праймера и температуры отжига праймеров не отличались более чем на 2 °С. Правильность гибридизации праймеров проверили в программе BLASTn в сравнении с геномом штамма *B. anthracis* Ames ancestor. Для минисеквенирования выбрали разработанный вариант реакционных смесей с набором из определенных dNTPs и ddNTPs в зависимости от контекста нуклеотидных последовательностей в области SNP, который обеспечивал более высокую дискриминирующую возможность в сравнении с набором из четырех ddNTPs. Корректность разработанных праймеров и генерируемых в реакции минисеквенирования с данным набором dNTPs аллелей SNP подтвердили проверкой *in silico* в программе BLASTn в сравнении с геномами 38 штаммов из базы GenBank. Последовательность операций метода начиналась с выделения ДНК штаммов *B. anthracis*, затем следовала ПЦР-амплификация 13 областей генома, содержащих SNP, с праймерами, предложенными [1]. Следующий этап состоял в ферментативной очистке продуктов амплификации от не включившихся нуклеозидтрифосфатов. Очищенные амплификаты использовали для проведения реакции минисеквенирования. По окончании минисеквенирования продукты реакции обессоливали катионообменной смолой. Затем готовили матрицу для MALDI-TOF MS из 3-гидроксипиколиновой

кислоты, наносили на мишень AncorChip матрицу и полученный образец в равных объемах и помещали в MALDI-TOF масс-спектрометр для анализа.

Параметры масс-спектрометра оптимизировали для диапазона m/z от 4500 до 12000. Каждый масс-спектр олигонуклеотидов получали при 30 накоплениях с постоянной мощностью лазерного излучения на уровне порогового значения для увеличения разрешения. На суммарном масс-спектре фиксировали пик, соответствующий массе праймера, пик, соответствующий массе продукта, и ориентировались на разницу в их массах.

Результаты регистрировали в виде записи буквенных обозначений аллелей всех 13 canSNP. Например: (T G A T C T T A T T A T A), что соответствует canSNP-генотипу B.Br.001/002, исходя из предложенных обозначений [1]. Воспроизводимость и корректность получаемых результатов проверили троекратным повторением типирования 10 штаммов *B. anthracis*, и сравнением их с результатами, полученными методом прямого секвенирования амплификатов, а также методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени с LNA-модифицированными зондами. Во всех случаях получено полное совпадение результатов SNP-генотипирования. Анализ 100 штаммов *B. anthracis* определил принадлежность их к 6 canSNP-генотипам из числа 12 известных, что свидетельствует о значительном молекулярном разнообразии штаммов, выделенных на территории России и некоторых стран СНГ. Их генотипы представлены в виде электронной базы данных.

Заключение. Для определения SNP-генотипов штаммов *B. anthracis* нами впервые предложен методический подход, состоящий в последовательном использовании минисеквенирования областей генома, содержащих 13 «канонических» единичных нуклеотидных полиморфизмов, и определения аллелей по разнице в величине молекулярных масс секвенированных фрагментов ДНК MALD-TOF масс-спектрометрией.

Разработанный способ SNP-генотипирования *B. anthracis* имеет преимущества перед другими подходами благодаря возможности мультиплексирования анализов, меньшим материальным затратам, и таким образом, может быть полезным в работе профильных микробиологических лабораторий.

Список используемой литературы

1. Van Ert, M.N. et al. PLoS ONE . – 2007. – Vol.2, N5. e461. i:10.1371/journal.pone.0000461.

2. Afanas'ev, M. V. et al. J. Antimicrob. Chemother. – 2007. – 59. – P.1057–1064. doi:10.1093/jac/dkm086

3. Верещагин, В.А. с соавт. Молекулярная биология. – 2005.– Т.39, №6. – С.923–932.

4. Lowe C.A., Diggle M.A., Clarke S.C. Br J Biomed Sci. – 2004. – Vol.61, N1. – P.8–10.

5. Ilina, E. N.et al. J. Clinic. Microbiol. – 2005. – Vol. 43, No.6. – P. 2810–2815. doi:10.1128/JCM.43.6.2810-2815.2005.

SENSITIVE MULTIPLEX REAL-TIME RT-PCR ASSAY FOR THE DETECTION OF FILOVIRUSES

Dedkov V.G.[1,2], Safonova M.V.[1], Bodnev S.A.[3], Pyankov O.V.[3], Agafonov A.P.[3], Maleev V.V.[1], Shipulin G.A.[1]

[1] Central Research Institute for Epidemiology, Federal Service on Consumers' Rights Protection and Human Well-Being Surveillance, Moscow, Russia

[2] Research Institute of Occupational Health, Moscow, Russia

[3] State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Novosibirsk, Russia

There are seven species within the family *Filoviridae*, divided into three genera, Ebolavirus, Marburgvirus and Cuevavirus. Four of these species – *Zaire ebolavirus* (EBOV), *Sudan ebolavirus* (SUDV), *Bundibugyo ebolavirus* (BDBV) and *Marburg virus* (MARV) – are the causative agents of sever fevers among humans with Ebola fever disease (EFD) and Marburg fever disease (MFD), both having similar clinical symptoms (King et al., 2012). Reston ebolavirus (RESTV) is not a human pathogen, while Tai Forest ebolavirus (TAFV) has been detected only in one case of dengue-like syndrome, with a non-fatal outcome (Le Guenno et al., 1995). Lloviu cuevavirus virus was isolated recently from bats in Spain (Negredo A. et al., 2011). However, its pathogenicity for humans has not been studied yet.

Humanity first faced filovirus fevers in 1967, when an outbreak of MFD occurred in Germany and in the former Yugoslavia (Brauburger et al., 2012). Nine years later, in 1976, two simultaneous outbreaks of EFD with a total of 602 cases occurred in Sudan and Zaire. These outbreaks were caused by SUDV and EBOV, respectively (World Health Organization, 1978a; World Health Organization, 1978b). Subsequently, EFD and MFD outbreaks occurred regularly but did not constitute a great threat to humanity because they were always limited by the number of cases and localization.

However, the situation changed in 2014, when the largest-ever recorded epidemic of EFD spread throughout five African countries: Guinea, Liberia, Sierra Leone, Nigeria and Senegal (Gire et al., 2014). A total of 28,646 cases and 11,323 deaths had been recorded by March 27, 2016 (World Health Organization, 2016a). Despite joint efforts by the world community, elimination of the outbreak took approximately two years, and sporadic cases of EFD are still being reported in Guinea and Liberia (World Health Organization, 2016b). Another problem is the large number of convalescents, whose physiological liquids contain viable virus for a long time after clinical recovery. Therefore, these persons require close surveillance and control. For this reason, rapid, sensitive and specific methods for filovirus detection are needed for the diagnosis of EFD and MFD as well as for the surveillance and identification of viral sources in the environment.

Here, we describe a real-time reverse transcription PCR (RT-PCR) assay for the detection of filoviruses. This assay is a further development of our previously reported EBOV (Zaire)-Fl assay (Dedkov et al., 2016).

The assay specificity was determined using high-titer solutions of viral RNA and DNA and serum samples from individuals without any clinical symptoms (n=50).

Armored RNA -positive control particles (AR) were used to determine the analytical sensitivity of the FiloA-Fl and the FiloB-Fl sets. The LOD was defined as the lowest AR concentration detected in all triplicates (Cherpillod et al., 2016).

Two sets (FiloA-Fl and FiloB-Fl) of real-time RT-PCR assays for the detection of filoviruses were developed and evaluated. The melting temperatures and GC contents of all primers and the length of the amplicons were adjusted to be similar for efficient multiplex reactions.

Assay specificity was studied using a representative sampling of viral and human RNA/DNA. No cross-reactions were observed. The LOD of the assay was $5x10^2$ copies/ml of the AR-positive control for the FiloA-Fl set and $5x\ 10^3$ copies/ml of the AR-positive control for the FiloB-Fl set. Standard detection was linear in the range from 10^5 copies/ml (Ct 28) to $5x10^2$ copies/ml (Ct 36) for the EBOV AR (R^2=0.99), 10^5 copies/ml (Ct 27) to $5x10^2$ copies/ml (Ct 37) for the SUDV AR (R^2=0.98), 10^5 copies/ml (Ct 27) to $5x10^2$ copies/ml (Ct 37) for the MARV AR (R^2=0.98), 10^5 copies/ml (Ct 31) to 10^3 copies/ml (Ct 39) for the TAIFV AR (R^2=0.99), 10^5 copies/ml (Ct 29) to 10^3 copies/ml (Ct 36) for the BDBV AR (R^2=0.97) and 10^5 copies/ml (Ct 31) to 10^3 copies/ml (Ct 39) for the RESTV AR (R^2=0.98). Within these ranges, efficiencies were assessed at 94% for EBOV, 87% for SUDV, 97% for MARV, 91% for TAIFV, 99% for BDBV and 86% for RESTV.

Filoviruses are important etiological agents of emergent diseases with high mortality rates. Filovirus fever diseases (FFDs) were traditionally a burden of African countries. However, global interconnection has raised the probability of filoviruses spreading worldwide. Therefore, national healthcare organizations need tools for the management of FFD risks. These tools should definitely include diagnostic kits based on real-time RT-PCR because it is the most suitable method for FFD diagnosis (World Health Organization, 2015a).

Many assays and commercial kits for FFD diagnosis have been developed in several countries (Cherpillod et al., 2016; Huang et al., 2012; Liu et al., 2015; Weidmann et al., 2004). Some of these kits have been approved by the World Health Organization (World Health Organization, 2015b). However, only a few were evaluated during the current epidemic in West Africa. In addition, most of the field laboratories involved in the eradication of the Ebola epidemic prefer to use in house assays and kits developed in their own countries. The mobile laboratory of the Russian special antiepidemic team (SAET) is no exception. The assay described above is mainly intended for use in the SAET mobile laboratory and in the Russian Federation for diagnostic purposes. Unfortunately, we faced some limitations during assay development, namely the lack of RESTV, BDBV and TAIFV RNAs. Therefore, our assay was evaluated using ARs and *in silico* analysis. Nevertheless, based on our experience, we expect this assay to work well.

Here we report the development of an RT-PCR assay for filovirus detection. The assay contains all of the necessary components to perform the analysis, including an AR-positive control, positive control for PCR and an armored internal control. The advantage of this assay is that it allows the verification of all steps of the analysis, including extraction, reverse transcription and PCR.

Our results revealed that the LOD of the assay is in the range of $5x10^2$ - $5x\ 10^3$ copies/ml of ARs. Thus, our real-time RT-PCR assay provides a fast and sensitive tool for filovirus detection. The high specificity and sensitivity of the assay makes it useful for clinical and epidemiological investigations in the field of FFDs.

References

Brauburger, K., Hume, A.J., Mühlberger, E., Olejnik, J., 2012. Forty-five years of Marburg virus research. Viruses 4, 1878-1927.

Cherpillod, P., Schibler, M., Vieille, G., Cordey, S., Mamin, A., Vetter, P., Kaiser, L., 2016. Ebola virus disease diagnosis by real-time RT-PCR: a comparative study of 11 different procedures. J. Clin. Virol. 77, 9–14.

Dedkov, V.G., Magassouba, N.F., Safonova, M.V., Deviatkin, A.A., Dolgova, A.S., Pyankov, O.V., Sergeev, A.A., Utkin, D.V., Odinokov, G.N., Safronov, V.A., Agafonov, A.P., Maleev, V.V., Shipulin, G.A.. 2016. Development and evaluation of a real-time RT-PCR assay for the detection of Ebola virus (Zaire) during an Ebola outbreak in Guinea in 2014-2015 J. Virol. Methods 228, 26–30. doi:10.1016/j.jviromet.2015.11.007.

Gire, S.K., Goba, A., Andersen, K.G., Sealfon, R.S., Park, D.J., Kanneh, L., Jalloh, S., Momoh, M., Fullah, M., Dudas, G., Wohl, S., Moses, L.M., Yozwiak, N.L., Winnicki, S., Matranga, C.B., Malboeuf, C.M., Qu, J., Gladden, A.D., Schaffner, S.F., Yang, X., 2014. Genomic surveillance elucidates Ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak. Science 345, 1369-1372.

Huang, Y., Wei, H., Wang, Y., Shi, Z., Raoul, H., Yuan, Z., 2012. Rapid detection of filoviruses by real-time TaqMan polymerase chain reaction assays. Virol. Sin. 27, 273-277.

King, A., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J., eds., 2012. Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, London.

Le Guenno, B., Formenty, P., Wyers, M., Gounon, P., Walker, F., Boesch, C., 1995. Isolation and partial characterisation of a new strain of Ebola virus. Lancet 345, 1271-1274.

Liu, L., Sun, Y., Kargbo, B., Zhang, C., Feng, H., Lu, H., Liu, W., Wang, C., Hu, Y., Deng, Y., Jiang, J., Kang, X., Yang, H., Jiang, Y., Yang, Y., Kargbo, D., Qian, J., Chen, W., 2015. Detection of Zaire Ebola virus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction, Sierra Leone, 2014. J. Virol. Methods 222, 62-65.

Weidmann, M., Mühlberger, E., Hufert, F.T., 2004. Rapid detection protocol for filoviruses. J. Clin. Virol. 30, 94–99.

World Health Organization, 1978a. Ebola haemorrhagic fever in Sudan, 1976. Report of a WHO/International Study Team. Bull. World Health Organ. 56, 247–270. PMID: 307455.

World Health Organization, 1978b. Ebola haemorrhagic fever in Zaire, 1976. Bull. World Health Organ. 56, 271–293. PMID: 307456.

World Health Organization, 2015a. Selection and use of Ebola in vitro diagnostic assays. Emergency guidance. http://www.who.int/csr/resources/publications/ebola/ivd-assays/en/ (29.06.2016)

World Health Organization (2015b). Annex. 2. Considerations for the selection of PCRs for the diagnosis of Ebola disease. http://www.who.int/csr/resources/publications/ebola/ivd-assays/en/ (29.06.2016)

World Health Organization, 2016a. Ebola situation report - 30 March 2016. http://apps.who.int/ebola/current-situation/ebola-situation-report-30-march-2016 (04.04.2016)

World Health Organization, 2016b. Liberia and Guinea step up coordination to stem new cases of Ebola. http://www.who.int/csr/disease/ebola/liberia-guinea-flareups-update/en/ (29.06/2016)

АНАЛИЗ СТАБИЛЬНОСТИ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ВЫСОКОВИРУЛЕНТНЫМИ ИЗОЛЯТАМИ *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI*

Леденева М.Л., Савченко С.С., Ткаченко Г.А., Шпак И.М., Устинов Д.В., Плеханова Н.Г.

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Волгоград, Россия

Введение. Каждый вид патогенных микроорганизмов характеризуется определенным набором факторов патогенности, биохимическими и геномными характеристиками, определяющими специфичность инфекционного процесса. Вариабельность потомков различных клонов одного вида на генотипическом и фенотипическом уровнях позволяет осуществлять их дифференциацию, а также обуславливает явление штаммоспецифических различий вирулентности. Однако некоторые виды микроорганизмов используют генетическую программу, при которой определенные гены формируют обратимые мутации, приводящие к фенотипической вариабельности в клоновой популяции. Было показано, что при длительном культивировании на питательных средах снижается вирулентность внутри клональных линий, а при экспериментальном заражении лабораторных животных вновь восстанавливается [1].

Этиологическим агентом мелиоидоза, относящегося к особо опасным инфекциям, является грамотрицательная бактерия *Burkholderia pseudomallei*, которая может служить примером высокой адаптационной пластичности генома, приводящей к внутриклональной изменчивости и затрудняющей внутривидовую дифференциацию штаммов. В связи с этим разработка эффективных методов внутривидового типирования штаммов *B. pseudomallei* на основе полиморфизма генов факторов патогенности определяет необходимость выявления стабильных локусов в ряду поколений.

Целью исследования являлось выявление стабильных сочетаний однонуклеотидных полиморфизмов (SNP – Single Nucleotide Polymorphism), ассоциированных с высоковирулентными изолятами *B. pseudomallei*, для внутривидового типирования на основе генетических детерминант патогенности возбудителя мелиоидоза.

Материалы и методы. Объектом исследования служил геном штамма *B. pseudomallei* 110 из коллекционного центра ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Для моделирования динамики приспособляемости в ходе инфекционного процесса штамм был последовательно пятикратно пассирован через организм золотистых хомячков, а затем подвергнут обратному пересеву на питательной среде. Секвенирование генома исходного штамма *B. pseudomallei* 110a и его пятикратно пассированных субкультур *in vivo* (*B. pseudomallei* 110b) и *in vitro* (*B. pseudomallei* 110c) было осуществлено с использованием системы 454 GS Junior (Roche, Швейцария) на базе Межинститутского Центра коллективного пользования «ГЕНОМ» ИМБ РАН и платформы Ion Torrent PGM (Life Tecnologies, США).

Основные результаты. Многочисленные SNP, уникальные для высоковирулентных штаммов *B. pseudomallei*, были продемонстрированы в работе Sahl J.W. с соавторами [2]. Однако для обнаружения эпидемиологической связи вирулентности с определенными клональными линиями *B. pseudomallei* необходима стабильность генетических детерминант вирулентности внутри этих линий. В связи с этим, единичные нуклеотидные замены, выявленные в работе Sahl J.W. с соавторами, были изучены в полногеномных нуклеотидных последовательностях штамма *B. pseudomallei* 110 с целью идентификации стабильного набора SNP-полиморфизмов шести генов патогенности (таблица 1).

Таблица 1. Результаты изучения стабильности SNP в генах патогенности у штамма B. pseudomallei 110 при изменении условий культивирования

Хромосома/ Координата в геноме *B. pseudomallei* K96243	SNPs в геноме *B. pseudomallei* K96243	SNPs в геноме *B. pseudomallei* MSHR668	SNPs в геноме *B. pseudomallei* 110a (исходный штамм)	SNPs в геноме *B. pseudomallei* 110b (пассирование *in vivo*)	SNPs в геноме *B. pseudomallei* 110c (пассирование *in vitro*)	Кодируемый признак
NC_006350.1/ 220073	C	T	C	C	C	Лаурил ацилтрансфераза биосинтеза липида-А
NC_006350.1/ 220163	C	T	C	C	C	
NC_006350.1/ 554241	T	C	C	C	C	σ^{32} фактор РНК-полимеразы

Хромосома/ Координата в геноме *B. pseudomallei* K96243	SNPs в геноме *B. pseudomallei* K96243	SNPs в геноме *B. pseudomallei* MSHR668	SNPs в геноме *B. pseudomallei* 110a (исходный штамм)	SNPs в геноме *B. pseudomallei* 110b (пассирование *in vivo*)	SNPs в геноме *B. pseudomallei* 110c (пассирование *in vitro*)	Кодируемый признак
NC_006350.1/ 2553415	C	G	G	G	G	Мембранный транспортный белок
NC_006350.1/ 4073158	T	C	T	T	T	Глютамин-аминотрансфераза
NC_006350.1/ 3924581	G	A	A	A	A	Белок хемотаксиса
NC_006351.1/ 3042744	A	G	A	A	A	Монооксигеназа

Оценку SNP-профиля генов патогенности штамма *B. pseudomallei* 110 проводили относительно однонуклеотидных полиморфизмов двух штаммов сравнения: умеренновирулентного штамма *B. pseudomallei* K96243 и высоковирулентного штамма *B. pseudomallei* MSHR668. В качестве факторов патогенности были выбраны гены, детерминирующие биосинтез липида-А, σ^{32} фактора РНК-полимеразы, мембранного транспортного белка, глютамин-аминотрансферазы, белка хемотаксиса и монооксигеназы. Полученные результаты продемонстрировали стабильность проанализированных молекулярных маркеров патогенности в субкультурах штамма *B. pseudomallei* 110. Выявленный профиль SNP включал варианты, характерные для обоих штаммов сравнения, что свидетельствовало о высокой вирулентности штамма *B. pseudomallei* 110. По данным изучения вирулентности *in vivo* летальная доза LD_{50} для штамма *B. pseudomallei* 110 составила 10 микробных клеток (м.к.) при подкожном заражении золотистых хомячков и, таким образом, подтверждает высокую вирулентность этого штамма по результатам *in silico* анализа.

Заключение. Выявленная стабильность рассмотренных SNP в генах, функционально значимых для реализации патогенности *B. pseudomallei*, позволит разработать генодиагностические системы для обнаружения и типирования штаммов возбудителя мелиоидоза по степени их вирулентности.

Список используемой литературы

1. Romero C.M., DeShazer D., Feldblyum T. et al. Genome sequence alterations detected upon passage of *Burkholderia mallei* ATCC 23344 in culture and in mammalian hosts. BMC Genomics. 2006, 7:228.

2. Sahl J.W., Allender C.J., Colman R.E. et al. Genomic characterization of *Burkholderia pseudomallei* isolates selected for medical countermeasures testing: comparative genomics associated with differential virulence. PLoS One. 2015, 10(3): e0121052.

ВЕРОЯТНОСТЬ МУТАЦИЙ В САЙТАХ ГЕМАГГЛЮТИНИНА ГРИППА ПТИЦ H5N1, ВЛИЯЮЩИХ НА ПАТОГЕННОСТЬ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ, ЗАВИСИТ ОТ КОНТЕКСТА В ДРУГИХ САЙТАХ

Сафина К.Р.[1], Базыкин Г.А.[1], Неверов А.Д.[2]

[1]ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия
[2]Московский государственный университет им. Ломоносова, Москва, Россия

Введение

Грипп птиц H5N1 может вызывать тяжелое респираторное заболевание у людей. Большинство случаев заболевания человека связывается с заражением от домашней птицы, однако, зафиксированы также отдельные случаи передачи от человека к человеку [1]. CDC США с 2009 года выпускает каталог мутаций в основных белках вируса, для которых экспериментально была показана ассоциация с патогенностью H5N1 у млекопитающих - «H5N1 Genetic Change Inventory», последнее обновление 2012 г [2]. Эволюция сайтов гемагглютинина (HA) и нейраминидазы - поверхностных антигенов вирусов гриппа человека H3N2 и H1N1 - является координированной как в одном, так и разных белках [3,4]. Вероятность наблюдать мутацию в сайте зависит от контекста - аминокислот в других сайтах, что является проявлением эпистаза, в основе которого лежит функциональное взаимодействие между сайтами. Вероятность приобретения набора мутаций, обеспечивающих приспособленность вируса к новому хозяину, зависит от эпистатических взаимодействий в сайтах белков вируса.

Цель и задачи

Целью работы является определение эпистатически-взаимодействующих сайтов в HA H5N1 вируса гриппа птиц.

Материалы и методы

2426 полных кодирующих последовательностей HA гриппа птиц H5N1 были получены из GISAID на мо-

мент 21.11.2016. Последовательности были выровнены по аминокислотам и обратно транслированы в нуклеотиды. Были выполнены филогенетическая реконструкция и восстановление предковых состояний в модели GTR+I+G. Филогенетическое дерево было укоренено внешней группой штаммов Hong Kong 1996 [5]. В результате, на каждой ветви дерева определены синонимические и несинонимические замены между предковым узлом и потомком. Для исследования эпистаза мы применили филогенетический метод, основанный на методе [3]: для каждой пары сайтов определяется эпистатическая статистика, которая, в первом приближении, равна числу последовательных пар замен на филогенетическом дереве, а также номинальное значение p-value. В отличие от оригинального метода [3], мы сортируем пары сайтов не по возрастанию p-value, а по убыванию статистики WI, пропорциональной частичным корреляциям мутаций в сайтах, что позволяет отличить функциональные взаимодействия сайтов (например A-C) от корреляций через цепочки прямых взаимодействий (A-B, B-C) [6].

Основные результаты

Мы исключили из анализа несинонимические мутации на листьях дерева и ограничились анализом 115 сайтов, для которых было не менее четырех мутаций в каждом сайте на внутренних ветках. Тест показал наличие сигнала эпистаза FDR<1 (α=0.05) для всех значений 0.009<p-value<0.05. Всего для p-value<0.05 было предсказано 863 упорядоченные пары сайтов (5%) из 16560 возможных, FDR=76% (653.6/863). В качестве предсказаний взаимодействующих пар сайтов мы использовали множество, содержащее 493 пары, для которых значения WI > 0, из них, для 489 пар p-value < 0.05. Таким образом, около 3% пар сайтов являются эпистатически-взаимодействующими. Из 31 сайта в HA, в которых одиночные мутации были ассоциированы с патогенностью [2], среди 115 сайтов, отобранных для анализа, 14 сайтов встречались среди трейлерных сайтов в списке эпистатических пар, отсортированном по убыванию WI, выше, чем сайты из комплементарного множества ($P<1e^{-4}$). Из 13 сайтов, замены в которых ассоциированы с изменением антигенных свойств [7], 10 сайтов были перепредставлены (P<0.05) в вершине списка эпистатических пар среди трейлерных сайтов.

Заключение

Около 3% всех упорядоченных пар сайтов имеют сильные эпистатические взаимодействия. Сайты, замены в которых, ассоциированы с патогенностью у млекопитающих и с изменением антигенных свойств, участвуют в более сильных эпистатических взаимодействиях, по сравнению, с комплементарными множествами сайтов.

Список используемой литературы

1. Centers for Disease Control and Prevention. Highly Pathogenic Asian Avian Influenza A (H5N1) in People [Internet]. 2015 Jun 11. Available: https://www.cdc.gov/flu/avianflu/h5n1-people.htm

2. Centers for Disease Control and Prevention. H5N1 Genetic Changes Inventory: A Tool for International Surveillance [Internet]. 2012. Available: https://www.cdc.gov/flu/avianflu/h5n1-genetic-changes.htm

3. Kryazhimskiy S, Dushoff J, Bazykin GA, Plotkin JB. Prevalence of epistasis in the evolution of influenza A surface proteins. PLoS Genet. 2011;7: e1001301. doi:10.1371/journal.pgen.1001301

4. Neverov AD, Kryazhimskiy S, Plotkin JB, Bazykin GA. Coordinated Evolution of Influenza A Surface Proteins. Malik HS, editor. PLOS Genet. 2015;11: e1005404. doi:10.1371/journal.pgen.1005404

5. Lemey P, Rambaut A, Drummond AJ, Suchard MA. Bayesian Phylogeography Finds Its Roots. Fraser C, editor. PLoS Comput Biol. 2009;5: e1000520. doi:10.1371/journal.pcbi.1000520

6. Jones DT, Buchan DWA, Cozzetto D, Pontil M. PSICOV: precise structural contact prediction using sparse inverse covariance estimation on large multiple sequence alignments. Bioinformatics. 2012;28: 184–190. doi:10.1093/bioinformatics/btr638

7. Beato MS, Mancin M, Yang J, Buratin A, Ruffa M, Maniero S, et al. Antigenic characterization of recent H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses circulating in Egyptian poultry. Virology. 2013;435: 350–356. doi:10.1016/j.virol.2012.09.016

SEQANALYZER – ПРОГРАММА ДЛЯ АНАЛИЗА ДАННЫХ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ШТАММОВ *Vibrio cholerae*

Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Писанов Р.В., Олейников И.П.

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия

Введение. В настоящее время наблюдается бурный рост технологий высокопроизводительного секвенирования, что сопровождается заметным снижением стоимости определения первичной нуклеотидной структуры штаммов различных микроорганизмов. Однако при анализе данных возникают как чисто алгоритмические сложности, связанные с большим объемом данных, так и специфические сложности, связанные с характером конкретной биологической задачи. Ряд имеющихся программных продуктов и алгоритмов разработан под решение конкретных задач и не может быть применен в других условиях. В противовес этому, универсальные программные продукты для анализа данных полногеномного секвенирования, как правило, сложны в освоении и зачастую требуют большого количества дополнительной информации и (или) связи с зарубежными банками данных нуклеотидных последовательностей. Вместе с тем, последнее время все чаще возникает вопрос о возможном прекращении доступа к зарубежным банкам данным в связи с санкциями против Российской Федерации. По данным ряда СМИ, крупнейшие компании США, такие как Microsoft, Oracle, Symantec и Hewlett-Packard прекращают сотрудничество с банками и структурами, которые попали в санкционные списки США. Это обуславливает актуальность разработки

отечественного программного обеспечения, независимого от зарубежных корпораций.

Немаловажным фактором является стоимость специализированного программного обеспечения, которая может многократно превышать стоимость оборудования. В ряде случаев, особенно в отношении государственных учреждений, это является критическим фактором, вынуждающим искать альтернативные методы анализа данных.

Для некоторых программных продуктов требуется сборка полного генома (de novo или с использованием референсной последовательности), что тоже представляет собой определенные сложности и затрудняет проведение анализа.

Однако учитывая высокую эпидемиологическую значимость холерного вибриона, скорость и оперативность проведения анализа являются довольно актуальными факторами.

Цель работы состояла в разработке программного обеспечения, позволяющего проводить быструю обработку данных полногеномного секвенирования штаммов холерного вибриона.

Материалы и методы. Программное обеспечение разрабатывали на языках программирования Java. В качестве основного поискового метода использовали алгоритм локального выравнивая Смита-Ватермана с учетом аффинных штрафов за делеции и вставки.

Результаты. В результате проведенного исследования была разработана программа SeqAnalyzer, позволяющая проводить быстрый анализ результатов полногеномного секвенирования штаммов *Vibrio cholerae* по заранее определенному набору генов. SeqAnalyzer доступен для скачивания на сайте Ростовского противочумного института по адресу http://antiplague.ru/seqanalyzer. Важной особенностью является возможность определения кратности вариабельных тандемных повторов, что имеет существенное значение для эпидемиологического анализа.

Разработанную программу отличают низкие требования к оборудованию – так для работы достаточно «офисного» компьютера с 1 Гб оперативной памяти. Немаловажной является простота управления – программа разработана по принципу «одной кнопки» и кросс-платформенность, что позволяет работать с программой практически в любой операционной системе (Windows, Linux, Mac OS X), при этом для работы достаточно иметь установленный пакет Java Runtime, бесплатно распространяемый компанией Oracle (www.oracle.com).

В качестве исходных данных используется файл в fasta-формате, содержащий набор контигов (протяженных нуклеотидных последовательностей - результат сборки de novo коротких ридов, полученных в результате полногеномного секвенирования).

Результатом работы программы является текстовый файл, содержащий информацию о наличии в исследуемом наборе контигов анализируемых генов. В случае обнаружения гена, для него указывается процент совпадения с референс-последовательностью, заложенной в программе. Для большинства генов в качестве референсных последовательностей использованы гены штамма *Vibrio cholerae El Tor* №16961.

Для ряда штаммов холерного вибриона, выделяемых в последнее время, характерна множественная антибиотикоустойчивость. В связи с этим в программе SeqAnalyzer предусмотрено выявление генов устойчивости к триметоприму, сульфаметоксазолу, хлорамфениколу (левомицетину), стрептомицину, канамицину и к бета-лактамным антибиотикам.

В случае выявления в анализируемых контигах вариабельных тандемных повторов в программе предусмотрено автоматическое вычисление их кратности (числа повторов) с использованием алгоритма «виртуальной ПЦР» с праймерами, фланкирующими область тандемного повтора. При этом кратность (число повторов) определяется по формуле: число повторов = (размер амплификата – размер фланкирующих участков) / размер повтора.

Заключение. В результате проведенной работы разработано бесплатное и доступное программное обеспечение для анализа данных полногеномного секвенирования штаммов холерного вибриона. Низкие требования к оборудованию и простота управления позволяют рекомендовать программу широкому кругу специалистов, занимающихся биоинформационным анализом.

АНАЛИЗ ГИПЕРВАРИАБЕЛЬНЫХ УЧАСТКОВ ГЕНОМОВ СУБПОПУЛЯЦИЙ *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI 110,* ВЫЯВЛЕННЫХ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ *IN VIVO* И *IN VITRO*

Устинов Д.В., Антонов А.С., Савченко С.С., Шпак И.М.

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Волгоград, Россия

Введение. *Burkholderia pseudomallei* микроорганизм II группы патогенности, является возбудителем особо опасного инфекционного заболевания – мелиоидоза. Мелиоидоз является эндемичным для Австралии и ряда стран Юго-Восточной Азии; в этих регионах распространённость данной инфекции довольно высока. В России, как и в странах бывшего СССР, не было зарегистрировано до сих пор ни одного достоверного случая мелиоидоза, но в то же время возрастающее число выявляемых случаев заболевания в регионах Южной Америки и Африки, а также завозных случаев в странах Западной Европы и США, свидетельствует о необходимости проявления настороженности со стороны медицинской и ветеринарной службы нашей страны к возможным случаям появления этого заболевания. Особую проблему представляет хроническая форма мелиоидоза, которая представляет собой длительно персистирующую инфекцию, чрезвычайно трудно диагностируемую и характеризующуюся высокой частотой рецидивов. Молекулярно-генетические основы динамической адаптации возбудителя в организме хозяина, проявляющиеся в виде длительно персистирующей инфекции со стертыми клиническими проявлениями,

являются предметом многочисленных исследований в последнее время, поскольку понимание механизмов адаптивных генетических изменений патогена должно способствовать созданию более эффективных стратегий лечения и профилактики.

Цель. Сравнить структуру геномов субкультур *B. pseudomallei* 110, полученных в результате культивирования в различных условиях, с исходным музейным штаммом.

Задачи:

Сравнить полногеномные нуклеотидные последовательности и выявить консервативные и вариабельные участки генома *B. pseudomallei* 110 в различных условиях культивирования;

Проанализировать характер изменений, происходящих в геноме *B. pseudomallei* 110 в условиях физиологической адаптации к существованию в различных условиях, и определить достоверность наблюдаемых изменений

Материалы и методы. В работе использовались геномные нуклеотидные последовательности субпопуляций штамма *B. pseudomallei* 110 из коллекции Волгоградского научно-исследовательского противочумного института. Геномная последовательность исходного коллекционного штамма *B. pseudomallei* 110a была использована как референтная. Субкультура 110b получена путем пассажа в организме лабораторного животного (золотистый хомячок), зараженного штаммом 110a. Субкультура 110c получена обратным пятикратным пассажем субкультуры 110b на плотных питательных средах. Исследованные нуклеотидные последовательности представлены сборками ридов, полученных в ходе секвенирования с применением технологий 454 Roche и PostLight. Сборки ридов были ассемблированы с применением программы NEWBLER, в ходе которой были получены сборки контигов. Для изучения и анализа сборок контигов использовались программы Geneious и ncbi-blast, для аннотирования использовался веб-сервис RUST, для анализа достоверности наблюдаемых изменений использовалась программа Tablet. Все полученные данные вносились в электронную таблицу Microsoft Excel для статистического анализа.

Основные результаты. Сравнения сборок контигов изолятов *B. pseudomallei* 110a и 110b выявило различия, проявляющиеся в 305 гэпах, 231 SNP, а также 147 полинуклеотидных последовательностях. Из 305 гэпов, 179 составляли делеции и 126 инсерции. Из 231 SNP 154 составляли транзиции и 77 - трансверсии. После аннотирования у сравниваемых субкультур зафиксировано 137 кодирующих последовательностей, в которых были найдены изменения в количестве 140 гэпов, 145 SNP и 53 полинуклеотидных последовательностей. Поскольку полинуклеотидные последовательности являются одним из признаков сомнительных данных, так как могут быть следствием ошибок в технологиях секвенирования, они были проверены на достоверность. Поиск изменений различных кодирующих последовательностей (CDS) в изоляте *B. pseudomallei* 110c анализ микроэволюции по сравнению с *B. pseudomallei* 110b показал, что наблюдаются как различия, возвращающиеся к референсу, так и аналогичные 110b, т. е. закрепившиеся в ходе микроэволюционного процесса. Так, из выявленных различий 145 соответствовали возврату к референсному генотипу, 108 соответствовали генотипу субкультуры 110b, 1 модификация не соответствовала ни референсу, ни закрепившемуся в организме животного генотипу, для 31 модификации не получено достаточного числа сравнений. При анализе достоверности выявленных микроэволюционных изменений в изоляте 110c достоверными считались те изменения, которые имели 5 и более покрытий в карте упорядоченных ридов. В результате проведенного анализа в ряде CDS были обозначены 206 достоверных и 47 недостоверных изменений. Также, среди статистически достоверных генетических изменений была выделена подгруппа из 11 сомнительных перестроек, являющихся результатом перекрытий ридов.

Заключение. В итоге работы были получены достоверные результаты, отражающие степень изменения гипервариабельных участков геномов субкультур возбудителя мелиоидоза в зависимости от изменяемых условий культивирования. Изменения в кодирующих последовательностях возбудителя, возникшие в ходе экспериментального инфекционного процесса, в большинстве возвращаются к референсным при возвратном пассаже на искусственных питательных средах. Следующим этапом исследований будет расширенный анализ VNTR локусов и «обратимых» мутаций.

Список используемой литературы

Brett P.J., Woods D.E. Pathogenesis of and immunity to melioidosis // Acta tropica. - Vol.74. - 2000. - P.201-210.

Dance D.A.B. Melioidosis as an emerging global problem //Acta Trop. - 2000. - Vol.74. - P.115 - 119.

ПОЛНОГЕНОМНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ ШТАММОВ *V. CHOLERAE* O1 ЭЛЬ-ТОР ОГАВА, ВЫДЕЛЕННЫХ ВО ВРЕМЯ ВСПЫШКИ ХОЛЕРЫ В Г. МАРИУПОЛЬ В 2011 ГОДУ

Кулешов К.В.[1], Писаренко С.В.[2], Ковалев Д.А.[2], Тихонов С.Н.[3], Савельева И.В.[2], Савельев В.Н.[2], Василиева О.В.[2], Зинич Л.С.[3], Пидченко Н.Н.[3], Куличенко А.Н.[2], Шипулин Г.А.[1]

[1]ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия
[2]ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия
[3]ФГКУЗ «Противочумная станция Республики Крым» Роспотребнадзора

Введение. В мае-июле 2011 года в городе Мариуполь была зарегистрирована вспышка холеры (33 случая заболевания и 25 случаев носительства инфекции), причиной которой, как было показано, являлся несанкционированный сброс загрязненных хозяйственно-бытовых сточных вод в систему ливневой канализации, непосредственно связанной с реками Кальчик и Кальминус, впадающими в Азовское море.

Согласно проведенным микробиологическим и молекулярно-биологическим исследованиям этиологиче-

ским агентом случаев заболевания являлись ctxB+, tcpA+ изоляты *V.cholerae* O1 Эль-Тор Огава.

После этой вспышки в рекреационной зоне города Таганрог из морской воды Азовского моря был выделен токсигенный штамм *V.cholerae* O1 Эль-Тор Инаба - 2011EL-301.

Целью исследования являлся ретроспективный анализ генетических особенностей изолятов, выделенных во время вспышки в г. Мариуполь, а также проверка гипотезы о возможной связи между вспышкой холеры на Украине и единичным случаем выделения холерного вибриона из окружающей среды на территории Российской Федерации.

Материалы и методы. В работе были исследованы два изолята *V.cholerae* - 31 и 39. Изолят 39 был выделен 6 июня 2011 из сточных вод, а 31 являлся клиническим изолятом, выделенным от больного холерой 4 июня 2011. Фенотипирование и тесты на антибиотикорезистентность проводили на основе МУК 4.2.2218-07"Лабораторная диагностика холеры ".

ДНК-библиотеки для полногеномного секвенирования готовили из 70 нг ДНК с использованием набора Ion XpressTM Plus Fragment Library Kit (Life Technologies, США). Последующее секвенирование проводили на платформе Ion Torrent PGM с использованием Ion 318 Chips KitV2 (Life Technologies, США).

Биоинформатический анализ включал 2 этапа. Первый этап заключался в определении единичных высококачественных полиморфизмов, которые использовались для последующего филогенетического анализа с применением различных подходов. Второй этап сводился к анализу геномных регионов, ассоциированных с вирулентностью и антибиотикорезистентностью (SXT-ICE, VSP-I, VSP-II, TLC, VPI-1 и VPI-2)

Основные результаты. Чтобы достоверно определить филогенетическое положение исследуемых изолятов в контексте глобального разнообразия *V.cholerae*, мы использовали широкомасштабную выборку изолятов (n=206), которые были изолированы в 28 странах с 1937 по 2014 г. Они относились к историческим и современным эпидемиям холеры и спорадическим случаям, некоторые из которых были ассоциированными с заносами инфекции.

Филогенетический анализ с использованием геномных данных показал, что мариупольские и таганрогские изоляты холеры относились к различным субкладам 3-ей волны седьмой пандемии холеры. Данный факт напрямую свидетельствует об отсутствии генетической связи и безосновательности гипотезы о заносе холеры из Украины на территорию России. Интересно, что изолят 2011EL-301 формирует монофилитическую группу с изолятами RND18826 (занос из Таджикистана в 2005), 81 (речная вода, р. Темерник в 2014), различающимися между собой всего лишь на 4-3 из 2946 SNP.

Сравнительный анализ мариупольских изолятов показал, что клинический изолят и изолят из окружающей среды группировались вместе и относились к уникальной филогенетической линии, которая характеризовалась наличием 6 клад-специфических SNP, а также высоким значением статистической поддержки клады. Это свидетельствует об отсутствии непосредственных связей с ранее выявленными вспышками, изоляты которых были представлены в выборке для сравнения. Более того, близость изолятов 31 и 39 подтверждает роль контаминированных сточных вод как элемента сложной цепочки распространения инфекции во время вспышки. Определение даты происхождения общего предка между изолятами 31 и 39 (2010 (95% HPD: 2010–2011)) приблизительно соответствовало дате начала вспышки, первый случай которой был зафиксирован 29 мая 2011г.

Касательно положения клады мариупольских штаммов среди сравниваемых изолятов 7-ой пандемии можно выделить, что клада «Мариуполь» разделяет общего предка с кладой «Гаити\Непал-4», представленной изолятами, ассоциированными с масштабной вспышкой на Гаити в 2010 году. Поэтому можно с уверенностью говорить, что вспышечный штамм произошел на территории Южной Азии и впоследствии был занесен в Мариуполь. При этом согласно датировке узлов занос этого штамма мог произойти в период с 2009 по 2010 гг.

Высокое число различных SNP между кладами «Гаити\Непал-4» и «Мариуполь» (n=7) говорит об отсутствии прямой связи между этими изолятами, и как следствие несостоятельности гипотезы о заносе гаитянских штаммов на территорию Украины.

Согласно результатам сравнительного анализа структуры геномных регионов, ассоциированных с вирулентностью, исследуемые изоляты характеризовались признаками, которые свойственны современным атипичным вариантам холерного вибриона, в частности прототипному штамму CIRS101 (Бангладеш, 2002). Все мариупольские изоляты характеризовались наличием VSP-II региона с делецией области генов VC0495–VC0512, гибридным профагом (*RstR* - Эль-Тор и *ctxB7* - классический). Элемент STX-ICE был идентичен ICE*VchHai1* по геному контенту и нес гены резистентности к *strAB*, *sul2*, *dfrA* и *floR*.

Заключение. Использование методов полногеномного секвенирования позволило нам продемонстрировать, что мариупольские изоляты принадлежат к токсигенным атипичным вариантам *V. cholerae* O1 Эль-Тор, характеризующимся множественной антибиотикорезистентностью. Мариупольские изоляты формируют уникальную кладу внутри третьей волны седьмой пандемии холеры. Наиболее значимой особенностью, относительно положения исследуемых штаммов в контексте глобального разнообразия холерных вибрионов, является то, что мариупольские изоляты очень близки к группе гаитянских и непальских штаммов. Данный факт может указывать, что на территории Южной Азии незадолго до вспышек холеры на Гаити и в Мариуполе происходило формирование вирулентных клонов холерного вибриона, имеющих высокий потенциал к глобальному распространению.

В целом, представленная работа вновь подтверждает высокую ценность полногеномного секвенирования в комбинации с современными методами филогенетического анализа как мощного инструмента при расследовании вспышек и идентификации возможной территории происхождения штаммов в глобальном масштабе.

РАЗРАБОТКА СПОСОБА ВЫЯВЛЕНИЯ В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ РНК ВИРУСА БЕШЕНСТВА МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Александрова Н.М.[1,2], Самерханов И.И.[2]

[1]ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Россия
[2]ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности – ВНИВИ», Казань, Россия

Введение. Особо опасной острой инфекцией центральной нервной системы является бешенство. К ней восприимчивы все теплокровные, включая человека. Возбудителем заболевания является вирус *Rabiesvirus* из рода *Lyssavirus*, семейства Rhabdoviridae. Род *Lyssavirus* включает четырнадцать видов, и только один представлен классическим возбудителем бешенства *(rabiesvirus)*, который циркулирует во всем мире и поддерживается в природе межвидовой передачей практически повсеместно (кроме Австралии и некоторых островов).

До недавнего времени наиболее чувствительным и достоверным методом диагностики бешенства в России являлась классическая биопроба на белых мышах с последующей идентификацией антигена вируса бешенства методом флуоресцирующих антител (МФА).

Однако у биопробы существует ряд недостатков: продолжительность исследования (в отрицательных случаях до 30 суток), потенциальная опасность выноса возбудителя болезни, а также невозможность исследования разложившегося материала. Кроме того, постановка биопробы неэкономична, требует особого виварного помещения и обслуживающего персонала.

Альтернативой являются молекулярно-генетические методы выявления вируса бешенства, в частности, ОТ-ПЦР. Данный метод включает в себя выделение РНК вируса из вируссодержащей суспензии, амплификацию РНК вируса в ОТ-ПЦР со специфичными олигонуклеотидными праймерами и идентификацию продуктов ОТ-ПЦР с помощью электрофореза в агарозном геле. Данный метод (с момента доставки материала) позволяет поставить диагноз за один рабочий день.

В России для проведения ОТ-ПЦР используется диагностический набор праймеров на консервативную область гена нуклеопротеина фиксированного штамма вируса бешенства CVS, циркулирующего на территории Новосибирской области среди диких и домашних животных, в полевых и клинических образцах.

Для более полной характеристики и расширения диапазона исследований, эпизоотических изолятов и вакцинных штаммов вируса бешенства нами разработаны синтетические олигонуклеотидные праймеры на ген гликопротеина вируса бешенства. Создана ПЦР тест-система для диагностики вируса бешенства в клинических и патологических образцах.

Цель и задачи. Целью наших исследований было оптимизировать диагностику бешенства молекулярно-генетическими методами. Для её решения были поставлены следующие задачи:

1. Провести дизайн праймеров.
2. Создать новую ПЦР тест-систему.
3. Определить её пригодность для диагностики бешенства.

Материалы и методы. Исходным материалом для постановки ОТ-ПЦР служили образцы РНК возбудителя бешенства, полученные из клинического и патологического материала (слюна, биоптат кожи, мозговая суспензия и др.) из Республики Татарстан, и в качестве контролей использовались вакцины против бешенства и референтные штаммы вируса бешенства.

Выделение РНК из образцов головного мозга животных и клинического материала осуществляли стандартным способом с использованием коммерческого набора «РИБО-сорб», производства ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, выпускаемый фирмой ООО «ИнтерЛабСервис», Россия. Проведение реакции обратной транскрипции для получения к-ДНК осуществляли стандартным способом с использованием коммерческого набора «Реверта-L» производства того же института, выпускаемого ООО «ИнтерЛабСервис», Россия.

Основные результаты. Нами проведен дизайн и разработаны синтетические олигонуклеотидные праймеры на ген гликопротеина вируса бешенства, амплифицирующие участок гена гликопротеина в 755 п.н. Создана ПЦР тест-система для диагностики вируса бешенства в клинических и патологических образцах. Программа амплификации состоит из температурных режимов, представленных в таблице 1.

Таблица 1. Программа амплификации кДНК рабического вируса

Температура	Экспозиция	Количество циклов
95^{0}C	4 мин	1
92^{0}C	10 с	40
58^{0}C	15 с	
72^{0}C	30 с	
72^{0}C	2 мин	1
10^{0}C	Хранение	

Для определения чувствительности реакции контрольный вирус бешенства, производственный штамм «Овечий» ГНКИ титровали методом 10-кратных разведений до 10^7 LD_{50}/мл, каждое разведение подвергали исследованию в ПЦР.

Чувствительность разработанной ОТ-ПЦР составила 1,3 lg LD_{50}/мл.

В результате тестирования созданной ПЦР тест-системы с гетерологичными ДНК (провирусная ДНК BLV, ДНК из мозговой ткани здоровой коровы, ДНК из мозговой ткани крысы, ДНК из мозговой ткани лошади, ДНК из мозговой ткани собаки, ДНК из мозговой ткани кролика) не выявлено ни одного положительного результата, т.о. специфичность составила 100%.

При помощи созданной ПЦР тест-системы было исследовано 317 диагностических проб из Республики Татарстан и выявлено 38 изолятов возбудителя бешенства.

Заключение/выводы. Разработанный способ позволяет проводить эффективное выявление РНК штаммов и изолятов вируса бешенства в патологическом и клиническом материале, а также сократить сроки проведения исследований до 6 часов, снизить себестоимость диагностики в 9,8 раза, трудозатраты – в 40 раз.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА В ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОМ НАДЗОРЕ ЗА ЧУМОЙ В ГОРНО-АЛТАЙСКОМ ВЫСОКОГОРНОМ ПРИРОДНОМ ОЧАГЕ

Балахонов С.В.[1], Кутырев В.В.[3], Михайлов Е.П.[2], Ярыгина М.Б.[1], Рождественский Е.Н.[2], Базарова Г.Х.[2], Корзун В.М.[1], Остяк А.С.[1], Витязева С.А.[1]

[1] ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Иркутск, Россия
[2] ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора, Горно-Алтайск, Россия
[3] ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Россия

Введение. В настоящее время из всех природных очагов чумы, расположенных в Российской Федерации, Горно-Алтайский высокогорный природный очаг наиболее активен как в эпизоотическом, так и в эпидемическом отношении. Со времени обнаружения первых эпизоотических проявлений в 1961 г. значительно увеличилась энзоотичная по чуме территория. С начала 90-х годов очаг характеризуется высокой эпизоотической активностью. В 2012 г., впервые за весь период его мониторинга, в нескольких километрах от границы с Монголией был изолирован высоковирулентный штамм чумного микроба основного подвида – *Yersinia pestis subsp. pestis*. На этом фоне в последние годы произошли кардинальные изменения в биоценотической структуре, эпизоотической обстановке, эпидемическом потенциале очага. Интенсивные и разлитые эпизоотии чумы в поселениях серого сурка в Юго-Восточном Алтае, обусловленные *Y.pestis subsp. pestis*, привели к существенному увеличению эпидемического потенциала территории. Это проявилось спорадическими случаями заболевания людей бубонной чумой в Кош-Агачском районе Республики Алтай (2014, 2015 и 2016 гг.).

Цель работы – внедрение современных методов молекулярной диагностики в систему эпидемиологического надзора в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге чумы.

Материалы и методы. Для осуществления эпидемиологического надзора за чумой в Горно-Алтайском природном очаге внедрены современные методы молекулярной диагностики и типирования *Y. pestis* в полевом и клиническом материале. Используются полимеразная цепная реакция (ПЦР), масс-спектрометрическое белковое профилирование (MALDI ToF-MS), скрининг плазмид, фрагментный и полногеномный анализ методом секвенирования. Для оценки потенциальной эпидемической опасности изолируемых штаммов чумного микроба и их углубленного изучения проводится оценка молекулярно-генетических характеристик с применением мультилокусного анализа вариабельного числа тандемных повторов по 25 локусам (MLVA – Multiple-Locus variable number tandem repeats analysis).

Основные результаты. С 2015 г. в практике эпизоотологического обследования Горно-Алтайского природного очага чумы стал использоваться метод ПЦР, с применением которого исследуется весь полевой материал. Впервые внедрено исследование этим методом костных останков млекопитающих, что позволило существенно расширить возможности ретроспективного эпидемиологического анализа обследуемой территории.

Также с помощью экспериментального набора праймеров yp2769ms06 и yp3057ms09 проводится внутривидовая дифференциация чумного микроба. В качестве дополнительного инструмента углубленного изучения штаммов, изолируемых в очаге, применяется сравнительный анализ их протеомов методом MALDI ToF-MS. Скрининг плазмидного спектра используется для более глубокого изучения изолированных штаммов и позволяет идентифицировать их подвидовую принадлежность. У всех штаммов, изолируемых в очаге, проводится MLVA-анализ по 25 вариабельным локусам. С помощью этого метода было установлено, что наибольшее сходство штаммы основного подвида, выделенные в очаге из полевого и клинического материала от больных людей, имеют со штаммами, изолированными в природном очаге Хуух-Сэрх-Мунх-Хаирхан, расположенном на территории Северо-Западной Монголии и непосредственно примыкающем к трансграничному Сайлюгемскому очагу чумы, в состав которого и входит Горно-Алтайский природный очаг РФ. Применение вышеперечисленных методов в практике эпизоотологического обследования очага позволило получить дополнительную информацию о закономерностях циркуляции чумного микроба, пространственном

распространении возбудителя основного и алтайского подвидов, что важно для оперативной и ретроспективной оценки эпизоотической ситуации в природном очаге, краткосрочного прогнозирования ее развития и определения направленности и объемов первоочередных и долговременных профилактических мероприятий.

Экспресс-диагностика с использованием молекулярно-генетических методов при расследовании трех случаев заболевания человека чумой, зарегистрированных в Кош-Агачском районе Республики Алтай в 2014, 2015 и 2016 гг., позволила в кратчайшие сроки (в течение нескольких часов) установить предварительный диагноз у больных и выделить ДНК чумного микроба у одного из контактировавших первого порядка. Во многом это способствовало эффективному проведению противоэпидемических мероприятий, направленных на локализацию и ликвидацию эпидемических очагов, и предотвращению антропонозного распространения инфекции.

Заключение. Таким образом, применение молекулярно-генетических методов лабораторной диагностики в последние годы способствовало оптимизации системы эпидемиологического надзора за чумой в Горно-Алтайском природном очаге.

АНАЛИЗ ВНУТРИВИДОВОЙ КОНКУРЕНЦИИ В БИОПЛЕНКЕ *Vibrio cholerae* КЛАССИЧЕСКОГО И ЭЛЬТОР БИОВАРОВ С ПОМОЩЬЮ INDEL-МАРКЕРОВ

Водопьянов С.О., Веркина Л.М., Водопьянов А.С., Олейников И.П., Егиазарян Л.А., Титова С.В.

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора», г. Ростов-на-Дону, Россия

Полагают, что из семи известных пандемий холеры шесть первых были вызваны вибрионами классического биовара. В 1906 году на карантинной станции Эль-Тор (Синайский полуостров) был выделен новый вид возбудителя холеры — вибрион Эльтор. С 1961 г. началась седьмая пандемия холеры, вызванная возбудителем Эльтор. Классические вибрионы в настоящее время практически не встречаются. Причина смены возбудителя заболевания до настоящего времени не установлена.

Недавно на основе анализа INDEL-маркеров показано, что токсигенные вибрионы Эльтор обладают различной устойчивостью к внутривидовой конкуренции с атоксигенными вибрионами, выделяемыми из объектов внешней среды. Не исключено, что исследование выявленного свойства вибрионов может отчасти объяснить факт смены возбудителя.

Целью настоящей работы была оценка внутривидовой конкуренции вибрионов классического и Эльтор биоваров на основе INDEL-маркеров.

При анализе INDEL-маркеров, входящих в состав зарегистрированной базы данных «Гены, позволяющие дифференцировать токсигенные и нетоксигенные штаммы *Vibrio cholerae* и проводить внутривидовое типирование» отобран INDEL-маркер sigE, позволяющий однозначно дифференцировать два вида штаммов холерного вибриона с использованием одной пары праймеров. Классические штаммы формировали продукт амплификации размером 56 п.о., а штаммы Эльтор из-за вставки участка в 15 нуклеотидов давали ампликон размером 71 п.о. При проведении ПЦР со смесью штаммов изучаемых биоваров в различном соотношении было установлено, что амплификация успешно проходит с обеих матриц (с и без делеции). При этом различия в молекулярной массе ампликонов наглядны и легко позволяют надежно детектировать даже минорное количество каждой INDEL-аллели в смешанных пробах.

В работе использовали токсигенный штамм *V. cholerae* Эльтор 19613, выделенный из воды р. Дон, и семь токсигенных штаммов классического биовара, выделенных в период 1888-1950 гг., из коллекции музея живых культур института. Формирование биопленки проводили по описанной методике (Титова С.В., 2015) в 30 мл стерильной водопроводной воды, при комнатной температуре, в качестве твердого субстрата использовали пластинки (0,5 х 1,5 см) из пищевого пластика. После окончания инкубации для анализа биопленок пластиковые пластины трижды промывали стерильной водопроводной водой, высушивали на листе фильтровальной бумаги и помещали в пробирку типа эппендорф емкостью 1,5 мл содержащую 1,0 мл деионизованной воды. Параллельно исследовали пробы инкубационной смеси на наличие планктонных форм. Обеззараживание проб и выделение ДНК проводили немедленно после получения образца путем температурного лизиса, прогревая пробирки при 99 °С в течение 30 минут. Анализ продуктов ПЦР проводили в 10% геле полиакриламида.

В первой серии опытов при соотношении классического и Эльтор штаммов 1:1 во всех пробах было обнаружено быстрое исчезновение амплификата размером 56 п.о. и наличие только амплификата размером 71 п.о. Этот результат указывал на полное вытеснение штаммов классического биовара штаммами Эльтор.

Поэтому в последующих экспериментах было использовано соотношение 2:1 в пользу штаммов классического биовара. В этих условиях эксперимента обнаружено, что классические вибрионы преобладают в планктонной фазе. В то же время в составе биопленки, адгезированной на пластике, преобладали клетки Эльтор. Причем это различие в составе биопленки наблюдалось уже через 24 часа инкубации и сохранялось весь период наблюдения (15 суток). Это позволило сделать вывод, что наблюдаемый феномен не является результатом более быстрого размножения вибрионов Эльтор в составе смешанной биопленки.

Полученные результаты свидетельствовали, что клетки *V. cholerae* классического биовара обладают сниженной способностью к колонизации и формированию биопленки по сравнению с вибрионами Эльтор. Учитывая существенную роль процесса колонизации различных поверхностей в экологии водных микроорганизмов, не ис-

ключено, что выявленный феномен сниженной колонизирующей активности отчасти может обуславливать факт вытеснения вибрионов классического биовара вибрионами Эльтор, вызвавшими седьмую пандемию. На наш взгляд для проверки этого предположения необходимы дополнительные исследования.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ЭВОЛЮЦИЯ ВИРУСА КРЫМСКОЙ-КОНГО ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ НА ЮГЕ РОССИИ

Волынкина А.С., Лисицкая Я.В., Котенев Е.С., Писаренко С.В., Куличенко А.Н.

ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия

Введение. Вирус Крымской-Конго геморрагической лихорадки является одним из наиболее генетически разнообразных среди арбовирусов. В настоящее время на основании частичных и полных нуклеотидных последовательностей S- и L-сегментов генома вируса ККГЛ выделяют 7 генотипов вируса, имеющих корреляцию с географическим местом выделения. Анализ частичных и полных последовательностей M-сегмента позволяет выделить 6 генетических групп. Описана возможность рекомбинационных изменений генома вируса ККГЛ и реассортационного обмена сегментами, приводящих к формированию новых генетических вариантов вируса [1, 2].

Методы молекулярно-генетического анализа вируса ККГЛ, основанные на секвенировании участков генома, нашли широкое применение для идентификации изолятов вируса. Использование методов сиквенс-типирования вируса ККГЛ дает возможность решать задачи эпидемиологии КГЛ на молекулярном уровне, в т.ч. моделировать пространственно-временное распространение генетических вариантов вируса, проводить оценку динамики эволюционных изменений вирусной популяции.

Цель исследования – изучение генетического разнообразия вируса ККГЛ, циркулирующего на территории юга России, реконструкция эволюционной истории генотипа «Европа-1» (V) вируса ККГЛ.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили образцы полевого и клинического материала, положительные на наличие РНК вируса ККГЛ, с достаточной вирусной нагрузкой, собранные в 2007-2016 гг. в субъектах ЮФО и СКФО.

Генетическое типирование изолятов РНК осуществляли методом секвенирования 3 участков генома вируса: фрагментов S-сегмента генома (538 п.о.), фрагмента M-сегмента генома (435 п.о.) и фрагмента L-сегмента генома (437 п.о.) с последующим филогенетическим анализом. Полноразмерные S-, M- и L-сегменты генома вируса ККГЛ амплифицировали в виде 20 перекрывающихся фрагментов (размером 650-1465 п.о.), с использованием авторского набора праймеров. Секвенирование амплифицированных геномов проводили с использованием генетического анализатора Ion Torrent PGM.

Реконструкцию эволюционной истории вируса ККГЛ генотипа «Европа-1», осуществляли с использованием методов Байесовой филогении в программном обеспечении BEAST 2.0. Анализ молекулярных часов и дискретной филогеографии выполняли по алгоритму GTR+G, используя модель молекулярных часов Relaxed Clock Log Normal и демографическую модель популяции Coalescent Constant Population, вычисления проводили для 50000000 генераций.

Основные результаты. Проведено секвенирование фрагментов S-, M- и L-сегментов генома вируса ККГЛ, выявленного в 500 пробах сывороток крови больных и 100 пробах суспензий клещей, собранных в 2007-2016 гг. Филогенетические деревья, построенные по фрагментам S-, M-, и L- сегментов генома имели сходную топологию. Исследуемые образцы кластеризовались с представителями 3 генотипов: «Европа-1» (V) (593 образца), «Африка-3» (III) (1 образец) и «Калмыкия» (VII) (6 образцов). В пределах генотипа «Европа-1» российские штаммы относились к 4 подгруппам (субтипам): Va («Ставрополь-Ростов-Астрахань-1»), Vb («Волгоград-Ростов-Ставрополь»), Vd («Крым») и Vc («Астрахань-2). Среди изолятов вируса ККГЛ, генотипа «Европа-1» выявлены нереассортантные варианты вируса: S:Va-M:Va-L:Va, - 403 образца, S:Vb-M:Vb-L:Vb – 130 образцов, S:Vd-M:Vd-L:Vd – 4 образца и реассортантные геноварианты, S-, M-, и L- сегменты генома которых кластеризуются с представителями различных субтипов: S:Va-M:Vb-L:Va - 41 образец, S:Vb-M:Va-L:Vb - 1 образец, S:Vb-M:Vb-L:Va - 2 образца, S:Va-M:Vb-L:Vb - 2 образца, S:Vb-M:Va-L:Va - 5 образцов, S:Vc-M:Va-L:Va - 2 образца, S:Vc-M:Vb-L:Va - 3 образца.

Выполнено полногеномное секвенирование 21 изолята вируса ККГЛ, относящихся к разным субтипам генотипа «Европа-1»:, в т.ч. 2 изолятов субтипа Vd, 5 реассортантных изолятов (S:Vc-M:Va-L:Va, S:Va-M:Vb-L:Va) 8 изолятов субтипа Vb и 6 изолятов субтипа Va. Секвенированные последовательности депонированы в базу данных GenBank (номера доступа: KR814837-KR814893, KU161582-KU161587).

С целью реконструкции эволюционной истории вируса ККГЛ генотипа «Европа-1», построения модели пространственно-временного распространения штаммов, относящихся к разным субтипам на основании полноразмерных нуклеотидных последовательностей S-, M- и L-сегментов генома 27 штаммов данного генотипа выполнен анализ молекулярных часов и дискретной филогеографии. При анализе по S-,M- и L- сегментам были получены различающиеся результаты. Скорость эволюции сегментов генома вируса ККГЛ генотипа «Европа-1» составила для S-сегмента $2,77*10^{-4}$, для M-сегмента $1,2*10^{-4}$, для L-сегмента $6,65*10^{-5}$ нуклеотидных замен на 1 сайт в год. Возраст генотипа «Европа-1» (tMRCA) составил 171, 307 и 356 лет при анализе по S-, M- и L- сегментам соответственно, tMRCA субтипа Va составил 49, 72, 97 лет, субтипа Vb - 56, 115, 69 лет, субтипа Vd - 19, 41, 52 года, подгруп-

пы турецких штаммов - 44, 52, 54 года. Возраст субтипа Vc определен на основании анализа S-сегмента - 9 лет.

При анализе по S-сегменту установлено, что ближайший общий предок штаммов генотипа «Европа-1» был занесен на территорию Ставропольского края, откуда распространился в трех направлениях: в Ростовскую область, Турцию, и Крымский полуостров. Анализ по M-сегменту показал, что общий предок штаммов генотипа «Европа-1» наиболее вероятно циркулировал в Ростовской области, и в дальнейшем был занесен в Турцию и Ставропольский край. Из Ставропольского края мигрировал на территорию Балканского и Крымского полуостровов. При анализе по L-сегменту установлено, что ближайший предок генотипа «Европа-1» был занесен в Турцию, затем последовательно на Балканский, Крымский полуостров, территорию Ставропольского края и Ростовской области.

Выводы. Результаты молекулярно-генетического мониторинга популяции вируса ККГЛ на юге России позволили установить преобладание изолятов генотипа «Европа-1», Также, на юге России выявлены изоляты, относящиеся к новому для изучаемой территории генотипу «Африка-3», и генотипу «Калмыкия». В пределах генотипа «Европа-1» выявлены реассортантные варианты вируса ККГЛ. Несоответствие результатов анализа молекулярных часов и дискретной филогеографии вируса ККГЛ генотипа «Европа-1» на основе полноразмерной нуклеотидной последовательности S-, M- и L-сегментов генома свидетельствует о различном происхождении сегментов вируса ККГЛ, а также возможном существовании в прошлом единого очага КГЛ на территории Европы, Турции и России, и происходившем процессе генетического обмена между российскими, турецкими и балканскими штаммами.

Список используемой литературы:

1. Bente, D.A. Crimean-Congo hemorrhagic fever: history, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity / D.A. Bente, N.L. Forrester, D.M. Watts et al. // Antiviral research. - 2013. - Vol. 100, N 1. - P. 159-189.

2. Hewson, R. Evidence of segment reassortment in Crimean-Congo haemorrhagic fever virus / R. Hewson, A. Gmyl, L. Gmyl et al. // The Journal of general virology. - 2004. - Vol. 85, N 10. - P. 3059-3070.

ВЫЯВЛЕНИЕ SNP-МАРКЕРОВ И КОНСТРУИРОВАНИЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВНУТРИВИДОВОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* В ПЦР С ПОМОЩЬЮ АЛЛЕЛЬ-СПЕЦИФИЧЕСКИХ ЗОНДОВ

Трухачев А.Л.[1], Коновалова Н.В.[2,3], Васильева Е.А.[1], Кузнецова Д.А.[1], Благодатских К.А.[2,3], Сочивко Д.Г.[3]

[1]ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия
[2]ФГБНУ «ВНИИСБ», Москва, Россия
[3]ЗАО «Синтол», Москва, Россия

Возбудитель чумы относится к виду *Yersinia pestis*, который включает штаммы основного подвида, способные быть эпидемически опасными для людей, и штаммы неосновных подвидов (*altaica, caucasica, hissarica, ulegeica*), эпидемически не опасные. Выяснение вопросов эпидемической значимости штаммов является важным условием правильного и эффективного эпидемического анализа и контроля над чумой. Кроме того, внутривидовая дифференциация штаммов возбудителя чумы является необходимым инструментом для полной характеристики выделенных культур *Yersinia pestis*.

Известен способ подвидовой дифференциации штаммов возбудителя чумы методом секвенирования [Ерошенко Г.И. и др., 2009], заключающийся в выделении хромосомной ДНК исследуемого штамма, проведения ПЦР с использованием праймеров AraC-s/AraC-as и RhaS-s/RhaS-as, секвенирования амплифицированных фрагментов и дифференциации по подвидам путем сравнения полученного генотипа с генотипами основного и неосновных подвидов. Описан также способ дифференциации штаммов *Yersinia pestis* различных подвидов и биоваров методами ПЦР и мультилокусного сиквенс-типирования [Ерошенко Г.И. и др., 2011]. Подобные исследования могут быть проведены только в крупных специализированных лабораториях диагностических и референс-центров с использованием дорогостоящих оборудования, реагентов и программ для анализа полученных результатов. Еще предложены способы идентификации и внутривидовой дифференциации штаммов вида *Yersinia pestis* [Трухачев А.Л. и др., 2009; Ерошенко Г.И. и др., 2012], в которых авторы определяют, к какой группе относится исследуемый штамм в ПЦР с помощью праймеров, выявляющих Indel мутации у штаммов различных подвидов. В первой работе выявляется последовательность CDS39, находящаяся в плазмиде pMT у штаммов неосновных подвидов и отсутствующая у штаммов основного подвида. Недостатком этого метода является отсутствие учета результата реакции в режиме реального времени, а также невозможность идентифицировать штаммы при утрате плазмиды, несущей мишени для праймеров. Во втором случае ПЦР- дифференциация основана на отсутствии в геноме штаммов основного подвида в генах terC и ilvN последовательности ДНК в 89 и 45 пар нуклеотидов, соответственно, которые присутствуют в генах штаммов неосновных подвидов. Однако и этот способ дифференциации проходит в ПЦР с учетом результатов с помощью электрофоретического разделения фрагментов ДНК. Ни один из перечисленных способов, за исключением последних двух, не позволяет в одной реакции в диагностической лаборатории первого уровня провести дифференциацию штаммов основного и неосновных подвидов и оперативно с минимальными материальными затратами определить эпидемическую значимость исследуемого микроорганизма.

Цель нашей работы: разработка нового диагностического набора реагентов, позволяющего в ПЦР с учетом результатов в реальном времени дифференцировать штаммы основного и неосновных подвидов возбудителя чумы, с использованием в качестве мишеней обнаруженных нами ранее SNP-маркеров.

На первом этапе работы было проведено SNP типирование нуклеотидных последовательностей штаммов *Y. pestis* различных подвидов. Обнаружено, что у штаммов неосновных подвидов в нуклеотидной последовательности гена YP_002346399.1, кодирующего ftsK/SpoIIIE family protein, который предположительно связан с сегрегацией ДНК, в положении 3056–го нуклеотида находится гуанин, тогда как у штаммов основного подвида в этом положении расположен аденин (референтный штамм *Y.pestis* CO92).

На основании полученных данных была синтезирована пара праймеров, направляющая амплификацию фрагмента ДНК, содержащего выявленный SNP-маркер, и два аллель-специфических зонда, комплементарных последовательностям *Y. pestis* основного и неосновных подвидов соответственно: праймеры: ftsKfor (5`-TCATCGTTGGTGTCAGTTGC-3`), ftsKrev (5`-TGGCGATGATGACGTTT-3`) и аллель-специфические зонды: ftsKProbaA (5`-Fam-AACTGGTACAGAA**A**CAACTGATACA-RTQ1-3`), ftsKProbaG (5`-Hex-GGTACAGAA**G**CAACTGATACAAAA-BHQ2-3`).

В ходе работы протестировано 89 штаммов (50 основного и 39 неосновных подвидов) возбудителя чумы в слепых пробах. Результаты тестирования показали, что предложенный набор реагентов надежно и просто (в одной пробирке) позволяет проводить дифференциацию между штаммами основного и неосновных подвидов.

Известно, что существуют наборы реагентов, позволяющие проводить дифференциацию конкретных подвидов возбудителя чумы. Мы предлагаем использовать наш дифференцирующий набор для определения, принадлежит ли обнаруженный в пробе возбудитель к неосновным подвидам или нет. И в зависимости от результата проводить дальнейшее тестирование с целью выяснения, к какому конкретному биовару основного подвида или к какому неосновному подвиду относится возбудитель.

Набор реагентов выпускается компанией «ЗАО» Синтол» в комплектации, 2,5 х Реакционная смесь (Содержит все необходимые компоненты для проведения ПЦР), 2,5 х Разбавитель, Taq ДНК полимераза 5 Ед/мкл, ПКО 1 A/A ДНК штаммов основного подвида, ПКО 2 G/G ДНК штаммов неосновных подвидов, ОКО.

Список используемой литературы

1. Ерошенко Г.И., Куклева Л.М, Одиноков Г.Н. и др. Способ подвидовой дифференциации штаммов возбудителя чумы методом секвенирования / Патент RU №2404256 C12Q 1/68, от 04.05.2009.

2. Ерошенко Г.И., Куклева Л.М. Павлова А.И. Способ дифференциации штаммов *Yersinia pestis* различных подвидов и биоваров методами полимеразной цепной реакции и мультилокусного сиквенс-типирования / Патент RU №2471872. C12Q 1/68, C12N15/11, от 08.09.2011 г.

3. Трухачев А.Л., Лебедева С.А., Васильева Е.А., и др. Способ идентификации и внутривидовой дифференциации штаммов вида *Yersinia pestis* / Патент RU №2404251 кл. C12Q 1/00, от 29.04.2009;

4. Ерошенко Г.И., Одиноков Г.Н., Куклева Л.М., и др. Стандартный алгоритм молекулярного типирования штаммов *Yersinia pestis //* Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2012. № 3. С. 25-35.

ГЛОБАЛЬНАЯ ФИЛОГЕОГРАФИЯ *BRUCELLA MELITENSIS*

Писаренко С.В., Ковалев Д.А., Волынкина А.С., Куличенко А.Н.

ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия

Бруцеллез – особо опасное, зоонозное инфекционное заболевание, вызываемое бактериями рода *Brucella*, имеющее медико-социальную и экономическую значимость [1, 2]. Род *Brucella* представлен 10 видами микроорганизмов, классификация которых основана на способности паразитировать преимущественно в организме определенных видов животных, фенотипических и биохимических свойствах [3]. Вид *B. melitensis*, поражающий мелкий рогатый скот, вызывает у людей наиболее тяжелые формы заболевания. По данным Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору в Российской Федерации отмечается увеличение количества больных сельскохозяйственных животных и неблагополучных пунктов по бруцеллезу крупного (КРС) и мелкого (МРС) рогатого скота. Ежегодно в России регистрируется более 340 случаев впервые выявленного бруцеллеза у людей. Основная часть выявляемых случаев заболевания бруцеллезом в Российской Федерации приходится на долю Северо-Кавказского, Южного и Сибирского федеральных округов [4].

Актуальным направлением фундаментальных научных исследований является изучение генетического разнообразия и истории эволюции штаммов возбудителя бруцеллеза. На основе анализа полногеномных последовательностей по локусам единичных полиморфных нуклеотидов (SNP), локализованных в ортологичных генах штаммов *B. melitensis*, Kim Ke Tan была предложена схема распределения генетических вариантов возбудителя, изолированных на территории разных континентов [5]. В соответствии с регионом выделения изоляты *B. melitensis* были разделены на пять основных генотипов: I – Средиземноморье, II – Азия, III – Африка, IV – Европа, V – Америка. В своем предыдущем исследовании, основываясь на данных полногеномного SNP анализа, мы показали, что штаммы, изолированные в Южном и Северо-Кавказском федеральных округах, относятся ко II (Азия) генотипу *B. melitensis*, образуя ранее не описанный подгенотип IIh [6].

Цель настоящего исследования заключалась в проведении глобального эволюционно-филогеографического анализа штаммов *B. melitensis*.

В работе использовали геномные последовательности 98 штаммов *B. melitensis*, в том числе: 76 геномов из международной базы данных DDBJ/EMBL/GenBank, а также геномные последовательности 22 штаммов *B. melitensis*, изолированных на территории Российской Федерации: в Южном, Северо-Кавказском и Сибирском федеральных округах.

Полногеномное секвенирование изолятов, выделенных на территории Российской Федерации, осуществляли с помощью платформы высокопроизводительного секвенирования IonTorrent PGM. Сборку геномов проводили с помощью программного обеспечения Newbler 3.0, для аннотации геномных проектов использовали алгоритм Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAAP). Полученные нуклеотидные последовательности геномных сборок депонированы в базу данных DDBJ/EMBL/GenBank. Поиск SNP в геномах 98 штаммов *B. melitensis* осуществляли с помощью web-сервера REALPHY 1.10 [7], используя в качестве референсной последовательности геном штамма *B. melitensis* 16M (GCA_000007125.1).

Для изучения эволюционно-филогеографического распределения таксонов на основе анализа SNP 98 геномов штаммов *B. melitensis* использовали программный пакет BEAST 2.3.0 [8]. Параметры эволюционной модели были определены с помощью программы jModelTest2 [9]. Байесовский MCMC анализ был проведен с использованием модели General Time Reversible (GTR). Оценку достоверности филогенетического дерева проводили в программе Tracer v 1.6 [10].

В результате исследований расшифрованы геномные последовательности 22 штаммов *B. melitensis*, изолированных на территории Российской Федерации. Проведен глобальный эволюционно-филогеографический анализ распределения штаммов возбудителя, в результате которого определена принадлежность штаммов *B. melitensis*, изолированных на территории Российской Федерации, к нескольким различным подгенотипам азиатского генотипа в соответствии с местами их географической локализации, что свидетельствует об общности происхождения штаммов *B. melitensis*, циркулирующих в России и в регионах Центральной Азии. Для каждого генотипа впервые охарактеризован набор уникальных специфичных нуклеотидных полиморфизмов.

Литература

1. Plumb G.E., Olsen S.C., Buttke D. Brucellosis: One Health challenges and opportunitie. // Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. – 2013. – vol. 32. – P. 271-278.

2. Nicoletty P. Brucellosis: past, present and future.// Prilozy. – 2010. – vol.31. – P.21-32.

3. Ficht T. *Brucella* taxonomy and evolution. Future Microbiol. 2010 Jun; 5(6):859-66. PMID: 20521932. Referenced in doi: 10.2217/fmb.10.52.

4. Лямкин Г.И., Пономаренко Д.Г., Худолеев А.А., Русанова Д.В., Вилинская С.В., Куличенко А.Н. Обзор эпидемиологической ситуации по бруцеллезу в Российской Федерации в 2015 г. и прогноз на 2016 г.//Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – № 2. – С. 11-13.

5. TanK.-K., TanY.-C., ChangL.-Y., LeeK. W., Nore1S. S., YeeW.-Y.et all. Full genome SNP-based phylogenetic analysis reveals the origin and global spread of Brucella melitensis // BMC Genomics. – 2015. – V 16. – P. 93-104.Referenced in doi: 10.1186/s12864-015-1294-x

6. Писаренко С.В., Ковалев Д.А., Хачатурова А.А., Волынкина А.С., Русанова Д.В., Куличенко А.Н. Филогеография штаммов *Brucella melitensis* на основе анализа SNP полных геномов // Бактериология. – 2016. – № 1. – С. 73-79.

7. BertelsF., SilanderO.K., PachkovM., RaineyP.B., NimwegenE. Automated reconstruction of whole genome phylogenies from short sequence reads. // Molecular Biology and Evolution. – 2014. – V 31 (5). – P. 1077-1088.

8. Bouckaert R., Heled J., Kühnert D., Vaughan T., Wu C-H., Xie D., Suchard M.A., Rambaut A., Drummond A.J. BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. // PLoS Computational Biology. – 2014. – vol. 10(4). – e1003537. doi:10.1371/journal.pcbi.1003537.

9. Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. // Nature Methods. – 2012. – vol. 9(8).– P. 772.

10. Rambaut A., Suchard M.A., Xie D., Drummond A.J. Tracer v1.6, 2014. Available from http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer

БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ INDEL-ЛОКУСОВ *Vibrio cholerae*

Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Олейников И.П.

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия

Метод VNTR-типирования нашел широкое применение для изучения различных возбудителей, включая возбудителей особо опасных инфекций. В случае возбудителя чумы исследование проводят по 25 VNTR-локусам [Платонов, 2013]. VNTR-анализ *Vibrio cholerae*, как правило, включает в себя изучение пяти локусов тандемных повторов, что обеспечивает достаточно высокую дискриминирующую активность [Водопьянов, 2004; Cho, 2010; Okada, 2012]. Однако штаммы вибрионов, не содержащие ген токсинкоррегулируемых пилей в составе первой хромосомы, одновременно утрачивают локус VcB, локализованный в составе островка патогенности второй хромосомы [Водопьянов, 2014], что несколько ограничивает интерпретацию результатов типирования по пяти локусам. Данное обстоятельство делает необходимым расширение числа молекулярных маркеров, используемых при проведении молекулярного типирования вибрионов.

Некоторые гены живых организмов несут спонтанные вставки/делеции (insertion/deletion) нескольких нуклеотидов. Данный феномен положен в основу нового метода - молекулярного INDEL-типирования, который уже с успехом применяется для генотипирования возбудителей туляремии и чумы [Larsson 2007; Никифоров 2016].

Последние годы отмечены резким прорывом в изучении генетической организации возбудителя холеры, что проявилось в секвенировании сотен различных изо-

лятов, выделенных в различных регионах мира и создании баз данных. Однако системного биоинформационного анализа генома холерного вибриона на наличие INDEL-маркеров не проводилось.

Целью настоящей работы было проведение компьютерного биоинформационного анализа базы полногеномных сиквенсов холерного вибриона с целью выявления наиболее информативных INDEL-локусов.

Для поиска INDEL-локусов использовали локальную базу, содержащую 434 полногеномных сиквенса *Vibrio cholerae*, представленных в GenBank. Анализ проводили с помощью авторской программы GeneExpert. Для дальнейшей работы отобрали девять INDEL-локусов, локализованных в составе первой и второй хромосомы (Таблица 1). При проведении виртуальной ПЦР установлена высокая информативность выявленных локусов. Так, INDEL-локусы достоверно идентифицировались в структурах 97-99 % изученных сиквенсов, единственное исключение составил локус CheA, аллели которого были выявлены в 94 % изученных генетических структур. На основании этих результатов можно заключить, что INDEL-типирование более подходит для анализа *in silico* чем прием VNTR-типирования, поскольку при проведении виртуального типирования процент идентифицированных VNTR-локусов был гораздо ниже [Водопьянов, 2014].

При анализе 434 полногеномных сиквенсов с помощью виртуальной ПЦР со сконструированными праймерами установлен высокий консерватизм распределения выявленных INDEL-маркеров у токсигенных вибрионов. Так, все 18 штаммов классического биовара были представлены одним INDEL-генотипом с формулой CoA- 98, OmpU- 166, hutG-159, 2456- 87, 122- 79, 704- 77, 3186- 67, CheA- 169 и p1070- 80 нуклеотидных пар. Все 274 ctx+ tcpA+ штаммов биовара Эльтор и семь токсигенных штаммов серовара O139 также были представлены одним INDEL-генотипом, отличающимся изменением в двух локусах 2456- 78 и p1070-67 нуклеотидных пар. Это наблюдение, на наш взгляд, свидетельствует об общности происхождения токсигенных штаммов O1 Эльтор и O139.

Интересный результат был получен при анализе 17 нуклеотидных последовательностей ctx- tcpA+ штаммов биовара Эльтор- 15 штаммов имели INDEL-генотип токсигенных вибрионов, а два штамма, в том числе P-18785, выделенный во время вспышки в г. Каменске [Онищенко, 2007], отличались изменением только в локусе 3186. При углубленном анализе полногеномных сиквенсов была установлена высокая степень генетической близости атоксигенного (ctxA- tcpA+) штамма *V. cholerae* O1 P-18785 токсигенному (ctxA+ tcpA+) штамму *V. cholerae* MS6, выделенному в 2008 году в Таиланде. Более подробный анализ позволил выявить, что характерной особенностью указанных двух штаммов является наличие гена гемолизина D, отсутствующего у всех остальных штаммов. На наш взгляд, это не только подтверждает генетическую близость между штаммами *V. cholerae* MS6 и P-18785, но и позволяет использовать наличие гена гемолизина D в качестве уникального признака «Каменско-Таиландских» штаммов.

В противовес высокому консерватизму INDEL-локусов у всех токсигенных и пилированных вибрионов, нетоксигенные апилированные вибрионы отличались высокой гетерогенностью- при изучении 12 сиквенсов штаммов серогруппы O1 выявлено 8 различных INDEL-генотипов. Столь же высокая гетерогенность была характерна и для нетоксигенных штаммов неO1/не O139. Анализ 36 полногеномных сиквенсов выявил 23 отдельных INDEL-генотипов.

Полученные данные позволяют рассматривать набор INDEL-маркеров, выявленный при проведении компьютерного анализа полногеномных сиквенсов холерного вибриона, как весьма перспективный для изучения вибрионов. Особый интерес будет представлять использование предложенного метода для анализа нетоксигенных штаммов стабильно выделяемых из объектов внешней среды Российской Федерации. На наш взгляд, для достижения максимальной дискриминирующей силы исследования целесообразно сочетать приемы VNTR- и INDEL-типирования.

Таблица 1. Характеристика INDEL-локусов, обнаруженных при анализе 434 полногеномных сиквенсов *Vibrio cholerae*, представленных в GenBank и сконструированных праймеров

N	Обозначение локуса	Продукт, детерминируемый выявленным локусом	Хромосома	Размер ампликона
1	CoA	trans-2-enoyl-CoA reductase	2	98/83
2	OmpU	outer membrane protein OmpU	1	166/133
3	hutG	formimidoylglutamase	1	171/159
4	2456	hypothetical protein	1	87/78
5	122	hypothetical protein	2	79/65
6	704	spermidine/putrescine ABC transporter	1	77/71
7	3186	type II secretion protein	1	74/67
8	CheA	chemotaxis protein CheA	1	193/169
9	p1070	нетранслируемая область	2	80/67

РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ ДОТ-ИММУНОАНАЛИЗА ДЛЯ ПАРАЛЛЕЛЬНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ РАЗЛИЧНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ В ФОРМАТЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО МИКРОЧИПА

Киреев М.Н., Уткин Д.В., Шарапова Н.А., Волох О.А.

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Российская Федерация

Введение.

Качественно новый уровень диагностики инфекционных болезней может быть достигнут при проведении множественного параллельного анализа, направленного на одновременное выявление нескольких видов специфических маркеров. Иммуночипы, предназначенные для распознавания специфической реакции «антиген-антитело», стали логическим продолжением развития методов диагностики на основе иммуноферментного, дот-иммуноанализа, обеспечивая возможность одновременного выявления маркеров десятков инфекций, сохраняя при этом высокую чувствительность скрининговых методов, высокую специфичность подтверждающих тестов и небольшие объемы исследуемого образца.

Цель и задачи.

Разработка биологического микрочипа (иммуночипа) для параллельного определения специфических антител к антигенам возбудителей чумы, туляремии, бруцеллеза в биологическом материале.

Материалы и методы.

Для конструирования биочипа использовали персональный миниплоттер «XactII™ Microarray System» («LabNEXT», США), нитроцеллюлозные мембраны с диаметром пор 0,2 мкм и 0,45 мкм (Schleicher & Schuell, Германия) и очищенные антигены возбудителей (капсульный антиген F1 чумного микроба, липополисахарид (ЛПС) возбудителя туляремии и комплексный бруцеллезный антиген). Препараты брали в концентрации 1 мг/мл. Антигены наносили методом контактной печати в виде дискретно расположенных точек диаметром 300 мкм, образующих буквы «Ч» - для выявления чумных антител, «Т» - для туляремийных антител и «Б» - для бруцеллезных. Антигены наносили по 10 нл в буфере для печати (фосфатно-солевой буфер (ФСБ), содержащий 5% глицерина и 0,01% твин-20). Все три антигена наносили в зону печати размером 4×5 мм.

Для выявления специфических антител нитроцеллюлозную мембрану инкубировали в течение 20 мин при температуре 37 °С в одной из изучаемых сывороток, разведенной 0,9% раствором NaCl 1:100. Сайты связывания мембраны блокировали 3% раствором бычьего сывороточного альбумина в течение 15 мин при температуре 37 °С, отмывали ФСБ и проявляли универсальным конъюгатом стафилококкового белка А с наночастицами золота. Учет проводили визуально. Для документирования результатов использовали фотокамеру.

Основные результаты.

В результате специфического взаимодействия поликлональных антител и антигенов на мембране в течение 5-7 мин проявлялись буквы: «Ч» - при наличии в тестируемой сыворотке антител к капсульному антигену чумного микроба, «Т» - при наличии антител к ЛПС возбудителя туляремии и «Б» - при наличии бруцеллезных антител. Для усиления окрашивания использовали соли серебра.

Заключение.

Таким образом, данная система позволяет проводить анализ на наличие нескольких видов специфических антител. Перевод традиционного дот-иммуноанализа в формат биологического иммуночипа приводит к сокращению объема биологического материала, антигенов, используемых для конструирования тест-системы, автоматизации процесса изготовления.

Применение конъюгата стафилококкового белка А с наночастицами золота позволяет исследовать биологический материал разных видов животных и клинический материал от человека.

Расположение специфических антигенов в виде матрицы начальных букв позволяет упростить процедуру учета результатов, исключить дорогостоящее оборудование - флуоресцентные сканеры для биочипов. Тест-система может быть использована как в стационарных, так и в мобильных лабораториях при проведении полевых исследований.

ПОЛНОГЕНОМНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ И КЛАССИФИКАЦИЯ ШТАММОВ *Yersinia pestis* ИЗ ОЧАГОВ СТРАН СНГ И БЛИЖНЕГО ЗАРУБЕЖЬЯ

Ерошенко Г.А., Краснов Я.М., Носов Н.Ю., Кутырев В.В.

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

На территории стран Содружества Независимых Государств и ближнего зарубежья действуют 45 природных очагов чумы, расположенных в равнинных и горных ландшафтах Кавказа и Закавказья, Северного и Северо-Западного Прикаспия, Сибири и Средней Азии. Очаги чумы расположены в различных ландшафтно-географических зонах и имеют разную биоценотическую структуру, что является причиной многообразия циркулирующих здесь штаммов *Yersinia pestis*. По принятой в странах СНГ подвидовой классификации штаммы возбудителя чумы делятся на пять подвидов: основной подвид *Y. pestis subspecies (ssp.) pestis* (высоковирулентные и эпидемически значимые штаммы) и четыре неосновных подвида – *ssp. caucasica, ssp. altaica, ssp. hissarica, ssp. ulegeica* (избирательно вирулентные штаммы с низкой эпидемической значимостью).

В РосНИПЧИ «Микроб» собрана большая коллекция штаммов *Y. pestis*, представляющих подвидовое разнообразие возбудителя чумы из очагов стран СНГ и ближнего зарубежья. Развитие современных молекулярно-генетических методов и технологии полногеномного секвенирования позволяют определить современную популяционную структуру и глобальную филогению *Y. pestis*, однако, они будут неполными, если в них будут отсутствовать данные по штаммам из многочисленных природных очагов стран СНГ и сопредельных государств.

Целью нашего исследования было провести молекулярно-генетический анализ и полногеномное секвенирование штаммов *Y. pestis* из природных очагов Российской Федерации, других стран СНГ и ближнего зарубежья. В задачи исследования входило получить полногеномные последовательности штаммов *Y. pestis*, референтные для очагов и очаговых территорий, для совершенствования проводимого в очагах эпидемиологического мониторинга чумы; определить современную популяционную структуру вида с учетом штаммов из очагов стран СНГ и установить место этих штаммов в мировой филогении *Y. pestis*.

Материалы и методы. Исследована коллекция штаммов *Y. pestis* из природных очагов чумы стран СНГ и ближнего зарубежья. Выполнено полногеномное секвенирование 72 штаммов из этих очагов. Все штаммы изучены с помощью разработанной системы ПЦР- и SNP типирования, основанной на использовании indel мутаций и SNPs, маркерных для подвидов, биоваров и отдельных популяций штаммов.

Полногеномное секвенирование выполняли в системе Ion PGM (Life technologies). Для обработки данных использовали Ion Torrent Suite software package 3.4.2 и Newbler gsAssembler 2.6. Полногеномный SNP анализ штаммов *Y.pestis* проводили с помощью программ Wombac 2.0, Mega 6.0, Paup 4.0, PhyML 3.1 и алгоритма Maximum Likelihood, а также Bionumerics 7.6 и алгоритма Maximum Parsimony. Для секвенирования ПЦР фрагментов использовали ABI Prism 3500XL (Applied Biosystems).

Результаты. С помощью методов молекулярно-генетического анализа исследовано 420 штаммов *Y. pestis* из природных очагов чумы Российской Федерации, стран СНГ и ближнего зарубежья. Проведено полномное секвенирование 72 штаммов из этих очагов. Получены полногеномные референтные последовательности штаммов для большинства природных очагов чумы стран СНГ. Установлено, что в 7 из 11 очагов чумы РФ распространены штаммы средневекового биовара, которые относятся к наиболее молодой филогенетической линии этого биовара 2.MED1. Штаммы средневекового биовара высоко вирулентны и эпидемически значимы, неоднократно вызывали эпидемии и вспышки чумы на территории России и сопредельных государств. Установлено, что в Центрально-Кавказском высокогорном очаге чумы в РФ наряду со штаммами ветви 2.MED1 циркулируют штаммы наиболее древней ветви средневекового биовара 2.MED0. Штаммы 2.MED0 занимают промежуточное положение между штаммами античного биовара ветви 2.ANT и штаммами средневекового биовара 2.MED. Также установлено, что средневековые штаммы ветви 2.MED1 циркулируют в большинстве природных очагов Кавказа и Закавказья (Азербайджан, Армения, Грузия), а также в большинстве очагов Казахстана и Средней Азии (Туркмения, Узбекистан, Кыргызстан). Штаммы средневекового биовара ветви 2.MED1 делятся по филогеографическому принципу на две ветви – Кавказско-Каспийскую и Среднеазиатско-Китайскую. Установлено, что в разных очагах РФ и стран СНГ распространены штаммы античного биовара разных филогенетических линий. В Тувинском горном и Горно-Алтайском высокогорном очагах сохранилась древняя эндемичная популяция штаммов 4.ANT, а в Забайкальском степном очаге выделены штаммы античного биовара 2.ANT3. Впервые показано, что в высокогорных очагах Тянь-Шаня в Кыргызстане широко распространены штаммы самой древней ветви античного биовара 0.ANT. Штаммы этой ветви в античную эпоху вызвали первую пандемии чумы (Юстинианова чума, 541-543 гг.).

В РФ и очагах стран СНГ широко представлены и штаммы неосновных подвидов. В очагах Кавказа и Закавказья циркулируют штаммы кавказского подвида, (филогенетическая ветвь 0.PE2), в Горно-Алтайском высокогорном очаге в Сибири – штаммы алтайского подвида 0.PE4a, в Гиссарском высокогорном очаге в Таджикистане – штаммы гиссарского подвида 0.PE4h, в Таласском высокогорном очаге в Киргизии – штаммы таласской популяции 0.PE4t.

На основе полногеномного SNPs анализа секвенированных нами штаммов и всех штаммов *Y. pestis*, представленных в базе данных NCBI GenBank, построена дендрограмма филогенетических связей, и определена современная популяционная структура вида с включением в нее штаммов из очагов стран СНГ и ближнего зарубежья. На ее основе нами разработана новая подвидовая классификация возбудителя чумы, в которой выделены пять подвидов: основной, *ssp. pestis* (биовары античный, средневековый, восточный); кавказский, *ssp. caucasica*; центральноазиатский, *ssp. central asiatica* (биовары алтайский, гиссарский и microtus); улегейский, *ssp. ulegeica*; ангольский, *ssp. angelica*. Возможно также выделить еще один подвид – *ssp. tibetica*, который представлен пока только двумя штаммами из Тибета в Китае.

Заключение. Получены новые данные по филогенетическому разнообразию штаммов *Y. pestis* из природных очагов чумы стран СНГ и ближнего зарубежья, с учетом которых определена современная популяционная структура вида, и разработана новая подвидовая классификация возбудителя чумы. Получены полногеномные последовательности штаммов *Y. pestis*, референтные для природных очагов стран СНГ, которые могут быть использованы для повышения эффективности проводимого в очагах мониторинга чумы.

ИЗУЧЕНИЕ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИХ СВЯЗЕЙ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS*

Трухачев А.Л.[1], Водопьянов А.С.[1], Васильева Е.А.[1], Лебедева С.А.[1], Ракин А.В.[2]

[1]ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия
[2]Институт гигиены и медицинской микробиологии им. Макса фон Петтенкофера, Мюнхен, Германия

Генотипирование штаммов является одним из важных инструментов, с помощью которых происходит изучение гено- и фенотипических свойств микроорганизмов. Полученные данные о генотипировании в дальнейшем могут быть широко использованы в таксономии, филогении и диагностике. Нами ранее осуществлена работа по SNP – типированию генома различных штаммов возбудителя чумы (Трухачев А.Л. и др. Мол. диагностика 2010, 2014 гг.), в которой выявлены SNP - маркеры у штаммов *Yersinia pestis* различных подвидов и отдельных географических групп.

Целью настоящей работы было выяснение филогенетических связей у штаммов возбудителя чумы, использованных в работе.

В работе были использованы 25 штаммов *Yersinia pestis* для проведения фрагментарного секвенирования и сведения о нуклеотидных последовательностях различных генов 290 штаммов *Yersinia pestis*, обнаруженных в доступных генетических базах данных. Среди определенных для поиска SNP фрагментов ДНК было выявлено 79 вероятных точек замены нуклеотидов в различных штаммах возбудителя чумы и псевдотуберкулеза. Всего нами изучались 23 нуклеотидные последовательности 8 генов в 25 штаммах *Yersinia pestis.* Анализ выявленных 79 SNP проводился с помощью разнообразных инструментов сравнения. Продолжение этих исследований позволило проследить филогенетическую связь между штаммами и построить на основании полученных данных сравнительного анализа дендрограмму. Для проведения сравнительного анализа полученных нуклеотидных последовательностей фрагментов ДНК были использованы компьютерные программы Vector NTI11 (Invitrogen), BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov), CLC Genomics Workbench 9.0 (Qiagen Bioinformatics), BioEdit [http://bioedit.software.informer.com] и Sequence Scanner v.1.0 [http://appliedbiosystems.com]. В последующем сравнительный анализ проводили с помощью компьютерной программы «Astrolabe», разработанной во ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. Программа позволяет помимо сравнительного анализа последовательностей проводить поиск последовательностей, имеющих комплементарные участки в базах данных в Интернете и их также автоматически включать в работу. Построение филогенетического дерева также было выполнено с использованием компьютерной программы «Astrolabe».

Результаты исследования филогенетических связей были оформлены в виде дендрограммы. Некоторые генотипические группы, представляющие практический интерес, представлены в таблице 1.

Таблица 1. Некоторые кластеры генотипов штаммов *Yersinia pestis,* выявленные при SNP типировании

Кластеры	Представители кластеров		Примечания
A	A1	*Y. pestis* KIM10, *Y. pestis* KIM27	Иран, *mediaevalis*
	A2	*Y. pestis 192, Y. pestis 715*	Центральный Кавказ, *mediaevalis*
	A3	*Y. pestis* PAR3	Иран, *mediaevalis*
	A4	*Y. pestis* K1973002	Иран, *mediaevalis*
	A5	*Y. pestis* Nepal	Непал, *mediaevalis*
D	*Y. pestis* И-126, Y. *pestis* 2420		Монголия
	Y. pestis A-1804, *Y. pestis* A-1818		*talassica*
	Y. pestis A-1724		*hissarica*
	Y. pestis И-2231		*ulegeica*
	Y. pestis И-2377		*altaica*
	Y. pestis Microtus 91001		Китай
E	*Y. pestis* Angola		Африка, *antiqua*
F	F1	*Y. pestis* 110, *Y.pestis* 652	Армения, *caucasica*
	F2	*Y. pestis 336*, *Y. pestis 377*	Азербайджан, *caucasica*
		Y. pestis C-540, *Y. pestis* C-715	Дагестан, *caucasica*
		Pestoides F, Pestoides G	Грузия, *caucasica*

Сравнение SNP в геномах позволило распределить изученные штаммы по генотипическим группам. Это распределение выявило две особенности генотипов штаммов, выделенных на территории России. Первая особенность касается штаммов неосновных подвидов. Было установлено, что штаммы *subsp. caucasica* неоднородны и разделены на две подгруппы (F1 и F2). Второй особенностью стало близкое родство штаммов, выделенных в Цен-

трально-Кавказском очаге и в Иране. Эти штаммы на филогенетическом дереве расположены в группе штаммов, относящихся к генотипу А, и распределены в подгруппы А1 – А4 соответственно. Еще одна подгруппа группы А представлена штаммом, выделенным в Непале (А5), который, по всей видимости, наиболее близок по генотипу к вышеупомянутым штаммам. Полученные результаты могут быть использованы для пополнения генетических паспортов штаммов, уточнения их таксономических позиций и для внутривидовой дифференциации штаммов *Yersinia pestis.*

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ИЗОФОРМ CAF1 *YERSINIA PESTIS*

Кадникова Л.А., Копылов П.Х., Комбарова Т.И., Соломенцев В.И., Мухина Т.Н., Благодатских С.А., Майская Н.В., Богун А.Г.

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Россия

Введение. Caf1 (F1), капсульный антиген *Yersinia pestis,* представляет собой мультифункциональный белок, ответственный в основном за антифагоцитарную активность и является основным ключевым защитным компонентом возбудителя чумы. Изучение защитной капсулы *Y. pestis* интересно тем, что она является главным компонентом чумных вакцин и основной мишенью для лабораторной диагностики чумы.

Было показано, что некоторые из штаммов *Y. pestis*, выделенных на территории Грузинского и Армянского природных очагов чумы, имели NT2 аллель гена *caf1*, отличающуюся от типичной аллели NT1 по единственной нуклеотидной замене (Ala48→ Ser) [1,2]. Было показано, что эта замена характерна для всех штаммов биовара *caucasica*, циркулирующих на территории Закавказского высокогорного природного очага чумы № 4–6 и биовара *caucasica,* выделенного из Приараксинского низкогорного очага № 7 [3]. Также был найден новый NT3 тип аллели, эндемичный для Дагестанского высокогорного природного очага чумы № 39, отличающийся от других изоформ положением 117 аминокислоты (V117) [3].

Цель и задачи. Изучить иммуногенные свойства всех трёх изоформ ($Caf1_{NT1,}$ $Caf1_{NT2}$ $Caf1_{NT3}$) капсульного антигена чумного микроба, а именно серологическую перекрёстную активность и перекрёстную протективность.

Материалы и методы. В работе были использованы штаммы фонда Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур (ГКПМ-Оболенск) - вирулентные штаммы *Y. pestis* 231 (NT1), С-376 (NT2) и С-824 (NT3). Все три изоформы Caf1 проверяли иммунохроматографическим тестом для выявления и индикации возбудителя чумы: «ИХ тест-система *Y. pestis*» (ФБУН ГНЦ ПМБ) по прилагающейся инструкции. Серологическую перекрёстную реактивность Caf1 изоформ *Y. pestis* оценивали с помощью ИФА метода. Образцы крови были получены от мышей семейства BALB/c под анестезией с использованием CO_2 газа. Титры антител определяли с помощью непрямого ИФА за день до вторичной иммунизации Caf1 антигеном и после на 43 день, вычисляли средний титр.

Перекрёстную протективность оценивали с помощью индекса иммунитета (II) по формуле: ИИ = $LD_{50имм}$/ $LD_{50инт}$, где ИИ - это индекс иммунитета; $LD_{50имм}$ это для животных, иммунизированных антигеном при исследовании, $LD_{50инт}$ для животных, иммунизированных только с помощью носителя (интактные). Для оценки LD_{50}, через 45 дней после бустерной дозы, четыре группы мышей заражали вирулентными штаммами, продуцирующие другие изоформы Caf1. Каждая группа была подразделена на три подгруппы по 32 мыши, которые были заражены 10-кратным разведением вирулентных штаммов *Y. pestis* (B-6896 (NT1), B-6520 (NT2) и B-7005 (NT3). Остальные животные наблюдались в течение трёх недель.

Основные результаты. Проведенная оценка перекрестной серологической активности трех изоформ Caf1 показала, что отечественные коммерческие иммунохроматографические тест-полоски выявляют все три варианта белка с одинаковой эффективностью (1,0 нг/мл). Очевидно, что использованные в тест-системе моноклональные антитела распознают незатронутый мутацией эпитоп, идентичный у всех трех изоформ, а значит, все они могут быть легко обнаружены с помощью антитела, используемого в данном методе.

После обоих этапов иммунизации, титры антител, определённые методом ИФА, были в 4-7 раз выше у животных, иммунизированных изоформой $Caf1_{NT1}$, независимо от антигена, адсорбированного на планшете. Гуморальный ответ на иммунизацию изоформой $Caf1_{NT3}$ был самым низким. Интересно отметить, что повторные иммунизации этими изоформами привели к несколько более низкой реакции антител.

Изоформа NT1, которая традиционно используется в коммерческих и экспериментальных вакцинах, обладает лучшими протективными свойствами (табл.1).

Таблица 1. Показатели индекса иммунитета

Штамм *Y. pestis*	**Изоформа антигена**		
	EV ($Caf1_{NT1}$)	**B-6520**($Caf1_{NT2}$)	**B-7005** ($Caf1_{NT3}$)
B-6896 ($Caf1_{NT1}$)	**> 5270**	9.4	527
B-6520($Caf1_{NT2}$)	3996	**1264**	225
B-7005 ($Caf1_{NT3}$)	1125	1125	**3556**

Таким образом, иммунизация NT1 изоформой частично защищает животных от инфекции, вызванной NT1 и NT2 изоформами даже при большой дозе. Вакцинация NT2 изоформой защищает от инфекции, вызванной изоформами NT2 и NT3, но менее эффективна против носителей NT1.

Заключение. В результате проведённых экспериментов на мышиной модели, были сделаны выводы: титры антител положительно коррелируют с индексом иммунитета. Например, индекс иммунитета в группе мышей, иммунизированных $Caf1_{NT1}$ изоформой, была выше, чем в других группах, эти мыши имели более высокие титры антител. В противоположность этому, мыши, иммунизированные $Caf1_{NT2}$ или $Caf1_{NT3}$ типами, имели более низкий индекс иммунитета и более низкую иммунореактивность по ИФА.

Работа выполнена в рамках проекта РНФ № 14-15-00599 от 26.06.2014 г. "Поиск факторов избирательной вирулентности полевочьих штаммов *Yersinia pestis*" от 21.07.2014 г.

Список используемой литературы:

1. Garcia E,WorshamP, Bearden S, Malfatti S, Lang D, LarimerF, et al. Pestoides F, an atypical *Yersinia pestis* strain from the former Soviet Union. Adv Exp Med Biol. 2007; 603:17–22. PMID: 17966401

2. Revazishvili, T., Rajanna C., Bakanidze L., Tsertsvadze N., Imnadze P., O'Connell K., Kreger A., Stine O. C., Morris Jr J. G., Sulakvelidze A. Characterisation of *Yersinia pestis* isolates from natural foci of plague in the Republic of Georgia, and their relationship to *Y. pestis* isolates from other countries. Clin. Microbiol. Infect., 2008, doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.01953.x\

3. P. K. Kopylov, M. E. Platonov, V. G. Ablamunits, T. I. Kombarova, S. A. Ivanov, L. A. Kadnikova, A. N. Somov, S. V. Dentovskaya, V.N. Uversky, A. P. Anisimov. *Yersinia pestis* Caf1 protein: Effect of sequence polymorphisms on intrinsic disorder propensity, serological cross-reactivity and cross-protectivity of isoforms. PLOS ONE, September 8, 2016.

РЕЗУЛЬТАТЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ РЯДА ПРИРОДНЫХ ШТАММОВ БРУЦЕЛЛ ИЗ ФОНДА ГОСУДАРСТВЕННОЙ КОЛЛЕКЦИИ ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ ФКУЗ РОСНИПЧИ «МИКРОБ»

Касьян Ж.А., Осина Н.А., Альхова Ж.В., Краснов Я.М., Ляшова О.Ю., Осин А.В.

ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия

До настоящего времени видовая идентификация бруцелл остается серьезной проблемой. Одним из перспективных направлений в решении данного вопроса является использование молекулярно-генетических технологий, направленных на детекцию фрагментов генома патогена, специфичных для каждого таксона. Среди таких приемов - рекомендованные Всемирной организацией здравоохранения системы AMOS-DEL и Bruce-Ladder [Lopez-Goni *et al.,* 2008, Ica *et al.,* 2012], разработанный для идентификации всех биоваров *B. suis,* а также видов *B. canis* и *B. microti* метод Suis-Ladder [Lopez-Goni *et al.,* 2011], генодиагностический препарат «Ген *Brucella* – идентификация – РГФ» [Касьян Ж.А. с соавт.,2016], рестрикция генов *omp25, omp2a, omp2b* [Cloeckaert A. et al., 1995]. Эффективность применения указанных выше подходов для молекулярной идентификации бруцелл была показана нами ранее при исследовании 44 природных штаммов возбудителя бруцеллеза из фонда Государственной коллекции ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», выделенных в 1932-2014 гг. из различных источников [Осина Н.А. с соавт., 2016]. У большинства штаммов бруцелл была подтверждена (29) и уточнена (11) их видовая и биоварная принадлежность. Однако, в ряде случаев, провести идентификацию патогенов было затруднительно, поскольку результаты по одному или сразу по нескольким методам были нетипичными: *B. suis* С-450, *B. suis* С-451, *B. abortus* 3143-П, *B. abortus* С-549.

В связи с этим целью нашей работы было дальнейшее изучение данных природных штаммов бруцелл для уточнения их таксономического положения.

Для получения дополнительной информации о генетической организации штаммов *B. suis* С-450 и С-451, выделенных от лесных мышей, проведен анализ VNTR локусов Bruce 06 и Bruce 11 в соответствии с рекомендациями по MLVA-типированию бруцелл (mlva.u-psud.fr/brucella). При исследовании локуса Bruce 06 наблюдалось амплификация фрагмента размером 140 п.н. (1 повтор), характерного для штаммов *B. suis* 5 биовара. При изучении участка Bruce 11 у этих культур отмечено образование фрагмента 567 п.н. (7 повторов), что согласовывалось с полученными нами ранее результатами анализа с применением системы Suis-Ladder. Однако в работе Lopez-Goni [2011] не было описано наличие аллели локуса Bruce 11, содержащей 7 повторов ни для одного из существующих пяти биоваров *B. suis.* Исходя из результатов исследования штаммы *B. suis* С-450 и С-451 могут быть идентифицированы как новый субтип *B.suis* 5 биовара.

При анализе штамма *B. abortus* 3143-П также были получены нетипичные результаты. Дальнейшее его исследование с помощью оптимизированного способа определения видовой принадлежности бруцелл, основанного на амплификации ДНК- мишеней: *bcsp31, BRA0420, BRA0541, BMEI1426, BMEII0711, BMEI0994,* показало отсутствие в его геноме локуса *BMEI0994.* В совокупности с полученными ранее данными можно предположить наличие у него нехарактерной для *B. abortus* делеции *BMEI0994-BMEI1012.* В то же время, проведенное полногеномное секвенирование показало максимальную близость данного штамма к виду *B.abortus.*

Наибольший интерес вызывают результаты исследования штамма *B. abortus* С-549, выделенного от мышевидных грызунов в Австралии в 1980 г. Ранее, при его из-

учении с помощью набора реагентов «Ген *Brucella* – идентификация – РГФ», системы Bruce-Ladder и рестрикционного анализа были получены новые амплификационные и рестрикционные профили, не соответствующие ни одному из характерных для видов или групп видов бруцелл [Осина Н.А. с соавт., 2016]. Для уточнения таксономического положения этого штамма проведен его анализ методом ПЦР с определением наличия родоспецифичного гена *bcsp31* и генов, в различной степени встречающихся в геноме видов бруцелл (таблица 1).

Таблица 1. Результаты исследования вариабельности генов у штамма *B. abortus* С-549

Названия локуса	Наличие/ отсутствие у *B.ab.* С-549	Наличие или отсутствие у других видов бруцелл
BRA 0367	-	Присутствует у некоторых биоваров *B.suis*
BRA 0378	-	Делетирован у *B.abortus, B.melitensis, B.ovis, B.suis* 5 bv
BRA 0418-BRA0432	-	Делетирован у *B.abortus*
BRA 0541	+	Делетирован у *B.melitensis*
BRA 0907	+	Делетирован у *B.melitensis*
BR 0262	-	Делетирован у *B.abortus* и *B.ovis*
BMEI 0752	+	Делетирован у *B.melitensis*
BMEI 0929	+	Делетирован у *B.abortus 1 bv*
BMEI 0994- BMEI0998	-	Делетирован у *B.ovis*
BMEI 1426	+	Делетирован у *B.canis*
BMEI 1436	+	Делетирован у *B.canis*
BMEII 0428	+	Делетирован у *B.abortus* S19
BMEII 0635	-	Делетирован у *B.canis*
BMEII 0711	-	Делетирован у *B.neotomae*
BMEII 0843	-	Делетирован у *B.abortus*
BMEII 0987	+	Делетирован у *B.neotomae*

Установлено, что штамм *B. abortus* С-549 относится к роду *Brucella* spp., но не имеет схожести с каким-то конкретным видом бруцелл, а характеризуется отсутствием ряда генов, делетированных также у видов *B. abortus, B. ovis, B. canis* и *B. neotomae*.

В ходе дальнейшего полногеномного секвенирования этого изолята отмечено, что наиболее близкими с различием в 4 SNP и 22 SNP являются штаммы *Brucella sp.* NF2653, выделенный от *Melomys lutillus* в Австралии, и *Brucella sp.* 83/13, соответственно. Различия с веткой филогенетического дерева, на которой располагались основные виды бруцелл, составили порядка 24735 SNP.

Таким образом, данные, полученные при изучении штаммов *B. suis* С-450 и С-451, позволяют предположить возможность наличия двух субтипов *B. suis* 5 биовара. Анализ *B. abortus* 3143-П указывает на то, что он является генетически измененным вариантом вида *B. abortus*, с частичной утратой в кластере генов *BMEI0994-BMEI1012,* а *B. abortus* С-549 не принадлежит ни к одному из существующих видов бруцелл и может занимать отдельное место в таксономической классификации возбудителя бруцеллеза.

ПРИМЕНЕНИЕ ПОСТГЕНОМНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В ИЗУЧЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ НА ПРИМЕРЕ *YERSINIA PESTIS*

Котенева Е.А., Котенев Е.С., Царева Н.С., Калинин А.В., Зайцев А.А., Кот Л.А., Печковский Г.А., Абрамович А.В.

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь, Россия

Чума – зоонозная природно-очаговая бактериальная инфекция. Заражение человека в природном очаге чумы может происходить трансмиссивным путем – при укусе инфицированными блохами, контактным путем – от больных или погибших грызунов, при убое больных животных; воздушно-капельным – при контакте с больным легочной формой человеком. Эпидемиологические риски существенно повышаются, учитывая появление и распространение антибиотикорезистентных штаммов. На территории Российской Федерации находятся 11 при-

родных очагов чумы. Эпизоотии чумы в период с 2000 по 2015 годы зарегистрированы в 8 из 11 природных очагов, в которых выделено 1709 штаммов микроба чумы. С 2014 г. в России ежегодно отмечаются случаи заболевания человека (Попов и др., 2016). Устойчивая тенденция активизации ряда природных очагов чумы указывает на необходимость усиления роли эпизоотологического мониторинга для предотвращения случаев заболевания.

На территории Северного Кавказа и Закавказья циркулируют два подвида *Yersinia pestis*, основной *Y. pestis subsp. pestis* и кавказский *Y. pestis subsp. caucasica,* различающиеся по вирулентности, биохимическим признакам и наличию генетических детерминант патогенности. Дифференциация и типирование штаммов микроба чумы, выделенных на территории очагов, имеет большое значение для оценки степени напряженности эпизоотического процесса, выявления путей распространения возбудителя.

Цель работы – изучение штаммов *Y. pestis*, циркулирующих на территории Северного Кавказа и Закавказья, на основе MALDI-TOF масс-спектрометрического и протеомного анализа.

Объект исследования: 50 штаммов *Y. pestis*, изолированных в период с 1950 по 2012 годы на территории 7 природных очагов Северного Кавказа и Закавказья. Все штаммы предварительно идентифицированы до подвида. Большая часть штаммов (36 штаммов), выделенная на территории Центрально-Кавказского высокогорного (01), Дагестанского равнинно-предгорного (03), Прикаспийского песчаного (43), Закавказского равнинно-предгорного (08-13) природных очагов чумы, относится к основному подвиду *Y. pestis pestis*. На территории Восточно-Кавказского высокогорного (39) и Закавказского высокогорного (04-06) очагов выделены штаммы только неосновного подвида *Y. pestis caucasica*. Одновременная циркуляция штаммов основного и неосновного подвидов чумного микроба отмечена на территории Терско-Сунженского низкогорного (02) природного очага чумы.

Материалы и методы. Получение масс-спектрометрических профилей экстрактов клеток *Y. pestis* проводили с использованием масс-спектрометра Microflex LT «Bruker Daltonics». В качестве матрицы использовали насыщенный раствор α-гидроксикоричной кислоты (CHCA). В качестве калибранта использовали «Bacterial Test Standart» (Bruker Daltonics). Масс-спектры получали в диапазоне 2000-20000 Да, но основная масса пиков регистрировалась в диапазоне 2500-10000 Да. Каждый образец наносили в 8 повторах. Бактериальный стандарт наносили в 5 повторах на одну мишень. Спектры каждого штамма обрабатывали и анализировали в программе «FlexAnalysis». Создание суперспектра проводили из 20 единичных масс-спектров в программе MALDI Biotyper v. 3.0. по стандартному алгоритму. Для проверки качества MSP-дендограммы штаммов *Y. pestis* параллельно было проведено MLVA генотипирование исследованных штаммов, включающее 25 вариабельных локусов (Le Flèche et al., 2001; Li et al. 2009). Определение плазмидного профиля штаммов *Y. pestis* проводили, как описано ранее (Woron et al., 2006). Для представления эволюционных отношений между исследованными штаммами *Y. pestis* использовали программу START2 (www.pubmlst.org) и алгоритм UPGMA. Для идентификации специфических белков использовали комплект оборудования для 2-D электрофореза (Bio-Rad) и тандемный времяпролетный масс-спектрометр UltraflexTreme «Bruker Daltonics». Для дифференцирующего гель-электрофореза использовали комплект реагентов для флуоресцентного мечения белков CyDye DIGE Fluor labeling kit (GE Healfcare). Идентификацию белков проводили с использованием интерактивного ПО Mascote.

Результаты и обсуждение. Нами создана база масс-спектров 50 штаммов *Y. pestis* подвидов *pestis* и *caucasica*, выделенных на территории природных очагов чумы Северного Кавказа и Закавказья*,* предназначенная для проведения идентификации культур возбудителя чумы на базе программного обеспечения MALDI Biotyper v3.0, которая позволяет достоверно идентифицировать культуры чумного микроба с SV≥ 2,3-2,4 и дифференцировать их от культур близкородственных видов (*Y. pseudotuberculosis*). На основе анализа спектров была построена MSP-дендрограмма, отражающая филогенетические взаимоотношения между исследуемыми штаммами по наличию фрагментов родо- и видоспецифических белков в диапазоне детектируемых масс 2-20 кДа. В структуре MSP-дендрограммы выделяются 2 главные ветви, большая включает штаммы основного подвида, меньшая штаммы кавказского подвида чумного микроба. Топология MSP-дендрограммы подтверждена результатами MLVA генотипирования и дендрограммой, построенной по результатам молекулярно-генетического анализа. Как показал анализ пик-листов, видовая идентификация возбудителя чумы осуществляется по пептидным фрагментам, большинство из которых относятся к фрагментам рибосомальных (50S и 30S) и структурных белков. При анализе пик-листов и масс-спектров у большинства штаммов идентифицирован пик 3065 Да, который ранее был описан как видоспецифичный для штаммов *Y. pestis* (Lasch et al., 2010). Данный пик - это пептид размером 30 аа, который идентифицируется в базе данных UniprotKB как фрагмент белка активатора плазминогена, локализованного на плазмиде пестициногенности pPla (pPst). Высокая интенсивность специфического пика 3065 Да, обусловлена тем, что ген *pla*, кодирующий синтез белка-активатора плазминогена, является мультикопийным. Как показали наши исследования, данный дифференцирующий маркер характерен только для штаммов *Y. pestis* основного подвида, вне зависимости от биовара, имеющих плазмиду pPla (pPst). Штаммы несновного подвида, *Y. pestis caucasica*, не имеют пика 3065 Да, как и плазмиды pPla (pPst), что подтверждается результатами плазмидного скрининга. Кроме того, нами показана возможность дифференциации штаммов основного подвида чумного микроба – *Y. pestis pestis* до уровня биовара на основе различий в масс-спектрометрических профилях. При анализе белковых профилей штаммов *Y. pestis pestis*, относящихся к биоварам *medievalis, orientalis, antiqua* нами выявлено 3 дифференцирующие области: Diff 1 с диапазоном 3533-3682 Да, Diff 2 с диапазоном 6560-6700 Да, и Diff 3 с диапазоном 7190-7785 Да и 3 отдельных пика: 5623, 5891, 7452 Да, разные комбинации которых позволяют дифференцировать биовары основного подвида *Y. pestis*. Используя метод 2-D дифференцирующего гель-электро-

фореза нами проанализированы кислоторастворимые белковые экстракты 2 штаммов *Y. pestis,* относящихся к основному и кавказскому подвидам. При сравнительном анализе интенсивности специфической флуоресценции отдельных белковых точек были выявлены пептидные фрагменты кислотного гидролиза белковых экстрактов, которые были идентифицированы методом тандемной времяпролетной масс-спектрометрии. Как показал анализ полученных данных, в белковых экстрактах штаммов *Y. pestis* обоих подвидов доминирующими являются фрагменты рибосомальных (50S и 30S) и структурных белков, а также факторов вирулентности (капсульный антиген, активатор плазминогена), которые позволяют не только эффективно дифференцировать *Y. pestis* от близкородственных видов (*Y. pseudotuberculosis, Y. enterocolitica*), но и проводить внутривидовую дискриминацию штаммов.

Таким образом, применение современных методов исследования (протеомики, масс-спектрометрии, биоинформатики) позволяет эффективно решать практические задачи в области совершенствования методов лабораторной диагностики и молекулярной эпидемиологии, а также служит основой для получения новых фундаментальных знаний в области исследования возбудителей ООИ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА ПЦР НА БАЗЕ ФКУЗ «КАБАРДИНО-БАЛКАРСКАЯ ПРОТИВОЧУМНАЯ СТАНЦИЯ»

Аванесова Р.С., Белогрудов В.А., Белогрудова Е.И., Власов А.В.

ФКУЗ «Кабардино-Балкарская противочумная станция» Роспотребнадзора, Нальчик, Россия

ФКУЗ «Кабардино-Балкарская противочумная станция» осуществляет мониторинг Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы в пределах Кабардино-Балкарской и Карачаево-Черкесской республик. Предметом пристального наблюдения являются природно-очаговые инфекции, приуроченные к данной территории. С 2004г. в большинстве районов КБР ежегодно обнаруживаются зараженные вирусом КГЛ клещи. Имеется комплекс факторов существования природных очагов туляремии. Регион неблагополучен по сибирской язве.

По-прежнему, основные усилия специалистов станции направлены на обнаружение возбудителя чумы. На фоне снижения эпизоотической активности очага (последнее выделение культуры *Y.pestis* в 2007г. в урочищах Пёрк и Автодром) большее внимание уделяется молекулярным методам диагностики. В 2014-2016гг. в поисках *Y.pestis* было отобрано и исследовано с помощью полимеразной цепной реакции с учётом результатов в режиме реального времени 2714 проб (826, 746 и 1142 по годам соответственно).

В Центральную лабораторию доставлялся полевой материал, собранный во время сезонных экспедиций сотрудниками зоогрупп ФКУЗ «КБПЧС». Материал был представлен как носителями чумы, основным из которых в ЦКВПОЧ является горный суслик, занимающий все высотные пояса от горной степи до верхнего яруса альпийских лугов, так и переносчиками чумы, основные из которых - блохи *Citellophilus tesquorum*. В процентном соотношении исследовано 28,2% образцов от носителей и 71,3% – от переносчиков. Оставшиеся 0,5% пришлись на клинический материал (образцы крови, мазки из рото- и носоглотки), полученный от мужчины, прибывшего с территории природного очага чумы.

Методом ПЦР за три года исследовали 88,6% полевого материала (количество посевов, исследованных в ПЦР/ количество посевов): от носителей чумы исследовано методом ПЦР в среднем 76,8%, от эктопаразитов –92,4%. По годам эти показатели имели следующие частоты (таблица 1):

Таблица 1

	Исследовано посевов всего, %	Исследовано посевов органов от носителей, %	Исследовано посевов переносчиков, %
2014	84,0	58,9	93,5
2015	85,3	73,6	89,0
2016	95,2	96,2	95,0

В указанный период удалось получить 40 положительных результатов (33 в 2014г., 3 в 2015г., 4 в 2016г.), 75% которых составили суспензии эктопаразитов. В 80% случаев положительные образцы были доставлены из секторов, на территориях которых в прошлом отмечались эпизоотийные проявления (0123800234, 0123801331, 0123800233, 012801332, 0123801531, 0123801532, 0123801433, 0123802621,0123801431, 0123801442).

Работа по выделению нуклеиновых кислот проводилась комплектами реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора и QIAamp DNA Mini Kit производства QIAGEN на автоматической станции для выделения НК QIAcube. Выявление специфической ДНК осуществлялось наборами реагентов ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора для выявления ДНК *Y.pestis* в биологическом материале методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс *Y.pestis*-FL» и ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» для выявления ДНК *Y.pestis* методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов в режиме реаль-

ного времени Ген *Y.pestis* индикация-РГФ по ТУ 9398-037-01898109-2011 на амплификаторе ДТ-96, НПО ДНК-Технология.

Специалистами ФКУЗ «КБЧПС» ведется работа по исследованию материала с целью обнаружения РНК ККГЛ. С 2014г. по 2016г. наборами реагентов для обнаружения РНК ККГЛ в биологическом материале методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс *CCHFV*-FL» ФБУН ЦНИИЭ изучены 169 проб:103 пула суспензий клещей, 27 пулов суспензий внутренних органов мелких мышевидных грызунов, 37 образцов клинического материала. В 2016г. при исследовании материала от укушенного клещом мужчины были получены 2 положительных результата. Специфическая РНК ККГЛ была обнаружена в сыворотке крови, взятой на 4-й день укуса, при отсутствии клинической картины заболевания. Иммуноферментный анализ данной сыворотки, проведенный набором реагентов ВектоКрым- КГЛ- IgM ЗАО «ВЕКТОР-БЕСТ», антител соответствующего класса не выявил. При исследовании парной сыворотки, отобранной на 9-й день на фоне развившейся характерной симптоматики, титр специфических антител класса М к ККГЛ составил 1:1600.

Ежегодно в ПЦР-лаборатории ФКУЗ «КБПЧС» исследуется материал на наличие возбудителей сибирской язвы (образцы почвы с территорий скотомогильников), лихорадки Западного Нила (клещи, комары и др.), холеры (вода открытых водоемов), туляремии (мелкие мышевидные грызуны, клещи, погадки).

Молекулярная диагностика остается одним из наиболее информативных методов изучения полевого и клинического материала с целью осуществления мониторинга территории природного очага на предмет циркуляции возбудителей природно-очаговых инфекций.

АНАЛИЗ ВЗАИМОСВЯЗИ КАНОНИЧЕСКИХ SNP ШТАММОВ *BACILLUS ANTHRACIS* С ИХ ФЕНОТИПИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ И MLVA-ГЕНОТИПАМИ

Цыганкова О.И., Котенева Е.А.

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь, Россия

Различные методы и схемы генотипирования штаммов *Bacillus anthracis* в настоящее время нашли широкое применение в ретроспективном и оперативном эпидемиологическом анализе вспышек этого опасного заболевания животных и человека. Относительная географическая приуроченность определенных MLVA-генотипов позволила авторам строить модели путей исторического распространения сибирской язвы в мире. В значительно меньшей мере в научных публикациях отражены исследования по выявлению возможности изменения генотипов штаммов или выделения внутри их популяций вариантов с отличающимися генотипами и возможной связи их генотипов с фенотипическими свойствами. Одним из информативных методов генотипирования является анализ канонических SNP, позволяющий определять основные клоновые линии сибиреязвенного микроба, каждая из которых приурочена к определенному географическому региону. Однако нам не встретились литературные данные по изучению соответствия SNP-генотипов штаммов *B. anthracis* их фенотипам. Ранее на основе сопоставления анализа MLVA-генотипов по схеме P. Keim et al. (2000) по хромосомным локусам и фенотипических особенностей вариантов штаммов *B. anthracis* была выявлена определенная связь этих характеристик (Цыганкова и др., 2008).

Целью данной работы явилось изучение 5 групп штаммов *B. anthracis*, включающих исходные штаммы и их варианты, по характеристикам хромосомных Ceb-Bams-локусов и канонических SNP и поиски возможной связи фенотипа с определенными SNP и MLVA-генотипами.

Объектом исследований явились штаммы *B. anthracis* 228, 1СО, 140Р, 14-41, 12-16 и их варианты, выделенные в разное время из популяций штаммов в процессе многолетней лабораторной работы с ними. Критериями отбора вариантов служили различные фенотипические свойства: культурально-морфологические, капсуло- и токсинообразование, ферментативная активность, чувствительность к сибиреязвенным бактериофагам, питательные потребности, иммуногенность, вирулентность *in vitro*, которые определяли в соответствии с основными идентификационными тестами и дополнительными методами изучения культур *B. anthracis*. Таким образом изученные культуры составили пять групп, каждая из которых объединяла исходный штамм и его варианты.

Для характеристики штаммов по VNTR-локусам использовали 6 хромосомных, описанных P. Keim et al. (2000), и 10 наиболее вариабельных локусов Ceb-Bams (1, 3, 5, 7, 13, 15, 22. 23, 30, 31) P. Le Fleche et al. (2001) в соответствии с описанием авторов. Для определения SNP-генотипов использовали метод M.N. Van Ert et al. (2007) с использованием собственных LNA-зондов и праймеров к специфичным геномным последовательностям.

Результаты и обсуждение. В основу анализа полученных результатов было взято распределение изученных 40 культур по группам патогенности *in vitro*, в основе которого лежат фенотипические свойства, и выявление связи фенотипа с полученными генетическими характеристиками, не имеющими прямой связи с детерминацией основных факторов патогенности *B. anthracis* (табл. 1).

Все штаммы, относящиеся к группе высоковирулентных, имели одинаковый генотип по 6 хромосомным MLVA-локусам, 10 локусам Ceb-Bams и SNP-генотип. Все штаммы, отнесенные к слабовирулентным, имели одинаковые генотипы, наиболее отличающиеся от генотипов первой группы. Группа умеренно вирулентных культур имела такие же характеристики вариабельных локусов, как слабовирулентные, за исключением 3 вариантов штамма 1СО. Два из них имели генетические характеристики, характерные для высоковирулентных культур, и один штамм отличался от них по размерам одного

MLVA-локуса и четырех Ceb-Bams-локусов. При этом все три штамма имели SNP-генотип 1. Все эти штаммы были триптофаннезависимыми, но не демонстрировали иммунопреципитации на среде СОПЭК.

Таблица 1. Распределение генетических характеристик культур *B. anthracis* с разным фенотипом

Вирулентность in vitro, фенотип и наличие плазмид pXO1, pXO2	Состав группы *	Условные генотипы **		
		MLVA	Ceb-Bams	SNP
Высоковирулентные **(pXO1$^+$, pXO2$^+$)** Cap(CO_2)$^+$(O_2)$^-$Tox$^+$ProtA$^+$ Hly$^+$Lec$^-$Trp$^+$	16/5	1/16	1/16	1/16
Умеренновирулентные **(pXO1$^+$, pXO2$^+$)** Cap(CO_2)$^+$(O_2)$^-$Tox$^-$ ProtA$^+$ Hly$^+$ Lec$^-$ Trp$^+$ Cap(CO_2)$^+$(O_2)$^-$Tox$^-$ ProtA$^-$ Hly$^-$ Lec$^+$ Trp$^-$ Cap(CO_2)$^+$(O_2)$^-$Tox$^-$ ProtA$^-$ Hly$^-$ Lec$^-$ Trp$^-$	9/5	1/2 2/1 5/6	2 / 1 1 /2 3/6	1/ 3 2 /6
Слабовирулентные **(pXO1$^+$, pXO2$^+$)** Cap(CO_2)$^+$(O_2)$^+$Tox$^-$ ProtA$^-$ Hly$^-$ Lec$^-$ Trp$^-$	5/4	6/5	3/5	2/5
Авирулентные **(pXO1$^+$, pXO2$^-$)** Cap$^-$Tox$^+$ ProtA$^-$ Hly$^-$ Lec$^-$ Trp$^+$	6/2	3 /3 4/3	4/3 5/3	1/ 6
Апатогенные **(pXO1$^+$, pXO2$^-$)** Cap$^-$Tox$^-$ ProtA$^-$ Hly$^-$ Lec$^-$ Trp$^-$	4/3	5/4	3/4	2 /4

* общее количество штаммов в группе/сколько изогенных групп представлено в данной категории
** генотип/количество культур данного генотипа в данной категории

Учитывая плазмидную детерминацию основных факторов патогенности: токсинов и капсулы, вследствие чего для попадания в группы со сниженной вирулентностью достаточно элиминации плазмид, в группу апатогенных были включены штаммы, содержащие локусы, маркерные для плазмиды pXO1, но фенотипически не проявляющие токсинообразование на среде СОПЭК. Все культуры этой категории, относящиеся к 3 изогенным группам, имели одинаковые MLVA-, Ceb-Bams- и SNP-генотипы, аналогичные генотипам группы слабовирулентных и подавляющей части умеренновирулентных. Авирулентные штаммы не имели плазмиды pXO2, вследствие чего не формировали капсулу и были авирулентны, в остальном, сохраняя фенотип, близкий к вирулентным штаммам, синтезировали токсин и были триптофаннезависимыми. Варианты этой группы, происходящие от штамма 228, по характеристике хромосомных MLVA-локусов полностью соответствовали культурам из группы высоковирулентных, размеры пяти вариабельных локусов Ceb-Bams отличались от высоковирулентных и восьми - от слабовирулентных штаммов. Культуры этой группы, полученные от исходного штамма 14\41, отличались от высоковирулентных всего по одному локусу MLVA и Ceb-Bams. Все 6 культур имели SNP-генотип 1.

Таким образом, в целом на примере 5 изогенных групп культур выявляется выраженная взаимосвязь фенотипа штаммов и основанной на нем принадлежности к группам патогенности in vitro (при исключении влияния плазмидного состава) с определенными MLVA-, Ceb-Bams- и SNP-генотипами.

МОЛЕКУЛЯРНОЕ ТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ ОСНОВНОГО ПОДВИДА ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ ИЗ ГОРНО-АЛТАЙСКОГО ПРИРОДНОГО ОЧАГА

Краснов Я.М.[1], Ерошенко Г.А.[1], Альхова Ж.В.[1], Яшечкин Ю.И.[1], Гусева Н.П.[1], Шарапова Н.А.[1], Буданова А.А.[1], Балахонов С.В.[2], Кутырев В.В.[1]

[1]ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Россия
[2]ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока», Иркутск, Россия

В 2012 году в Горно–Алтайском природном очаге чумы при ежегодном эпизоотологическом обследовании территорий впервые был выделен (от трупа суслика) возбудитель чумы основного подвида – *Yersinia pestis subspecies pestis*. Ранее в этом очаге выявляли только штаммы алтайского подвида *Y. pestis subspecies altaica*, авирулентные для человека. В последующие 2014 – 2016 годы штаммы *Y. pestis* основного подвида выделяли из биологического материала от серых сурков. В этот период были зарегистрированы 3 случая заболевания человека чумой в результате заражения штаммами *Y. pestis* основного подвида. Штаммы *Y. pestis* основного подвида выделялись от носителей в трех территориально изолированных районах, удаленных друг от друга на расстоянии 50 – 120 км, в то время как все случаи заболевания людей были зарегистрированы в одном Кош-Агачском районе, расположенном в западной части Горно–Алтайского природного очага чумы.

Целью настоящей работы являлось проведение молекулярного типирования штаммов *Y. pestis* основного

подвида, выделенных в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге чумы, для расследования эпидемиологического осложнения, произошедшего в этом очаге чумы в 2016 году.

Материалы и методы. Работа по культивированию бактериальных клеток и выделению тотальной ДНК от 13 штаммов *Y. pestis* основного подвида, изолированных из клинического материала от больных людей и полевого материала (останки сурков) летом 2016 года в Горно–Алтайском природном очаге чумы, проводили согласно СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I - II групп патогенности» и МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности». В качестве набора для выделения ДНК использовали «gDNA Mini Bacteria Kit» (Invitrogen). Полногеномное секвенирование выполнено на платформе «Ion PGM» (Ion Torrent). Проведение биоинформационного анализа: первичная обработка данных - Ion Torrent Suite software 5.0., сборка контигов - Newbler gsAssembler 2.6, создание матрицы SNP - Wombac 2.0, построение филогенетических деревьев (алгоритм Maximum Parsimony) – BioNumerics 7.5. В собранных в виде контигов геномах *Y. pestis* основного подвида осуществили поиск 94 фрагментов, содержащих вариабельное число тандемных повторов (VNTR) и определение их аллельных размеров с последующим отбором только вариабельных локусов для данной выборки штаммов.

Основные результаты. Проведено полногеномное секвенирование 13 штаммов *Y. pestis* основного подвида, выделенных в Горно-Алтайском высокогорном очаге в 2016 году. Установлена их 100% идентичность друг к другу по числу единичных мутаций (SNPs) при сравнительном анализе нуклеотидных последовательностей полученных геномов. Исключение составили два штамма *Y. pestis* 25 и *Y. pestis* 46, выделенные в восточной части очага, которые отличаются от других 11 штаммов на 1 единичную мутацию. При сравнении полногеномных последовательностей штаммов *Y. pestis* основного подвида из Горно-Алтайского очага (13 штаммов, выделенных в 2016 году и 6 штаммов, выделенных с 2012 по 2015 годы) с выборкой из 23 штаммов *Y. pestis* из очагов Российской Федерации и сопредельных государств установлено: 1) все штаммы *Y. pestis* основного подвида из Горно-Алтайского очага имеют высокую степень подобия (более 99.9 %) относительно друг друга; 2) эти штаммы близкородственны штаммам *Y. pestis* из Тувинского горного очага и Баян-Улегейского аймака Монголии. Максимально близким по генетическому подобию к группе штаммов *Y. pestis* основного подвида из Горно-Алтайского высокогорного очага является штамм И3244 (Баян-Улегейский аймак, 1988 год, Монголия). Второе место по близости к алтайским штаммам *Y. pestis* основного подвида занимают штаммы из Тувинского горного очага (*Y. pestis* 863, 2012 год и *Y. pestis* М1944, 2013 год). Близкое генетическое родство штаммов *Y. pestis* основного подвида из Горно-Алтайского очага, Тувинского горного очага и пограничного района Монголии (Баян-Улегейский аймак) свидетельствует о едином происхождении штаммов возбудителя чумы основного подвида, циркулирующих на территории всех этих трех смежных природных очагов чумы. С целью проведения дальнейшей дифференциации между 13 штаммами *Y. pestis,* выделенными в Горно-Алтайском высокогорном очаге в 2016 году, был использован метод MLVA по отобранным 15 VNTR локусам (M06, M18(Y3336), M22, M25(Y0920), M27, M28, M34(ms62), M43, Y3701, Y3515, N1606, N2117, N2577, N4268(Y4892), ms09). В результате было определено, что все 4 штамма *Y. pestis*, выделенные при эпидемическом осложнении в 2016 году (157 и 162 – клинические, 367 и 368 – из биологического материала от сурков – предполагаемых источников инфекции), имеют идентичные VNTR–профили. В то же время по 3 VNTR локусам (M34(ms62), N4268(Y4892), M43) все они отличаются от 9 других штаммов, выделенных в мае-июне и августе 2016 года на территории Горно-Алтайского природного очага при мониторинговом обследовании. Таким образом идентичность VNTR профилей штаммов *Y. pestis* 157, 162, 367 и 368 доказывает их клональное происхождение и первичное заражение чумой человека от добытых сурков. Клональность штаммов подтверждена наличием уникальной делеции 416 пар нуклеотидов в гене BAY22_11020, которая присутствует только у штаммов *Y. pestis* 157, 162, 367 и 368. Подобная делеция не была найдена ни у одного из других штаммов из Горно-Алтайского высокогорного и Тувинского горного очагов, Баян-Улегейского аймака Монголии, а также у всех представленных в NCBI Genbank штаммов *Y. pestis*.

Заключение. Сравнительный анализ данных полногеномного секвенирования позволил установить, что в Юго-Восточной области Горного Алтая находится единый очаг, включающий территории Горно-Алтайского, Тувинского горного природного очага и Баян-Улегейского аймака Монголии, в котором циркулируют близкородственные штаммы *Y. pestis* основного подвида античного биовара, имеющие общее происхождение. Разработан эффективный способ молекулярного типирования штаммов *Y pestis* основного подвида из Горно-Алтайского высокогорного очага чумы с использованием 15 выбранных локусов VNTR.

ПОИСК ФАКТОРОВ, ОТВЕЧАЮЩИХ ЗА ИЗБИРАТЕЛЬНУЮ ВИРУЛЕНТНОСТЬ *YERSINIA PESTIS*

Красильникова Е.А., Копылов П.Х., Шайхутдинова Р.З., Иванов С.А., Дентовская С.В., Анисимов А.П.

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Россия

Введение. Разнесенные по всему свету во время трех пандемий и сформировавшие природные очаги чумы на всех континентах, кроме Австралии и Антарктиды, штаммы чумного микроба *Yersinia pestis* subsp. *pestis* циркулируют в популяциях широкого круга грызунов и обладают «универсальной» вирулентностью как для грызунов, так и для человека. Штаммы другого подвида: *Y. pestis* subsp. *microtus*, адаптировались к существованию в

популяциях различных видов полевок в нескольких древних евразийских очагах чумы и «избирательно вирулентны» для полевок и лабораторных мышей, но непатогенны для людей и морских свинок. Крайне редко бубонная форма инфекции может развиться у зараженных полевочьими штаммами лиц с нарушениями иммунного статуса [1].

Сравнительный анализ близкородственных штаммов, отличающихся по степени вирулентности, на геномном, транскриптомном и/или протеомном уровне, позволяет идентифицировать молекулярные мишени для оптимизированных методов лабораторной диагностики, профилактики и лечения чумы [2]. В целом ряде публикаций уже оценивали дифференциальную продукцию белков культурами штаммов *Y. pestis*, выращенных в различных условиях *in vitro* [3; 4]. Однако до последнего времени не проводили изучение спектров продуцируемых *in vivo* белков – потенциальных факторов патогенности *Y. pestis*.

Цели и задачи. Поиск факторов, отвечающих за избирательную вирулентность *Y. pestis* - потенциальных молекулярных мишеней для профилактики и терапии чумы.

Материалы и методы. Материалом для исследования являлись две культуры штамма *Y. pestis* subsp. *microtus* bv. ulegeica И-3189 (Государственная коллекция патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск»), одна из которых была «анимализирована» путем последовательных тестикулярных пассажей на морских свинках, для получения субкультуры, высоковирулентной при подкожном заражении.

Моделирование процессов жизнедеятельности микроорганизмов в условиях *in vivo* проводили с использованием диализных нитроцеллюлозных мембран (Sigma-Aldrich D9652-100FT) (размер пор 10500 НОММ, ширина 33 мм). Каждый мешок наполняли 5 мл жидкой питательной среды на основе сердечно-мозговой вытяжки (BHI), pH 7,2, с 1 % БСА, содержащими 10^7 КОЕ *Y. pestis* в логарифмической фазе роста. Беспородных морских свинок в возрасте 5-6 месяцев (филиал «Апрелевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России) анестезировали однократной внутрибрюшинной инъекцией смеси (5:1) рометара (20 мг/мл) и Золитила-100 (100 мг/мл) по 0,75 мл/кг массы тела. Все протоколы экспериментов на животных были одобрены Комитетом по Биоэтике ГНЦ ПМБ (разрешение № ВП-2016/1), и все работы провели в соответствии с руководством и правилами Евросоюза по обращению, уходу и защите лабораторных животных (http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/home_en.htm).

Анализ клеточных лизатов культур осуществляли методом двумерного гель-электрофореза в неравновесном градиенте pH (NEPHGE - non-equilibrium pH gradient electrophoresis). Изоэлектрофокусировку проб, содержащих от 30 мкг до 50 мкг общего белка, проводили в капиллярах, наполненных катодным буфером и закрепленных в ячейках камеры ProteanIIxi (Bio-Rad). После электрофореза в 7,5-15 % полиакриламиде гели окрашивали в течение 1 ч. раствором Кумасси G-250.

Масс-спектры получали на приборе MALDI-TOF Reflex IV (Bruker Daltonics, Германия). Идентификацию белков проводили с использованием программного обеспечения MascotSoftware (MatrixScienceLtd., London, UK) с параметрами поиска: одно пропущенное расщепление, возможность различных модификаций цистеинов акриламидом и окисления метионинов и точность определения массы 100 миллионных долей, база данных белковых последовательностей NCBI, таксон *Bacteria* (*Eubacteria*).

Основные результаты. Сравнительный анализ двумерных электрофореграмм белков, принципиально отличающихся по вирулентности субкультур штамма И-3189 (bv. ulegeica), выращенных в течение 48 ч в имплантированных в перитонеальные полости морских свинок диализных камерах, показал появление 6 новых белковых пятен у вирулентных для биомодели культур по сравнению с авирулентными. Полученные белки были идентифицированы при помощи масс-спектрометрии.

Среди них молекулярный шаперон, синтетаза одной из аминокислот, альдолаза, субстрат-связывающий белок и др. Поиск в PubMed показал, что у ряда патогенных бактерий идентифицированные белки связаны с вирулентностью. Интересно, что как минимум часть из них относят к полифункциональным "белкам лунного света" (глутаминсинтетаза, фруктозо-бисфосфат альдолаза), функционирующим как в цитоплазме, так и на поверхности клетки [5]. Кроме того, обнаружено исчезновение одного пятна у вирулентной для свинок культуры по сравнению с авирулентной, идентифицированного как пестицин – бактериоцин чумного микроба. В вирулентных культурах также отметили значительное увеличение продукции белков – Caf1 в 5-7 раз и, особенно, глутаминсинтетазы в 17-20 раз.

Заключение

Идентифицированы потенциальные факторы избирательной вирулентности чумного микроба. Проводится подготовка к экспериментам по конструированию мутантов по генам, кодирующим эти белки, комплементации мутантов и сравнительной оценке вирулентности изогенных штаммов для лабораторных животных.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (проекта № 14-15-00599).

Список используемой литературы

1. Perry R.D., Fetherston J.D. Yersinia pestis — etiologic agent of plague // Clin. Microbiol. Rev. – 1997. - Vol. 10. - P. 35–66.

2. Ellison D.W., Clark T.R., Sturdevant D.E., Virtaneva K., Porcella S.F., Hackstadt T. Genomic comparison of virulent Rickettsia rickettsii Sheila Smith and avirulent Rickettsia rickettsii Iowa // Infect. Immun. - Vol. 76. - P. 542–550.

3. Hixson K.K., Adkins J.N., Baker S.E., Moore R.J., Chromy B.A., Smith R.D., McCutchen-Maloney S.L., Lipton M.S. Biomarker candidate identification in Yersinia pestis using organism-wide semiquantitative proteomics // Journal of Proteome Research. - 2006. - Vol. 5. – P. 3008–3017.

4. Chromy B.A., Choi M.W., Murphy G.A., Gonzales A.D., Corzett C.H., Chang B.C., Fitch J.P., McCutchen-Maloney S.L. Proteomic characterization of Yersinia pestis virulence. – J. Bacteriol. - 2005. – Vol.187. – P. 8172-8180.

5. Wang W., Jeffery C.J. An analysis of surface proteomics results reveals novel candidates for intracellular/surface moonlighting proteins in bacteria // Mol Biosyst. - 2016. - Vol.12. – P. 1420-31.

АНАЛИЗ ICE-ЭЛЕМЕНТА У ТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ УКРАИНЫ В 1994-2010 ГОДАХ

Водопьянов С.О., Пидченко Н.Н., Водопьянов А.С., Олейников И.П., Зинич Л.С., Титова С.В., Тихонов С.Н.

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия
ФГКУЗ «ПЧС Республики Крым» Роспотребнадзора, Симферополь, Россия

Анализ выделенных на территории Российской Федерации штаммов холерного вибриона с помощью современных молекулярно-генетических методов прочно вошел в практику проведения эпидемиологического надзора за холерой. Недавно у вибрионов обнаружены интегративно-конъюгативные элементы (Integrative Conjugative Elements (ICEs), представляющие собой мобильные генетические элементы размером от 79 to 108 kb, способные интегрироваться в состав хромосомы хозяина и передаваться путем конъюгации. Данные ретроспективного анализа показали, что вибрионы приобрели ICE- элемент путем горизонтального переноса от гетерологичных микроорганизмов в период 1978-1984 годов [Mutreja, 2011; Marin, 2014; Spagnoletti, 2014]. Установлено наличие двух типов ICE-элемента у токсигенных вибрионов, выделенных на территории Российской Федерации в последние десятилетия (Водопьянов, 2016). Однако для получения полной картины циркуляции возбудителя подобные исследования целесообразно проводить со штаммами, изолированными на сопредельных территориях.

Цель настоящей работы заключалась в анализе токсигенных штаммов холерного вибриона, выделенных в период 1994-2010 годов на территории Украины, на наличие различных типов ICE-элемента.

В работе использовали 44 токсигенных штамма *V. cholerae* Эль Тор O1, выделенных в различных регионах Украины в период 1994-2010 годов. Для проведения ПЦР использовали систему описанных в литературе праймеров – пару родовых для выявления ICE-элемента и трех пар видовых для типирования ICE-элемента «индийского», «мозамбикского» и SXT типов [Spagnoletti, 2012]. Результаты проведенного анализа представлены в Таблице 1.

Полученные данные позволяют утверждать, что на территории Украины в 1994-2010 годах отмечена циркуляция двух типов токсигенных штаммов: содержащих и не содержащих ICE-элемент. Обнаружение ICE-элемента «мозамбикского типа» у штаммов, выделенных в 1994-1995 гг., может свидетельствовать о возможной связи со вспышкой в Дагестане 1994 года, где большинство изолированных штаммов также имели такой же генотип (Водопьянов, 1995). Вызывает интерес факт отсутствия у данного набора токсигенных штаммов ICE-элемента «индийского типа», ставшего доминирующим в мире в последние десятилетия (Spagnoletti, 2014) и обнаруживаемом у штаммов, выделенных в этот промежуток времени на территории Российской Федерации.

Выделение большого числа ICE-негативных токсигенных штаммов в период 1998-2010 годов требует пристального внимания. В настоящее время случаи выделения штаммов с подобным генотипом крайне редки (Klinzing, 2015). Следует отметить, что подавляющее большинство указанных культур из изучаемой коллекции выделены из проб воды (13 штаммов) и гидробионтов (2 штамма). От больных выделено только 3 ICE-негативных токсигенных штамма (вспышка 1999 года). Этот результат может свидетельствовать в пользу сниженного патогенетического потенциала ICE-негативных штаммов.

На наш взгляд, дальнейшая работа должна быть направлена на сравнительное изучение генетических характеристик этих штаммов со свойствами штаммов, выделенных в эти же периоды на территории Российской Федерации с использованием других приемов - VNTR- или INDEL-анализа. Полученные данные, возможно, позволят установить источники заноса и циркуляции возбудителя на территорию Украины и нашей страны.

Таблица 1. Тип ICE-элемента у токсигенных штаммов холерного вибриона O1, выделенных на территории Украины в 1994-2010 годах

Год выделения	Число штаммов	Наличие/отсутствие ICE-элемента	Тип ICE-элемента
1994	20	19/1	Moz
1995	6	3/3	Moz
1998	5	0/5	-
1999	7	1/6	Moz
2000	1	0/1	-
2001	1	0/1	-
2010	4	3/1	Moz

Примечание: Moz – выявлен ICE «мозамбикского» типа,
(-) отсутствие признака.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПЦР С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАБОРА РЕАГЕНТОВ «АМПЛИГЕН*BURK-MALLEI/PSEUDOMALLEI*-РВ» ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САПЕ И МЕЛИОИДОЗЕ

Лемасова Л.В., Ткаченко Г.А., Леденева М.Л., Савченко С.С., Плеханова Н.Г.

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Волгоград, Россия

В последнее время в связи с развитием массового туризма, деловых и торговых связей, интенсивной миграцией населения возникает настороженность в отношении завоза особо опасных инфекций на территорию Российской Федерации из эндемичных регионов, к которым относятся возбудители сапа (*Burkholderia mallei*) и мелиоидоза (*Burkholderia pseudomallei*). Мелиоидоз эндемичен для ряда стран Юго-Восточной Азии, территорий южного Китая, а также северной Австралии, Западной и Центральной Африки, в западном полушарии – Пуэрто-Рико, Сальвадора, островов Карибского бассейна, стран Латинской Америки. Сап животных регистрируется в Монголии, Турции, Иране, Ираке, Индонезии, Китае, Индии, Филиппинах. В 2010 г. в Иране зарегистрирован случай сапа у тигра, импортированного из России (Khaki P., 2012). Возможно, заражение животного произошло при контакте уже на эндемичной территории в иранском зоопарке. Учитывая вышесказанное, актуальным является проведение эпидемиологического надзора за экзотическими для России инфекциями.

На базе ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора функционирует референс-центр по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза. Одним из важных вопросов является разработка и совершенствование диагностических препаратов для индикации и идентификации патогенных буркхольдерий. Тяжёлое течение заболеваний, высокая летальность, отсутствие специфической профилактики ставят на первый план задачу быстрой диагностики данных инфекций.

Целью исследования являлось определение диагностической эффективности ПЦР с применением набора реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ» в сравнении с бактериологическим методом при исследовании биологического материала от животных с экспериментальным сапом и мелиоидозом.

Материалы и методы. В работе использовано 76 штаммов микроорганизмов, из них: 14 штаммов *B. mallei*, 43 штамма *B. pseudomallei* и 19 штаммов гетерологичных микроорганизмов, в том числе близкородственных буркхольдерий (*B. thailandensis*, *B.cepacia*). Для моделирования сапной и мелиоидозной инфекций использовали штаммы *B.mallei* 10230 и *B. pseudomallei* С-141, соответственно. Культуры выращивали на агаре Хоттингера, содержащем 5% глицерина, инкубировали при температуре (37±1) °С в течение 24 - 48 ч. Затем готовили бактериальную взвесь штаммов в 2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида по отраслевому стандартному образцу мутности – 10 единиц ФГБУ «НЦЭСМП» (ОСО 42-28-85-П (10МЕ)), что соответствует 1×10^9м.к./мл для *B. mallei*, *B.pseudomallei.* Далее проводили 10-кратные разведения подготовленных суспензий в 0,9 % растворе натрия хлорида до конечной концентрации 1×10^2 м.к./мл для определения функциональных характеристик (аналитической чувствительности, специфичности) с разработанным набором реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ». Для моделирования экспериментальной инфекции в качестве биопробных животных использовали золотистых хомячков, которым внутрибрюшинно вводили по 0,2 мл суспензии сапного и мелиоидозного микробов в концентрации 1×10^3 м.к./мл. В эксперименте животные были разделены на 3 группы: 2 опытные (16 особей) и 1 контрольная (4 особи). Вскрытие золотистых хомячков проводили на 4, 7-е сутки после заражения. Бактериологический посев выполняли методом мазков-отпечатков. Экстракцию ДНК из культур микроорганизмов осуществляли с помощью набора «АмплиПрайм РИБО-преп» (ООО Некст-Био, Москва). Из органов экспериментальных животных выделяли ДНК с использованием коммерческих наборов «РИБО-золь-С» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва) и «АмплиПрайм РИБО-преп» (ООО «Некст-Био», Москва). Амплификацию с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в формате реального времени осуществляли на приборе «Rotor-Gene Q» QIAGEN (Германия).

Результаты. Для обнаружения и дифференциации ДНК возбудителей сапа и мелиоидоза нами разработан «Набор реагентов для выявления и дифференциации ДНК возбудителей сапа (*B. mallei*) и мелиоидоза (*B. pseudomallei*) методом мультиплексной полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ». На бактериальных культурах близкородственных буркхольдерий и гетерологичных микроорганизмов определена чувствительность ПЦР, которая составила 1×10^3 м.к./мл, и специфичность, равная 100%. Для анализа диагностической эффективности метода ПЦР с использованием данного набора реагентов исследовали кусочки паренхиматозных органов, где наиболее вероятно могли локализоваться возбудители сапа и мелиоидоза при инфекционном процессе: печень, селезенка, легкое, а также пробы лимфатических узлов. Параллельно материал от экспериментально зараженных животных исследовали бактериологическим методом (табл. 1).

При сравнении результатов на 4-е сутки методом ПЦР с использованием набора «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ» ДНК патогенных буркхольдерий обнаружена во всех органах, однако ДНК сапного микроба выявлена в суспензиях 10 проб из 16 (62,5%), а *B.pseudomallei* в 13 пробах из 16 (81,25%). Бактериологическим методом получены и подтверждены положительные результаты ПЦР в 7 пробах *B. mallei* и 12 пробах *B.pseudomallei* (75%). На 7-е сутки заболевания животных возбудитель мелиоидоза обнаружен с помощью ПЦР и бактериологическим методом во всех органах в 100%. При экспериментальном

Таблица 1. Результаты исследования биологического материала от животных при экспериментальном сапе и мелиоидозе с помощью ПЦР и бактериологического методов

Выявление *B. mallei*								Выявление *B. pseudomallei*							
Суспензии															
лимф. узел		печень		селезенка		легкие		лимф. узел		печень		селезенка		легкие	
Сутки															
4-е	7-е	4-е	7-е	4-е	7-е	4-е	7-е	4-е	7-е	4-е	7-е	4-е	7-е	4-е	7-е
Бактериология															
50	100	50	75	50	75	25	50	75	100	75	100	75	100	75	100
ПЦР															
50	100	75	100	100	75	25	75	75	100	75	100	100	100	75	100

Примечание: числами обозначен % положительных результатов, полученных тем или иным методом.

сапе возбудитель выявлен методом ПЦР в 14 пробах из 16 (87,5%) При бактериологическом исследовании удалось получить культуру *B. mallei* в 12 пробах из 16 (75%), которые совпадали с положительными результатами ПЦР. Патогенные буркхольдерии в контрольной группе методом ПЦР и бактериологическом посеве не обнаружены.

Заключение. Таким образом, в результате проведённых исследований установлено, что разработанный набор реагентов для выявления и дифференциации ДНК возбудителей сапа (*B. mallei*) и мелиоидоза (*B. pseudomallei*) методом мультиплексной ПЦР с флуоресцентной детекцией («Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ») позволяет обнаруживать и дифференцировать патогенные буркхольдерии на ранних сроках заболевания. Полученные данные показывают возможность применения генодиагностического набора при эпидемиологическом мониторинге за возбудителями особо опасных инфекций, что повысит качество диагностики.

СОЗДАНИЕ МУЛЬТИКАНАЛЬНОЙ ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМЫ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОВ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ В ГЕНОМЕ ШТАММОВ *Vibrio cholerae*

Крицкий А.А., Челдышова Н.Б., Заднова С.П., Смирнова Н.И.

ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия

Появление штаммов холерного вибриона, устойчивых к различным антибиотикам, представляет собой одну из наиболее острых проблем современного здравоохранения. В настоящее время для лечения холеры, в соответствии с рекомендациями ВОЗ, используются такие препараты, как тетрациклин, ципрофлоксацин, эритромицин, а также хлорамфеникол и ко-тримоксазол (сульфаметоксазол и триметоприм). В этой связи очевидна необходимость изучения присутствия генов резистентности к данным лекарственным препаратам в геноме штаммов возбудителя холеры.

Целью данной работы явилось создание мультиканальной ПЦР тест-системы в режиме реального времени для детекции генов лекарственной устойчивости в геноме возбудителей холеры О1 и О139 серогрупп.

Для достижения поставленной цели нами было выбрано 5 ДНК-мишеней, 4 из которых представляли собой гены антибиотикорезистентности (к хлорамфениколу (*floR*), триметоприму (*drfA*), тетрациклину (*tetR*) и ципрофлоксацину (*qnrVC*)), а также ген *recA,* ответственный за синтез рекомбиназы, который являлся внутренним контролем эффективности реакции. На все ДНК-мишени были рассчитаны праймеры и гидролизные зонды. Амплификацию проводили одновременно по 5 каналам в одной пробирке на амплификаторе RotorGeneQ (Qiagen, Германия) по программе, включающей в себя: 1 цикл – 95°С 5 минут; 35 циклов: 95°С – 15 секунд, 60°С – 60 секунд. Детекция флюоресцентного сигнала осуществлялась при 60°С.

Для определения специфичности праймеров и зондов на гены антибиотикорезистентности было использовано 6 штаммов *V. cholerae* классического биовара, которые, по данным литературы, лишены генов *floR, dfrA, qnrVC* и *tetR*, но имеют ген *recA*. Для проверки специфичности праймеров и зонда на ген *recA* использовали штаммы *Escherichia coli 6, M17, Klebsiella pneumoniae, Salmonella enteritidis* ВО3, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Salmonella typhi* ATCC H901, *Shigella sonnei* ATCC 25931. В результате проведения ПЦР было показано отсутствие в геноме указанных штаммов гена *recA*, что подтверждает специфичность праймеров и зонда, подобранных для обнаружения данного гена. В штамме *K. pneumoniae* были обнаружены гены *tetR* и *dfrA,* а в геноме штамма *E.coli 6* только ген *tetR,* что указывает на универсальность праймеров и зондов к генам *tetR* и *dfrA* для представителей других микроорганизмов.

Эффективность созданной ПЦР тест-системы была проверена на 61 штамме *V. cholerae* О1 биовара Эль Тор, 6

штаммах *V. cholerae* O1 классического биовара и 1 штамме *V.cholerae* O139. В результате установлено, что все штаммы *V. cholerae* O1 классического и Эль Тор биоваров несли родоспецифический ген *recA* (см. таблицу). Штаммы V. cholerae O1 Эль Тор биовара, выделенные до 1993 г., были лишены генов *floR* и *dfrA*, обычно расположенных на мобильном SXT-элементе, и гена *tetR*. Полученные сведения могут указывать на отсутствие у анализируемых штаммов SXT элемента, что соответствует данным литературы. В то же время у 72% (18 из 25) клинических штаммов, завезенных после 1993 г., были выявлены гены *floR* и *dfrA*. У 14 штаммов этой группы также был обнаружен ген *tetR*. Ген *qnrVC,* ответственный за резистентность к ципрофлоксацину, детектировался только у 1 клинического штамма, выделенного в Калмыкии в 2011 г. В то же время указанный ген был выявлен у двух штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, изолированных из речной воды в г. Астрахани в 1982 г., и трех штаммов, выделенных в Калмыкии в 2012 – 2013 гг. Необходимо отметить, что все штаммы, выделенные из воды, были лишены генов *floR, dfrA* и *tetR*. В геноме штамма *V. cholerae* O139 серогруппы выявлены гены *recA* и *floR* (см. таблицу).

Параллельно с установлением присутствия генов антибиотикорезистентности было проведено определение лекарственной устойчивости данных штаммов диско-диффузионным методом, полученные результаты полностью соответствовали данным, полученным с помощью созданной нами ПЦР тест-системы.

Таким образом, нами разработана новая мультиканальная ПЦР тест-система с детекцией результатов в режиме реального времени для определения присутствия генов антибиотикоустойчивости к четырем антибиотикам, используемым для лечения холеры (хлорамфеникол, триметоприм, тетрациклин и ципрофлоксацин), в штаммах *V. cholerae* O1 и O139. Показана специфичность праймеров и зондов на гены *recA, floR, dfrA, tetR* и *qnrVC*. Эффективность ПЦР тест–системы подтверждена при анализе более 60 штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы классического и Эль Тор биоваров и *V. cholerae* O139 серогруппы.

Таблица. Исследование эффективности и специфичности созданной ПЦР тест-системы для определения антибиотикорезистентности штаммов *V. cholerae* O1 и O139

Штаммы	Источник выделения	Количество штаммов	*recA*	*tetR*	*qnrVC*	*floR*	*dfrA1*
Штаммы, использованные для определения эффективности ПЦР тест-системы							
Штаммы, выделенные до 1993 г.							
V. cholerae O1 El Tor	человек	13	+	-	-	-	-
V. cholerae O1 El Tor	вода	9	+	-	-	-	-
V. cholerae O1 El Tor	вода	2	+	-	+	-	-
Штаммы, выделенные после 1993 г.							
V. cholerae O1 El Tor	человек	12	+	+	-	+	+
V. cholerae O1 El Tor	человек	5	+	-	-	+	+
V. cholerae O1 El Tor	человек	1	+	-	-	-	+
V. cholerae O1 El Tor	человек	1	+	+	-	-	-
V. cholerae O1 El Tor	человек	4	+	-	-	-	-
V. cholerae O1 El Tor	человек	1	+	-	+	-	-
V. cholerae O1 El Tor	вода	2	+	-	+	-	-
V. cholerae O1 El Tor	вода	11	+	-	-	-	-
V. cholerae O139	человек	1	+	-	-	+	-
Штаммы, использованные для определения специфичности ПЦР тест-системы							
V. cholerae classica	человек	6	+	-	-	-	-
S. typhi ATCC H901	н/и*	1	-	-	-	-	-
S. enteritidis BO3	н/и	1	-	-	-	-	-
E.coli M17	вода	1	-	-	-	-	-
E.coli 6	человек	1	-	+	-	-	-
K. pneumoniae	человек	1	-	+	-	-	+
S. typhimurium ATCC 14028	н/и	1	-	-	-	-	-
Sh. sonnei ATCC 25931	человек	1	-	-	-	-	-

Примечание: н/и* - не известен.

ПОИСК И ДОКАЗАТЕЛЬСТВО АТТЕНУИРУЮЩИХ МУТАЦИЙ В ГЕМАГГЛЮТИНИНЕ ВИРУСА ГРИППА H5N1

Ломакина Н.Ф.[1,2], **Садыкова Г.К.**[2], **Тимофеева Т.А.**[2], **Боравлёва Е.Ю.**[1], **Прилипов А.Г.**[2], **Гамбарян А.С.**[1]

[1]ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН», Москва, Россия

[2]ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи», Москва, Россия

Гемагглютинин (HA) опосредует слияние вирусной и клеточной мембран в эндосоме на стадии проникновения вируса гриппа в клетку. Для запуска этого процесса необходимо снижение pH до значения, при котором происходит необратимое конформационное изменение HA и его переход в активное фьюзогенное состояние. Значение pH перехода и устойчивость HA к низким pH служат важной характеристикой и отличаются у вирусов, принадлежащих разным хозяевам. Вирусы человека и диких уток более стабильны при низких значениях pH в отличие от высоковирулентных вирусов кур, нестабильных при нейтральных pH.

Еще одно непременное условие активации фьюзогенного состояния – это предварительное протеазное расщепление HA на две субъединицы HA1 и HA2, в результате которого пептид слияния, расположенный на N-конце HA2, готов к активации. Сайт протеазного расщепления у непатогенных и слабовирулентных вирусов гриппа представлен моноосновным аминокислотным остатком, а у высоковирулентных вирусов – полиосновным пептидом, что служит маркером патогенности вирусов H5 и H7.

Цель настоящей работы заключалась в поиске аминокислот в HA/H5, ответственных за активацию конформационного изменения HA, и выяснении их роли в изменении вирулентности вируса. Для этого использовали методы обратной селекции, обратной генетики, тест гемолиза эритроцитов и биопробу на мышах.

Методом обратной селекции, - имитирующей жизненный цикл вирусов диких уток и направленной на получение вируса аттенуированного для куриных эмбрионов, более устойчивого к кислым значениям pH и протеазному расщеплению, - из высоковирулентного вируса A/курица/Курган/3/2005 (H5N1, Ku/05) был получен аттенуированный вариант (Ku/at) с ослабленной вирулентностью для цыплят и непатогенный для мышей. На молекулярном уровне в Ku/at произошло 10 аминокислотных замен, из которых 4 расположены в гемагглютинине. При этом в HA сохранился полиосновный сайт расщепления (RRRKKR). Мутация в позиции Lys234/222Thr (нумерация по ABC48787, GenBank / нумерация по H3 A/Aichi/2/1968) изменяет сродство к рецепторам, как было показано ранее [Молекул. генет., микробиол. и вирусол., 2011, №3, С. 35-41], и в данной работе не рассматривается. Остальные 3 мутации - в HA1 Asp61/54Asn и в HA2 Val 48 Ile и Lys 131 Glu - оказались реверсией к вирусам диких уток H3 и H4.

Чтобы выяснить роль этих трех мутаций, аналогичные замены мы внесли в гемагглютинин рекомбинантного вируса A/Vietnam/1203/2004(H5N1)-PR8/CDC-RG (VN-PR), любезно предоставленного доктором P. Вебстером из США. В исходном вирусе VN-PR присутствуют HA и NA от вируса гриппа человека A/Vien Nam/1203/2004 (H5N1). При этом в HA удален полиосновный сайт для ослабления вирулентности. Остальные гены взяты от вируса человека A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1).

На трехмерной молекуле тримера гемагглютинина H5 внесенные мутации находятся в узловых точках, где контактируют отдаленные участки одной цепи, либо разные цепи и субъединицы. Теоретически мутации в местах контакта меняют подвижность молекулы и могут влиять на параметры конформационного изменения гемагглютинина.

Для проверки гипотезы мы использовали тест гемолиза куриных эритроцитов при разных значениях pH в комплексе с исследуемыми вирусами гриппа. Гемагглютинин вируса гриппа агглютинирует эритроциты при нейтральных значениях pH, а при низких - приводит к их гемолизу. Степень гемолиза пропорциональна регистрируемой оптической плотности и зависит от способности гемагглютинина к конформационному переходу при определенном значении pH. Значения pH перехода представлены в таблице. Для исходных вирусов VN-PR и Ku/05 pH перехода составил, соответственно, 5,8 и 5,7. Для их мутантов значения снизились до 5,25 и 5,30, что характерно для слабовирулентных природных вирусов. То есть у вирусов с одинаковыми заменами в трех позициях HA произошло понижение pH перехода гемагглютинина на 0,4-0,55 единиц.

Таблица. Значения pH конформационного перехода гемагглютинина H5

	Вирус птиц, клада 2.2	pH перехода	Вирус человека, клада 1	pH перехода
Исходный	**Ku/05**	5.70 ± 0.05	**VN-PR**	5.80 ± 0.05
3 замены в HA	**Ku/at**	5.30 ± 0.05	**3xVN-PR**	5.25 ± 0.05

*Результаты представлены как среднее значения ± SD, вычисленные на основании трех независимых экспериментов.

Патогенность вирусов по выживаемости и изменению веса испытывали на мышах породы BALB/c весом 7-9 г при интраназальном заражении в дозе от 10^1 до 10^5 $ЭИД_{50}$/мышь. В каждой группе было по 5-6 мышей.

Исходный вирус VN-PR8 оказался столь же патогенен для мышей, как и высоковирулентный вирус A/курица/Курган/3/2005. Смертность была 100%.

Три замены в НА снизили вирулентность вирусов. Выживаемость мышей от тройного мутанта 3xVN-PR8 составила от 50 до 70% в зависимости от дозы инфицирования, а аттенуированного вируса Ку-ат – 100% даже при максимальной дозе заражения, несмотря на то, что в аттенуированном вирусе Ku/at присутствует полиосновный сайт протеолизного расщепления в НА.

Заметим, что испытанные исходные вирусы (VN-PR и Ku/05) и их производные (3xVN-PR и Ku/at) имеют разных хозяев - человека и птиц. Их внутренние гены имеют различное филогенетическое происхождение. Гемагглютинины вирусов отличаются отсутствием или наличием полиосновного сайта протеолиза и принадлежат разным кладам линии высоковирулентных вирусов H5N1 (соответственно, кл. 1 и 2.2), берущих начало от вируса A/goose/Guangdong/1/96 (см. таблицу). Тем не менее внесенные 3 мутации в НА привели к сходным результатам исследований.

На этом основании можно сделать следующий вывод.

Три аминокислоты в гемагглютинине H5 - 61/54Asn в HA1; 48Ile и 131Glu в HA2 - снижают значение pH конформационного изменения гемагглютинина на 0,4-0,55 единиц и существенно понижают вирулентность вируса H5N1 для мышей.

МОЛЕКУЛЯРНОЕ ТИПИРОВАНИЕ *Vibrio cholerae* В СИСТЕМЕ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА ХОЛЕРОЙ И ИЗУЧЕНИИ ФИЛОГЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ: РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ, ПРОБЛЕМЫ, НАПРАВЛЕНИЯ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ

Миронова Л.В., Пономарева А.С., Хунхеева Ж.Ю., Басов Е.А., Гладких А.С., Феранчук С.И., Бочалгин Н.О., Балахонов С.В.

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Иркутск, Россия

Молекулярное типирование – эффективный инструмент в изучении генетических особенностей, внутривидового разнообразия, клонального родства микробных патогенов. Получение детальной информации о геномной организации изолируемых культур патогенов способствует установлению источников и направлений распространения инфекции, выяснению закономерностей эволюционных преобразований и дивергенции отдельных клонов возбудителей. Развитие технологий привело к генерации широкого круга методов молекулярной биологии для решения указанных задач. При этом выбор подхода для молекулярного типирования определяется целью исследования и базируется на оценке комплекса критериев, характеризующих каждый метод.

Цель исследования – комплексное молекулярное типирование изолированных в Сибири и на Дальнем Востоке при разных эпидситуациях штаммов *V. cholerae* и оценка эффективности применения отдельных подходов к типированию в эпидемиологическом надзоре и изучении филогении возбудителя.

Материалы и методы. В рамках комплексного молекулярного типирования исследовано 285 штаммов *V. cholerae*, изолированных в Сибири и на Дальнем Востоке.

MLVA-типирование проводилось на основании структуры пяти локусов вариабельных тандемных повторов *V. cholerae* – VcA, VcB, VcC, VcD, VcG (Водопьянов А.С. с соавт., 2001). PFGE-типирование выполнялось в соответствии с международным протоколом с использованием эндонуклеаз *NotI* и *SfiI*. *Мультилокусное сиквенс-типирование* осуществлялось по схеме P. Garg с соавт., 2003. Сопоставление секвенированных фрагментов ДНК, определение консенсусных последовательной генов – с применением программы VectorNTI v. 10.0. Кластерный анализ результатов секвенирования – по алгоритму neighbor-joining, MLVA-типирования – по алгоритмам UPGMA и MST, *PFGE-типирования* – по алгоритму UPGMA в программе BioNumerics 6.0.-7.5. *Полногеномное секвенирование* проводилось согласно протоколу Roche с реагентами GS Junior Titanium Series. В рамках проведения филогенетического анализа в исследование включено 110 секвенированных ранее геномов *V. cholerae*, размещенных в GenBank. Филогенетическая реконструкция выполнялась с использованием байесовского анализа в программе MrBayes 3.2.6.

Результаты. Комплексное молекулярное типирование показало существенную дистанцированность штаммов холерного вибриона разной эпидемической значимости, изолированных в Сибири и на Дальнем Востоке.

При этом все токсигенные изоляты периода ассоциированных с завозом инфекции эпидемических осложнений, а также спонтанные мутанты токсигенных штаммов, утратившие гены холерного токсина, по результатам анализа группы генов «домашнего хозяйства» отнесены к одной клональной линии с идентичным сиквенс-типом, тогда как по данным MLVA- и PFGE-типирования установлена дифференциация их на отдельные кластеры, ассоциированные с направлением и периодом завоза возбудителя, а в пределах отдельных вспышек изоляты относятся к клональным с дивергенцией на близкородственные субклональные варианты. Гетерогенность изолированных на территории эпидемически опасных штаммов подтверждена полногеномным SNP-анализом, на основании которого исследуемые изоляты вошли в состав второй и третьей волн глобального распространения возбудителя холеры в период седьмой пандемии.

Что касается потенциально эпидемически опасных *V. cholerae* (*ctxAB⁻ tcpA⁺*), обнаруженных в поверхностных водоемах Сибири и Дальнего Востока на фоне эпидблагополучия (Алтайский край, 2011 г., Хабаровский край, 2013 г.), то на дендрограмме, по данным MLVA и PFGE, они демонстрируют высокую гомологию с эпидемически опасными холерными вибрионами. Вместе с тем, по структуре генов жизнеобеспечения данная группа штаммов обнаруживает сходство как с токсигенными, так и с нетоксигенными, и при кластерном анализе группируется с холерным вибрионом классического биовара.

Выделенные в регионе из поверхностных водоемов в период эпидблагополучия *ctxAB⁻ tcpA⁻* штаммы *V. cholerae* характеризуются высокой генетической гетерогенностью. Однако следует отметить, что если при MLVA-типировании изоляты с идентичным аллельным профилем обнаруживались на разных территориях в разные годы, то по результатам PFGE-типирования они демонстрируют территориальную приуроченность. Анализ MLVA-профилей в динамике свидетельствует о кратковременном закреплении штаммов определенных генотипов в водных экосистемах на отдельных территориях (г. Иркутск) или их длительной персистенции (Забайкальский край) с трансформацией генотипа и формированием близкородственных однолокусных вариантов.

Заключение. Сопоставление результатов типирования позволяет заключить, что в группе анализируемых методов наибольшей эпидемиологической конкордантностью характеризуется PFGE, который, соответственно, целесообразно применять для анализа направлений завоза возбудителя, оценки его территориального распространения и реконструкции звеньев эпидемической цепи. Вместе с тем, одно из ограничений эффективного применения данного подхода к типированию – отсутствие возможности сравнения результатов типирования с международной базой данных. Решение указанной проблемы может заключаться как в реализации мероприятий по интеграции в международную сеть *PulseNet*, так и в создании национальной ГИС-основанной базы пульс-электротипов штаммов холерного вибриона, включающей одновременно данные эпидемиологического анализа. Высокая гетерогенность возбудителя холеры при MLVA-типировании по используемой схеме снижает эффективность метода при проведении эпидемиологического анализа, но одновременно определяет его информативность при популяционных исследованиях для оценки динамики генетической изменчивости холерного вибриона. Кроме того, эффективно применение сокращенной схемы MLVA-типирования при анализе токсигенных штаммов *V. cholerae* для предварительной оценки их принадлежности к линиям глобального распространения возбудителя. Метод MLST дает возможность проследить эволюционные взаимосвязи разных групп *V. cholerae*, оценить структуру популяции нетоксигенных штаммов, но не эффективен при проведении молекулярно-эпидемиологического анализа осложнений по холере. Полногеномное SNP-типирование обладает высокой информативностью при оценке эволюционных процессов, выяснении закономерностей глобального распространения клонов патогена и оказывается высокоэффективным в установлении направлений завоза инфекции. Учитывая потенциальную возможность трансформации генотипа холерного вибриона по наиболее вариабельным локусам при персистенции в водных объектах или при хранении на питательных средах целесообразно проведение типирования изолированных культур *V. cholerae* с применением отдельных методов (таких как MLVA и PFGE) на уровне региональных центров по мониторингу за возбудителями при наличии соответствующего оснащения лабораторий.

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ ГЕНОМОВ ЭПИДЕМИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ШТАММОВ *Vibrio cholerae* EL TOR, ВЫДЕЛЕННЫХ В СИБИРИ И НА ДАЛЬНЕМ ВОСТОКЕ РФ

Миронова Л.В., Гладких А.С., Пономарева А.С., Феранчук С.И., Басов Е.А., Хунхеева Ж.Ю., Балахонов С.В.

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Иркутск, Россия

Холера – особо опасная инфекция, склонная к пандемическому распространению. По разным оценкам, в мире ежегодно холерой заболевают от 1,3 до 4,0 млн человек с 21000–143000 летальных случаев (Ali et al., 2015). Начавшаяся в 1961 г. седьмая пандемия холеры характеризуется большей продолжительностью и масштабностью в сравнении с шестью предыдущими. Установлено, что этиологический агент пандемии – *V. cholerae* El Tor - распространялся волнообразно из одного источника в Бенгальском заливе, где происходила трансформация его биологических свойств. При этом один из значимых этапов в его эволюции – формирование атипичных генетически измененных вариантов с признаками классического биовара.

Территория Сибири и Дальнего Востока относится к категории эпидемиологически благополучных по холере, однако в период текущей пандемии были зарегистрированы случаи завоза инфекции (1970-е гг., 1994 г., 1997 г., 1999 г.) и связанные с завозом острые местные вспышки (1972 г., 1973 г., 1999 г.).

Цель работы – характеристика структуры генома и филогеографический анализ изолированных при эпидемических осложнениях по холере в Сибири и на Дальнем Востоке атипичных штаммов *V. cholerae* El Tor.

Материалы и методы. В ходе исследования было проведено полногеномное пиросеквенирование четырех штаммов *V. cholerae* El Tor, выделенных в 1990-е гг. от больных на территории Сибири и Дальнего Востока. Изучена структура и определена хромосомная локализация профага CTX и RS1 области. Для изучения структурных особенностей генома проводили ПЦР с аллель-специ-

фичными праймерами и праймерами, специфичными к определенным участкам генома. Сборку контигов проводили путем картирования на геном референсного штамма *V. cholerae* El Tor N16961 с последующей аннотацией в программе Geneious 8.0.5. Также был проведен поиск однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в коровой части геномов как выделенных на анализируемой территории штаммов, так и 110 использованных в работе Didelot X. С соавт. (2015) штаммов *V. cholerae* El Tor, нуклеотидные последовательности которых размещены в международной базе данных GenBank. Для определения филогенетического положения изучаемых штаммов был применен байесовский подход с учетом времени выделения штаммов, реализованный в программе BEAST 1.8.4.

Результаты. При картировании ридов были получены скаффолды, покрывавшие более 98% референсного генома. Так как картирование не разрешает проблемы локазизации отдельных мобильных генетических элементов в составе генома, применение ПЦР с подобранными комбинациями праймеров позволило определить наличие тандемного повтора RS1 области на первой хромосоме и тандемного повтора профага CTX в составе второй хромосомы у двух штаммов. Два других штамма несут RS1:CTX последовательность в составе первой хромосомы, тогда как малая хромосома свободна от данных генетических элементов.

Изучение характера полиморфизмов в составе CTX профага выявило, что указанный мобильный генетический элемент двух штаммов соответствует CTX-2 типу, а двух других – CTX-3. При этом все исследованные штаммы *V. cholerae* характеризуются наличием классического варианта гена *ctxB* (в позициях 115 и 203 присутствует C) и типичной для Эль Тор вариантов организацией *ctxAB* промоторной области. Были идентифицированы структурные особенности детерминант цитотоксического комплекса MARTX и островов пандемичности VSP-I и VSP-II исследуемых штаммов *V. cholerae* El Tor.

Филогенетический анализ на основании матрицы однонуклеотидных полиморфизмов показал, что все штаммы выборки распределились на три группы, согласующиеся с установленными ранее волнами распространения холеры в мире и дифференциацией каждой волны на подгруппы. Для исследованных в ходе работы штаммов установлены ближайшие генетически родственные клоны (изоляты из Китая, Бангладеш и Джибути). Выделенные в Сибири и на Дальнем Востоке штаммы *V. cholerae* El Tor вошли в состав двух волн: два штамма отнесены ко второй волне, и два – к третьей, что согласуется со структурой и локализацией мобильных генетических элементов (RS1 области и CTX профага) и с характером полиморфизмов генов области RS2.

Количество полиморфных сайтов в составе геномов исследуемых штаммов *V. cholerae* по сравнению с референсным штаммом *V. cholerae* N16961 составило не больше 100 на геном. При анализе характера полиморфизмов изолятов каждой волны распространения холеры показано наличие специфических SNP, характерных для отдельных волн. Расчетная скорость мутаций на основе используемой матрицы составляет $4.5 \pm 0.5 \cdot 10^{-4}$ SNP на один полиморфный сайт в год.

Заключение. Таким образом, установлены особенности структурной организации и локализации ассоциированных с патогенностью мобильных генетических элементов в геноме исследованных атипичных штаммов *V. cholerae*, изолированных в Сибири и на Дальнем Востоке, что подтверждает принадлежность их к различным линиям глобального распространения холеры. Проведенный филогеографический анализ позволяет предположить происхождение импортированных в регион штаммов (страны Южной и Восточной Азии) и пути их распространения непосредственно из источника возникновения или через промежуточные очаги.

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ ГЕНОМА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ХОЛЕРЫ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИЯХ РОССИИ И СОПРЕДЕЛЬНЫХ СТРАН

Монахова Е.В., Писанов Р.В., Титова С.В.

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, Россия

Проблема холеры, не утратившая своей актуальности в мире, не может считаться исчерпанной и для Российской Федерации (РФ). Это обусловлено, с одной стороны, рисками заноса эпидемически опасных штаммов из эндемичных стран, с другой – с постоянным выделением *Vibrio cholerae* O1 из открытых водоемов по всей территории страны, что предполагает возможность их более или менее длительного сохранения и формирования в его процессе новых высоковирулентных клонов за счет способности к обмену генетической информацией, благодаря которой природные популяции холерных вибрионов принято считать резервуарами генов факторов патогенности. Для оценки потенциальных рисков необходимо знание совокупного набора генов и их аллелей, присутствующих в геномах штаммов, циркулирующих в РФ и на пограничных территориях.

Цель и задачи: анализ распространения различных генов и их аллелей в популяциях холерных вибрионов, циркулирующих в РФ и на сопредельных территориях.

Материалы и методы. Объектами исследования служили 54 штамма холерных вибрионов O1, O139 и неO1/неO139 серогрупп, выделенные от людей и из источников окружающей среды на территории РФ и некоторых бывших республик СССР с 1970 по 2015 гг. Качественный состав генов определяли традиционным методом ПЦР с использованием специфических праймеров. Полногеномные последовательности ДНК определяли на платформе MiSeq (Illumina) согласно прилагаемому к оборудованию протоколу. Отдельные гены и их кластеры идентифицировали в полных геномах в режиме on-line с помощью программы BLASTN 2.2.29, для сборки генов использовали программу ContigExpress, для анализа генов и их продуктов – AlignX (Vector NTI 11). В сравнительный

анализ были также включены последовательности, найденные в базах NCBI GenBank.

Основные результаты. Поскольку ключевыми факторами патогенности холерных вибрионов являются холерный токсин и токсин-корегулируемые пили адгезии, нас в первую очередь интересовали штаммы, несущие их детерминанты, соответственно *ctxAB* (в составе профага CTX) и *tcpA* (в составе острова патогенности VPI). На современном этапе седьмой пандемии ведущая роль в этиологии холеры принадлежит генетически измененным штаммам, содержащим специфические точечные мутации (SNP) в генах *ctxB* и *tcpA*, в соответствии с которыми различают несколько аллелей обоих генов. У геновариантов *V. cholerae* O1 *ctxB* типа Эль Тор (*ctxB3*) замещен *ctxB* классического типа *ctxB1* либо его вариантом *ctxB7*. С помощью Blast-анализа все эти аллели были идентифицированы в полногеномных сиквенсах штаммов, выделенных в РФ от больных и из объектов окружающей среды с 1974 по 2014 г. Кроме того, у клинического штамма неO1/неO139 серогруппы, выделенного в Узбекистане (1987), была выявлена ранее не описанная аллель *ctxB9* в составе профага CTX (KR072210), который оказался полностью идентичным таковому одного из штаммов O37 серогруппы (AAKJ2.1), вызвавших крупную вспышку в Судане в 1968 г. (460 заболевших, 125 летальных исходов), в связи с чем был обозначен нами как CTX^{Sudan}. Кроме *ctxB9* он содержал целый ряд SNP в других генах.

Ген *tcpA* представлен тремя известными аллелями: классической ($tcpA^{class}$), «канонической» Эль Тор ($tcpA^{ET}$) и $tcpA^{CIRS101}$ (по наименованию штамма, в котором была впервые обнаружена); также существует множество еще не описанных аллелей этого гена. У токсигенных штаммов, выделенных в РФ, идентифицированы все 3 аллели. При этом у геновариантов $tcpA^{CIRS101}$ встречалась только в сочетании с *ctxB1* либо *ctxB7*.

Штаммы различались и по структуре гена *rtxA*, кодирующего синтез цитотоксина MARTX. Ранее Dolores, Satchell (2013) описали 9 аллелей этого гена, из них наибольший интерес представляет *rtxA4*, продукт которой утратил функциональность за счет образования «преждевременного» стоп-кодона в гене. Нами были идентифицированы еще 2 аллели – *rtxA2a* с новой SNP и *rtxA4a* с делецией 60 п.н. в проксимальной части. Наряду с *rtxA4* показателем высокого эпидемического потенциала *V.cholerae* считают наличие протяженной делеции в острове пандемичности VSP-II. В геномах изученных штаммов аллели трех указанных генов и VSP-II образовали 9 разных сочетаний (таблица).

Таблица. Распределение генетических маркеров среди 26 CTX^{+} штаммов *V.cholerae*

Аллели генов			VSP-II	N* C/E	Место и время выделения штаммов
ctxB	*tcpA*	*rtxA*			
3	ET	1	prototype	2/2	Керчь-74, Ставрополь-90, Ростов-00
3	ET	2a	prototype	1/0	Таганрог, 1972
1	ET	1	prototype	4/3	Дагестан-94, Казань-01, Ростов-01, 03
1	ET	1	Δ0502-0512	0/1	Ростов-03
1	CIRS101	4	Δ0495-0512	6/2	Тверь-05, Мурманск-06, Москва-10, Таганрог-11, Ростов-14, Бангладеш-02
7	CIRS101	4a	Δ0495-0512	2/0	Москва-12, 14
9	New1	6	отсутствует	1/0	Узбекистан-87
9	New2	9	отсутствует	1/0	Судан-68
1	class	Δ5,7т.п.н.	отсутствует	0/1	Ростов-99

*N – число штаммов, C – клинические, E – штамм из объектов окружающей среды.

Нетоксигенные штаммы *V.cholerae* O1 также могут вызывать острые холероподобные диареи, реализуя патогенетический потенциал за счет продукции целого ряда дополнительных факторов патогенности. Такие штаммы, выделенные из разных источников в РФ и ряде бывших республик СССР, представлены разнообразными генотипами, различающимися как по количественному, так и по качественному составу наборов генов. Они могут содержать профаги pre-CTX, острова VPI с разными аллелями *tcpA*, полные либо неполные: остров VPI-2, кластеры RTX (с известными и новыми аллелями *rtxA*), систем секреции третьего и шестого типов (T3SS и T6SS), а также множественные, в том числе впервые выявленные уникальные аллели генов цитотонического токсина Cef (CHO cell elongation factor), cholix-токсина (*chxA*), манно-зо-чувствительных пилей *mshA*, гемагглютинин/протеазы *hapA*, коллагеназы VC1650, сериновой протеазы (VC1649), белков наружной мембраны *ompU* и *ompW*, глобального регулятора *toxR*. Все эти детерминанты у разных штаммов находились в различных сочетаниях, но почти полный их набор присутствовал в популяциях, циркулирующих на конкретных территориях.

Заключение. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что штаммы холерных вибрионов, выделяемые в РФ и на прилегающих территориях, как и циркулирующие в других регионах мира, могут рассматриваться как резервуар генов факторов патогенности. Вместе с тем, природные популяции в условиях умеренного климата представляют скорее динамичные, чем постоянные сообщества, в которых на смену одним

штаммам приходят другие, занесенные извне либо сформировавшиеся в результате генетической рекомбинации. Мы допускаем, что до того, как какой-либо штамм будет элиминирован, он вполне может успеть передать другим определенные аллели генов, что приведет к образованию геновариантов с повышенным эпидемическим либо патогенетическим потенциалом. Все это указывает на риски возникновения эпидосложнений, для оценки степени вероятности которых необходимы дальнейшие исследования структуры генов холерных вибрионов в сочетании с фенотипическими особенностями их продуктов.

СТАНДАРТИЗАЦИЯ И ПОВЫШЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ГЕННОЙ ДИАГНОСТИКИ ХОЛЕРЫ

Найденова Е.В., Осина Н.А., Яшечкин Ю.И., Шарова И.Н.

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия

В настоящее время одним из направлений деятельности ФКУЗ «Российский НИПЧИ «Микроб» является разработка генодиагностических препаратов для выявления ДНК возбудителей особо опасных инфекционных болезней. Разработаны и успешно внедрены в практику наборы реагентов для обнаружения ДНК чумного, туляремийного и сибиреязвенного, бруцеллезного микробов, а также холерных вибрионов в клиническом материале и объектах окружающей среды методом ПЦР с электрофоретическим и гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов.

Регламент производства генодиагностических препаратов предусматривает проведение на промежуточных этапах контроля качества отдельных реагентов и реакционных смесей. Для выполнения таких исследований необходима панель препаратов ДНК, выделенных из бактериальных суспензий соответствующего микроорганизма с концентрациями 1×10^4 - 1×10^2 м.к./мл. При комплектации амплификационных тест-систем для выявления возбудителей чумы, туляремии, сибирской язвы и бруцеллеза с этой целью могут быть использованы вакцинные штаммы: *Y. pestis* EV НИИЭГ, *F. tularensis* 15 НИИЭГ, *B. anthracis* СТИ-1, *B. abortus* 19 ВА, содержащие в геноме локусы, которые являются ДНК-мишенями для праймеров и зондов, входящих в состав этих препаратов. В тоже время для контроля препаратов, направленных на выявление и идентификацию холерных вибрионов, возможно использование токсигенных культур *V. cholerae* (*ctxA*+ *tcpA*+), так как во всех наборах реагентов для генной диагностики холеры ДНК-матрицами являются гены *ctxAB* и *tcpA-F*, отвечающие за синтез холерного токсина и токсин-корегулируемых пилей адгезии, соответственно.

Одним из подходов для исключения необходимости применения эпидемически значимых штаммов возбудителя холеры при производстве генодиагностических препаратов может быть конструирование штаммов *E. coli*, несущих рекомбинантные плазмиды, содержащие фрагменты *ctxA* - и *tcpA*- генов, и разработка на основе плазмидной ДНК количественно охарактеризованного стандартного образца предприятия (СОП).

С этой целью было проведено клонирование фрагментов *ctxA* гена размером 564 п.н. и *tcpA* гена размером 667 п.н. в вектор pGEM («Promega», США). Полученными плазмидами трансформировали штамм *E. coli* JM 109 («Promega», США). Рекомбинантные клоны отбирали на дифференциальной среде с добавлением ампициллина. В результате проведенной работы получены штаммы *E. coli* JM109 pGEM–T_{tcp667} и *E. coli* JM109 pGEM–$T_{ctx564.}$ Установлена их высокая стабильность в течение 5 пассажей.

В дальнейшем сконструированные штаммы использовали для выделения ДНК плазмид, из которых была сформирована панель, включающая препараты: ДНК плазмиды pGEM–$T_{tcp667,}$ ДНК плазмиды pGEM–T_{ctx564} и смесь ДНК обеих плазмид в концентрациях 1×10^6–1×10^2 ГЭ/мл. При постановке ПЦР с использованием набора реагентов «Ген V. cholerae – идентификация РЭФ», производства ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», образование ампликонов размером 564 п.н. (*ctxA*) наблюдали во всех случаях при исследовании разведений ДНК плазмиды pGEM–T_{ctx564} от 1×10^6 до 1×10^2 ГЭ/мл, тогда как фрагмент размером 217 п.н. (*tcpA*) регистрировался при анализе проб, содержащих ДНК pGEM–T_{tcp667} от 1×10^6 до 1×10^3 ГЭ/мл. Амплификация обоих фрагментов отмечена во всех пробах, где концентрация плазмидной ДНК каждого рекомбинантного штамма составляла до 1×10^3 ГЭ/мл. Исходя из полученных данных, был подготовлен СОП, включающий в себя панель препаратов ДНК плазмид pGEM–T_{tcp667} и pGEM–T_{ctx564} по отдельности и в смеси в концентрациях от 1×10^5 до 1×10^3 ГЭ/мл.

Результаты сравнительной оценки чувствительности ПЦР, полученные при использовании разработанного СОП и препаратов ДНК, выделенных из бактериальных суспензий *V. cholerae eltor* 1344 (*ctxA*+*tcpA*+) и *V. cholerae* классического биовара 569B (*ctxA*+*tcpA*+) с концентрацией 1×10^4–1×10^3 м.к./мл, полностью совпадали.

В ходе дальнейших исследований установлено, что при использовании предложенного СОП для постановки ПЦР с помощью зарегистрированных в настоящее время препаратов для генной диагностики холеры: «ГенХол» (№ФСР 2007/00100, производство ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»), «Ген *Vibrio cholerae*-идентификация-РЭФ» (№ФСР 2012/13430, производство ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»), «АмплиСенс *V. cholerae*-FL» (№ФСР 2011/11139, производство ЦНИИ эпидемиологии), во всех случаях наблюдалось образование характерных фрагментов *ctxA* и *tcpA* генов, или специфичная флуоресценция по соответствующим каналам, предусмотренным тест-системами. Полученные результаты указывают на эффективную амплификацию плазмидной ДНК штаммов *E. coli* JM109 pGEM–T_{tcp667} и *E. coli* JM109 pGEM–T_{ctx564} с праймерами/

зондами на основе *ctxA* и *tcpA* генов, входящими в состав указанных выше препаратов, и свидетельствуют о возможности использования СОП для осуществления входного контроля препаратов для генной диагностики холеры.

Таким образом, нами сконструированы штаммы *E. coli*, несущие рекомбинантные плазмиды со встроенными участками генов *ctxA* размером 564 п.н. и *tcpA* размером 667 п.н., и разработан на их основе СОП, который может быть использован вместо бактериальных суспензий эпидемически значимых штаммов холерных вибрионов в процессе производства препаратов для генной диагностики холеры, что позволит снизить риск биологической опасности и обеспечить стандартизацию его этапов.

РАЗРАБОТКА СПОСОБОВ ПЦР- И SNP-ТИПИРОВАНИЯ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* СРЕДНЕВЕКОВОГО БИОВАРА ИЗ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ И ЗАРУБЕЖНЫХ СТРАН

Носов Н.Ю., **Ерошенко Г.А., Гусева Н.П., Малахаева А.Н., Кутырев В.В.**

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт» «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Российская Федерация

Чума – особо опасная инфекционная болезнь, характеризующаяся высоким процентом летальности при отсутствии своевременного лечения. На территории Российской Федерации располагается 11 природных очагов чумы. В 7 из них циркулируют штаммы средневекового биовара, отличающиеся высокой вирулентностью и эпидемической значимостью. Все штаммы средневекового биовара обладают рядом общих биохимических свойств – способностью к ферментации глицерина и арабинозы при отсутствии ферментации рамнозы и редукции нитратов. Штаммы *Yersinia pestis* средневекового биовара относятся к филогенетической ветви эволюции 2.MED, которая в свою очередь делится на линии 2.MED1, 2.MED2 и 2.MED3 в зависимости от географического региона распространения средневековых штаммов. Ранее при исследовании штаммов средневекового биовара из природных очагов РФ и стран СНГ нами было обнаружено, что все они относятся к филогенетической линии 2.MED1, в то время как штаммы линий 2.MED2 и 2.MED3 циркулируют на территории Китая, что делает возможным их занос в РФ и другие страны СНГ. Филогенетическая ветвь 2.MED является одной из самых эволюционно молодых и генетически однородных ветвей *Y. pestis*, в связи с чем внутрибиоварная дифференциация средневековых штаммов является трудной, но важной задачей. Актуальным является также создание способа дифференциации штаммов средневекового биовара по их очаговой принадлежности, что позволяет устанавливать пути заноса и распространения инфекции.

Целью настоящего исследования явилась разработка способа ПЦР типирования, позволяющего дифференцировать штаммы *Y. pestis* средневекового биовара по их принадлежности к филогенетическим линиям 2.MED1, 2.MED2 или 2.MED3, а также способа SNP-типирования штаммов по их принадлежности к природным очагам РФ.

Поиск эффективных ДНК мишеней для дифференциации штаммов *Y. pestis* филогенетических линий 2.MED1, 2.MED2 и 2.MED3 выполняли на основе сравнения полногеномных последовательностей штаммов этих линий из базы данных NCBI GenBank с применением программы Mauve. Поиск маркерных единичных нуклеотидных замен проводили на выборке полногеномных последовательностей штаммов из природных очагов РФ и сопредельных государств, а также штаммов из NCBI GenBank с использованием программы Wombac 2.0 на операционной системе BioLinux 7.0. На найденные маркерные делеции и SNPs были сконструированы праймеры в программе Ugene 1.16.1. ПЦР ставили по общепринятому способу.

В результате сравнения полногеномных последовательностей штаммов средневекового биовара в программе Mauve обнаружены 2 хромосомные ДНК мишени, позволяющие устанавливать принадлежность к филогенетическим линиям 2.MED1, 2.MED2 и 2.MED3. Эти мишени содержат специфичные для этих линий делеции, которые могут быть обнаружены в ПЦР с электрофоретическим учетом результатов. Первой мишенью является ген YPN_2820 (по аннотации генома *Y. pestis* Nepal516, NCBI GenBank). Этот ген отсутствует у штаммов линии 2.MED1, но присутствует у штаммов 2.MED2 и 2.MED3. Вторая мишень представляет собой участок в гене *clpV* (y1538 по аннотации генома *Y. pestis* KIM10). Наличие в этом участке делеции в 70 п.н. является маркерным для линии 2.MED3. Таким образом, по сочетанию результатов двух ПЦР можно судить о филогенетической принадлежности штамма. Наличие интактных мишеней YPN_2820 и *clpV* свидетельствует о том, что штамм относится к линии 2.MED2, отсутствие мишени YPN_2820 и присутствие интактного *clpV* – к линии 2.MED1, наличие YPN_2820 и делеции в *clpV* – к линии 2.MED3.

Эффективность разработанного способа ПЦР-типирования штаммов средневекового биовара доказана на 70 штаммах *Y. pestis* из очагов РФ и зарубежных стран, включая штаммы из очагов Киргизии, Китая и Индии.

В результате проведенного поиска в программе Wombac 2.0 были найдены маркерные единичные нуклеотидные замены, характерные для природных очагов чумы РФ, в которых циркулируют штаммы средневекового биовара. Фрагментное секвенирование полученных в ПЦР с помощью рассчитанных праймеров амплификатов для выявления наличия нуклеотидных замен осуществляли на генетическом анализаторе ABY PRISM 3500.

Найденные маркерные SNPs были следующими:

1. Замена цитозина на тимин в позиции 380909 (по геному штамма CO92, номер доступа NC_003143) для Центрально-Кавказского высокогорного очага;

2. Замена гуанина на аденин в позиции 3966143

для Терско-Сунженского низкогорного очага;

3. Замена цитозина на тимин в позиции 570744 для Волго-Уральского степного очага;

4. Замена гуанина на аденин в позиции 3496401 для Прикаспийского песчаного очага;

5. Замена аденина на тимин в позиции 202919 для Волго-Уральского песчаного очага.

Эффективность найденных ДНК мишеней доказана нами на 59 штаммах *Y. pestis*, из которых 29 штаммов были получены в этих природных очагах, а 30 штаммов средневекового биовара – в других природных очагах чумы РФ и сопредельных государств.

Таким образом, нами впервые найдены ДНК мишени и разработаны способы ПЦР- и SNP-типирования штаммов *Y. pestis* средневекового биовара, которые могут быть использованы при проведении эпидемиологического мониторинга в природных очагах чумы в РФ и странах ближнего и дальнего зарубежья, а также для анализа современной популяционной структуры средневековых штаммов.

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СПОСОБОВ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ БРУЦЕЛЛЕЗА МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ (ПЦР) С ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ УЧЕТОМ РЕЗУЛЬТАТОВ

Осина Н.А., Касьян Ж.А., Касьян И.А., Казакова Е.С., Степанов А.В.

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия

Бруцеллез является особо опасным и социально значимым инфекционным заболеванием, распространенным во многих странах мира. Возбудитель бруцеллеза относится к роду *Brucella,* который, в свою очередь, подразделяется на 11 видов. В Российской Федерации зарегистрирована циркуляция 6 видов *Brucella spp.* В соответствии с действующими нормативно-методическими документами для дифференциации возбудителя бруцеллеза предусмотрено изучение роста штаммов в атмосфере с избыточным содержанием углекислоты и на средах, содержащих фуксин и тионин, образования сероводорода и наличия дезаминазной активности, агглютинабельности моноспецифическими (A-, M-, R-) сыворотками, чувствительности к бруцеллезным бактериофагам Тб (Тбилиси), Wb (Weybridge), Fi (Firenze), Bk2 (Berkley). Однако выполнение таких исследований трудоемко, продолжительно и не позволяет определить все основные виды бруцелл.

В последние годы для идентификации *Brucella* spp. все чаще находят применение молекулярно-генетические методы, такие как ПЦР и ее модификации, а также рестрикционный анализ [Redkar *et al.,* 2001, Lopez-Goni *et al.,* 2008, Ica *et al.,* 2012, Lopez-Goni *et al.,* 2011; Касьян Ж.А. с соавт., 2016]. Однако большинство из предложенных подходов имеют электрофоретическую детекцию результатов [Lopez-Goni *et al.,* 2008, 2011; Ica *et al.,* 2012], а разработанные ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени недостаточно информативны - обеспечивают идентификацию отдельных видов или групп видов патогена [Redkar *et al.,* 2001; Касьян Ж.А. с соавт., 2016].

Поэтому представляется необходимым продолжить работу по совершенствованию способов идентификации возбудителя бруцеллеза методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени.

Для определения видов *B. melitensis* и *B. neotomae* ранее нами была подтверждена эффективность использования локусов *BRA0541*, *BMEII0711*. По результатам проведенного нами анализа *in vitro* дифференциация *B. abortus* может быть осуществлена на основании отсутствия амплификации у них фрагмента гена *BRA0420*, а *B. ovis* – гена *BMEI0994*. С целью дифференциации видов *B. suis* и *B. canis* перспективным представляется использование локуса *BMEI1426*, который по данным Lopez-Goni *et al.* [2011] делетирован у штаммом *B. canis*. Для обеспечения возможности идентификации культур бруцелл, имеющих атипичные амплификационные профили вариабельных участков генома разных видов патогена, необходимым являлось введение в перечень выявляемых генетических локусов родоспецифичных генов. С этой целью нами использован участок *bcsp31*, кодирующий синтез белка внешней мембраны размером 31 кДа.

Экспериментальным путем подобрано необходимое соотношение реагентов и условия реакции. Для проведения амплификации в мультилокусном формате в состав зондов введены флуоресцентные метки FAM, R6G и ROX и соответствующие им гасители флуоресценции RTQ1, BHQ2. Праймеры и зонды на основе генов *bcsp31*, *BRA0420, BRA0541* объединены в одну ПЦР-смесь, а на основе *BMEI1426, BMEII0711, BMEI0994* - в другую (таблица 1).

Таблица 1. Принцип мультилокусной амплификации подобранных участков для определения видовой принадлежности бруцелл

Вид	Реакционная смесь-1			Реакционная смесь-2		
	FAM *(bcsp31)*	JOY *(BRA0541)*	ROX *(BRA0420)*	FAM *(BMEI1426)*	JOY *(BMEII0711)*	ROX *(BMEI0994)*
B.abortus	+	+	-	+	+	+
B.melitensis	+	-	+	+	+	+

Вид	Реакционная смесь-1			Реакционная смесь-2		
	FAM *(bcsp31)*	JOY *(BRA0541)*	ROX *(BRA0420)*	FAM *(BMEI1426)*	JOY *(BMEII0711)*	ROX *(BMEI0994)*
B.suis	+	+	+	+	+	+
B.canis	+	+	+	-	+	+
B.ovis	+	+	+	+	+	-
B.neotomae	+	+	+	+	-	+

Высокая чувствительность (5×10^3 м.к./мл) и специфичность (100%) разработанного способа подтверждена при исследовании 19 типовых штаммов бруцелл: *B. abortus* 19BA, *B. abortus* 544, *B. abortus* Tulya, *B. abortus* 292, *B. abortus* B-3196, *B. abortus* 870, *B. abortus* C-68, *B. abortus* 63/75, *B. melitensis* 706, *B. melitensis* 63/9, *B. melitensis* 16M, *B. suis* 1330, *B. suis* Thomsen, *B. suis* 686, *B. suis* 40, *B. suis* 513, *B. suis* 1330, *B. canis 6/66, B. neotomae* 5k33, и 47 природных: *B. abortus* - 14, *B. melitensis* - 13, *B. suis* - 12, *B. canis* - 2, *B. ovis* - 4, *B. neotomae* - 2, а также гетерологичных микроорганизмах из фонда Государственной коллекции ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб».

Таким образом, нами разработан способ одновременной дифференциации шести основных видов бруцелл: *B. abortus, B. melitensis, B. suis, B. canis, B. ovis, B. neotomae* методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени, основанный на амплификации шести ДНК-мишеней: *bcsp31, BRA0420, BRA0541, BMEI1426, BMEII0711, BMEI0994*. Показана его высокая диагностическая ценность.

ПРОТЕОМНОЕ КАРТИРОВАНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Печковский Г.А., Калинин А.В., Котенева Е.А., Цыганкова О.И., Царева Н.С., Гнусарева О.А.

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия

Возбудители особо опасных инфекций (ООИ) I-II групп патогенности до сих пор представляют серьезную опасность для мирового сообщества. Нестабильная геополитическая обстановка в мире создает постоянную угрозу неконтролируемых миграционных потоков, с одной стороны, и высокую вероятность применения патогенных микроорганизмов в качестве поражающих агентов при актах биотерроризма, что может стать причиной массовых эпидемических осложнений. Всестороннее изучение микроорганизмов является необходимым условием разработки профилактических, лекарственных и диагностических препаратов нового поколения. Детальное изучение особенностей белкового спектра микроорганизмов относящихся к I-II группам патогенности (*Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis*) и функционирования белковых комплексов, определяющих вирулентность и иммуногенность, позволяет находить подходы к созданию вакцинных препаратов нового поколения и определять основные направления разработки современных средств патогенетической и антибактериальной терапии.

Цель работы: применение технологии протеомного катрирования для исследования штаммов возбудителей особо опасных инфекций.

Материалы и методы. В работе были использованы вакцинные и авирулентные штаммы: *B.anthracis* СТИ, Δ СТИ, Sterne 34F2, Sterne tox^-, 228/8, 228/4, *Y.pestis* EV; *F.tularensis* НИИЭГ 15, 15/10. Все штаммы выращивали в течение 24 ч. при 37^0 С на твердой питательной среде, в зависимости от вида возбудителя: штаммы *Y.pestis* и *B.anthracis* выращивали на LB агаре (по Ленноксу), штаммы *F.tularensis* – на FT агаре. Для экстракции тотального протеома использовали лизирующие буферы с разной концентрацией хоатропных агентов (мочевины и тиомочевины) и неионных детергентов. Для сибиреязвенного микроба в составе лизирующего буфера использовали гуанидин тиоцианат. Непосредственно перед работой в готовый лизирующий буфер добавляли коктейль ингибиторов бактериальных протеаз (Sigma) до конечной концентрации 1 мкг/мл. Все работы проводили в соответствии с требованиями СП 1.3.3118-13. Пробоподготовку проводили следующим образом: суточную культуру микроорганизма стерильной пластиковой петлей суспендировали в лизирующем буфере под оптический стандарт мутности 1О ОЕ и инкубировали при температуре 37^0С в течение часа (для штаммов *Y.pestis* и *F.tularensis*) или двух часов (штаммы *B.anthracis*). Далее образцы переносили в микроцентрифужные пробирки с PVDF фильтром с диаметром пор 0,22 мкм и центрифугировали в центрифуге с аэрозольным фильтром в течение 20 мин. при 12 000 об/мин. и температуре ($+4^0$С). Фильтрат высевали в объеме 0,1 мл на соответствующую данному виду питательную среду и инкубировали при 37^0 С с ежедневным просмотром посевов в течение 5 суток для *Y.pestis* и *B.anthracis* и 10 суток для *F.tularensis*. Стерильные экстракты делили на аликвоты и хранили при -80^0 С. Двумерный электрофорез проводили с использованием комплекта оборудования для протеомных исследований производства фирмы «Bio-Rad» и специализированного программного обеспечения «Quantity One 1-D analysis software» и « PDQuest 2-D analysis software». Концентрацию образцов перед проведением 1-го направления (ИЭФ) измеряли на флуориметре Qubit и параллельно методом Бредфорда. Изоэлектрофокусировку проводили с использованием стрипов

ReadyStrip IPG strips pH 3-10, 7 см, загружая образцы из расчета 10-15 мкг белка на 120 мкл регидратационного буфера. Уравновешивание стрипов проводили в тяжелом буфере с 6М мочевиной в два этапа: с 2% DDT и 2,5 % йодацетамидом по 15 мин. Второе направление проводили в камере Mini Protean с охлаждением 10 С в 12% ПААГ в течение ~1 час 30 мин. Готовые гели окрашивали серебром или кумасси G250. Для идентификации специфических белков использовали тандемный времяпролетный масс-спектрометр UltraflexTreme «Bruker Daltonics», обработку и анализ данных проводили с использованием программы «Bio Tools». Идентификацию белков проводили с использованием интерактивного ПО Mascote.

Результаты. На первом этапе работы был проведен подбор оптимальных параметров экстракции тотального протеома микроорганизмов I-II групп патогенности, которые позволят экстрагировать максимальное количество клеточных белков исследуемых возбудителей и будут соответствовать требованиям СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».

При анализе гелей белковых экстрактов образцов штаммов *Y.pestis* и *F.tularensis* на геле визуализировалось около 100 (± 10) белковых пятен разной интенсивности, большинство из которых приходились на диапазон значений pH 5-8. Для образцов сибиреязвенного микроба наблюдалось максимальное количество визуально видимых белковых пятен, которые располагались преимущественно в диапазоне значений pH 6,5-8,0. Трудность экстракции тотального протеома *B. anthracis,* по всей видимости, обусловлена особенностями строения клеточной стенки данного возбудителя, которая, по сообщениям многих исследователей, слабо поддается воздействию физических и химических методов экстракции. Еще одной причиной низкой эффективности экстракции белков сибиреязвенного микроба может быть наличие в исследуемых образцах, несмотря на короткие сроки выращивания (не более 24 ч.), спор данного микроорганизма. Для проверки этой гипотезы были сделаны мазки из суточной культуры и окрашены по Ребигеру. В мазках выявлено значительное количество (до 40%) клеток со спорами, что, на наш взгляд, является одной из причин низкой эффективности экстракции тотального протеома *B. anthracis.*

Идентификацию белков проводили методом трипсинолиза отдельных белковых фрагментов, вырезанных из геля, с последующей экстракцией продуктов протеолиза 0,1% ТФУ. Для картирования идентифицированных фрагментов на геле использовали систему пространственного депонирования белковых фракций EXQuest spot cutter. Масс-спектры получали в режиме положительных ионов, вторичные ионы – в режиме Lift для индивидуального анализа структуры каждого пептида на основе их аминокислотных последовательностей. Далее с помощью программного обеспечения Biotools и сервера Mascot проводили депонирование полученных данных на сервер и их сравнение с референсными последовательностями баз данных Swissprot и NCBI.

Таким образом, нами разработаны и апробированы на практике методы экстракции тотального протеома неспорообразующих возбудителей ООИ – чумы и туляремии, сочетающие эффективную белковую экстракцию и соблюдение требований СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)». Для возбудителя сибирской язвы в дальнейшем будут опробованы методики, сочетающие физические и химические методы дезинтеграции.

Кроме того, нами был идентифицирован ряд структурных и видоспецифических для каждого возбудителя белков, установлена их пространственная локализация (относительно координат pH/MV). Получение протеомных карт позволит в дальнейшем идентифицировать редкие белки и посттрансляционные модификации, влияющие на проявление патогенных и иммуногенных свойств разных штаммов.

МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ (ПЦР-ДИАГНОСТИКА) ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ ТУЛЯРЕМИИ НА ТЕРРИТОРИИ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Романова Л.В., Пичурина Н.Л., Савченко А.П., Бородина Т.Н., Водопьянов С.О., Москвитина Э.А.

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия

Введение. Туляремия – зоонозная природно-очаговая инфекция, которая остается актуальной проблемой в инфекционной патологии человека. Это обусловлено широким распространением на территории страны очагов, которые вследствие высокой экологической пластичности возбудителя представляют собой устойчивые паразитарные системы. Около 80% территории юга России занимают активные природные очаги туляремии. Циркулируя в природных очагах, туляремийный микроб может вызывать значительные вспышки заболевания среди широкого круга хозяев, включая человека, что представляет серьезную проблему для практического здравоохранения. В последние годы при эпизоотологическом обследовании природных очагов туляремии отмечается снижение количества выделения культур возбудителя, изолированных от млекопитающих, членистоногих и из различных объектов окружающей среды. Однако следует отметить, что относительно благополучная эпизоотологическая обстановка не дает представления об истинной ситуации в паразитарной системе. Проводимые при этом исследования не всегда учитывают в полном объеме условия циркуляции микроба и сохранения его во внешней среде. Кроме того, возбудитель туляремии входит в перечень патогенных биологических агентов, которые могут быть использованы в качестве биологического оружия. Такого рода агенты должны отвечать комплексу критериев, учитывающих их биологические параметры в сочетании с взаимоотношением с организмом человека, средой обитания, а

также технологическими, техническими и экономическими показателями. Существование в естественных биоценозах стойких природных очагов туляремии и заметная тенденция к появлению новых, объясняет необходимость проведения постоянного мониторинга за состоянием этих эндемичных очагов с использованием комплекса бактериологических, серологических и молекулярно-генетических методов исследования.

Цель работы. Изучение эпизоотических и эпидемических проявлений туляремийного микроба с помощью ПЦР-диагностики в природных очагах туляремии на территории Ростовской области.

Материалы и методы. При исследовании использовали наборы для выделения ДНК (пробоподготовка универсальная – фирмы Isogen Lab.ltd., Москва) и наборы реагентов для обнаружения ДНК возбудителей инфекционных заболеваний методом полимеразной цепной реакции (*Francisella tularensis holarctica*. GenPak DNA PCR test и *Francisella (tularensis+holarctica)* GenPak DNA PCR test) этой же фирмы. Амплификацию проводили согласно рекомендациям фирмы-производителя. Качество нативной ДНК и результаты ПЦР контролировали электрофорезом в 5 %-ном полиакриламидном геле в аппарате для электрофореза типа «Midget» (Hoefer Scientific Instrument, США) в присутствии маркеров, представлявших собой смесь MspI-гидролизата плазмидной ДНК pUC19 и BglI- гидролизата ДНК фага l. Результат считали положительным при наличии в геле полосы размером 362 п.н. в случае *Francisella tularensis holarctica* и 333 п.н. для *Francisella (tularensis+holarctica)*. Кроме того, в качестве альтернативы нами были использованы экспериментальные праймеры, опубликованные в разное время авторами и представляющие собой FT 393/642 - atg gcg agt gat act gct tg ; gga tca tca gag cca cct aa (Long G.W. et al,1993); F1+2 -aca tac aag cct ttt aac tat c; ttg atc ata ata gtt ctg acc (Романова Л.В.и др.,1995); TUL4 - gct gta tca tca ttt aat aaa ctg ctg; ttg gga agc ttg tat cat ggc act (Sjostedt A. et al, 1997); C1+4 - tcc ggt tgg ata ggt gtt gga tt ; Gcg cgg ata att taa att tct cat a (Eliasson H. et al., 2005). Амплификацию проводили согласно рекомендациям авторов. Пробу учитывали при получении положительного сигнала минимум с 4 из 6 использованных праймеров. Исследуемый материал был представлен пробами из окружающей среды: вода, клещи, кровососущие насекомые, мелкие млекопитающие (в том числе летучие мыши) и птицы. Сбор клещей осуществляли с апреля по сентябрь по общепринятой методике в открытых стациях.

Результаты. Нашим институтом проводится ежегодный мониторинг проб полевого материала из природных очагов туляремии с расширением списка видового разнообразия как переносчиков (клещи, комары, мухи-кровососки, слепни), так и прокормителей (мелкие млекопитающие и птицы). За последние три года (2014-2016гг.) частота обнаружения ДНК возбудителя туляремии составила в среднем 7%. В 2014 году исследовано 80 проб, положительными из них оказались 7 (8,8 %): мышь домовая - 3, мышь лесная – 2, *Dermacentor marginatus* – 1, *Aedes exerucian* - 1). В 2015 году исследовано проб 47, положительных из них оказалось - 4 (8,5 %): мышь лесная – 2, *D.marginatus* – 2. В 2016 году всего исследовано проб 491, 29 (6,0 %) из них оказалось положительными (*D.marginatus* – 16, *D. reticulatus* - 4, мышь домовая – 4, мышь лесная – 2, полевка обыкновенная – 1, чайка озерная – 1, рыжая вечерница – 1). Как показали результаты, положительный сигнал в ПЦР-анализе давали только пробы ДНК, выделенные из проб клещей и мелких млекопитающих. При заражении положительными пробами белых мышей падежа животных не наблюдали и культуру туляремийного микроба выделить не удалось. Тем не менее, удалось провести VNTR-анализ из пробы ДНК, дающей положительный ответ в ПЦР со всеми шестью парами использованных специфических праймеров. Результаты VNTR-анализа показали, что VNTR профиль ДНК выделенной пробы несколько отличался от ДНК культур туляремийного микроба, выделенных ранее на территории природных очагов в Ростовской области.

Заключение. Проведение молекулярно-эпидемиологического мониторинга чрезвычайно важно для объективной оценки состояния природных очагов туляремии на территории Ростовской области и прогнозирования эпидемиологической обстановки в данном регионе, что позволит определить объем профилактических мероприятий, необходимых для предотвращения возникновения эпизоотических и эпидемических осложнений.

МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ РЕКИ АНГАРА В ЧЕРТЕ ГОРОДА ИРКУТСКА, АССОЦИИРОВАННЫХ С *Vibrio cholerae*

Пономарева А.С.[1], Гладких А.С.[1], Миронова Л.В.[1], Феранчук С.И.[1], Белькова Н.Л.[2], Балахонов С.В.[1]

[1]ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Иркутск, Россия

[2] ФГБУН «Лимнологический институт» Сибирского отделения РАН, Иркутск, Россия

К настоящему времени все возрастающую актуальность приобретают исследования, направленные на комплексное изучение микробных сообществ в различных водных экосистемах. При этом в эпидемиологическом и экологическом аспектах одной из важных задач является определение и подробное описание сообществ, в которых происходит сохранение и поддержание в культивируемом состоянии холерного вибриона.

Ангара – крупная водная артерия, единственная река, вытекающая из озера Байкал, основной водный

объект, на котором располагается г. Иркутск, источник водопользования и рекреации. Мониторинг вибриофлоры и основных санитарно-микробиологических показателей поверхностных водоемов на территории Иркутской области проводится ежегодно в июле и августе. За последние шесть лет из поверхностных водоемов г. Иркутска выделено 258 штаммов холерного вибриона не О1/О139 серогрупп и 17 штаммов *V. cholerae* El Tor O1 серогруппы. Вместе с тем микробное сообщество р. Ангара в местах обнаружения холерного вибриона не изучено.

Цель работы - метагеномный анализ и оценка динамики микробного сообщества р. Ангара в точке ежегодного выделения штаммов *V. cholerae*.

Материалы и методы. Отбор проб воды в р. Ангара осуществляли с поверхности в стерильные бутыли объемом 1 литр весной (март) и летом (июль, август) 2015 года. Материал концентрировали с помощью перистальтического и вакуумного насосов на стерильные поликарбонатные фильтры: кассеты и круглые мембраны с диаметром пор 0,22 мкм. Префильтрацию проводили через нитроцеллюлозные и поликарбонатные фильтры с диаметром пор 1,2 и 5 мкм соответственно. Выделение суммарной ДНК с фильтров осуществляли коммерческими наборами «АмплиПрайм РИБО-преп» и «АмплиПрайм ДНК-сорб-В». Проводили амплификацию V4-V6 вариабельных участков 16S rRNA бактерий и архей с консервативными праймерами. Библиотеки ампликонов готовили в соответствии с протоколом компании Roche. Метагеномное секвенирование ампликонов произведено на пиросеквенаторе Roche GS Junior. Первичный процессинг данных проводили с помощью программы mothur v.1.39. Аннотацию полученных чтений осуществляли путем выравнивания на референсную базу последовательностей 16S rRNA Silva. Кластеризацию в OTU (оперативные таксономические единицы) и оценку видового разнообразия проводили на уровне сходства 97 %. Также был произведен расчет коэффициентов видового богатства и разнообразия.

Результаты. Шишиловская протока – хорошо прогреваемый участок р. Ангара, одно из мест рекреации и рыбной ловли жителей г. Иркутска. За период с 2011 по 2016 гг. из проб воды и ила выделено 56 штаммов *V. cholerae* non O1/O139 и один штамм *V. cholerae* El Tor O1 (2011 г.), что предполагает наличие экологических условий в данной точке, способствующих существованию, циркуляции и выживанию микроорганизма в водоеме. В 2015 г. *V. cholerae* non O1/O139 в указанной стационарной точке выделялись с 15 июля и до окончания мониторинга (31 августа), в весенней пробе вибрионов не обнаружено.

Метагеномный анализ показал, что в составе микробного сообщества в весенний период (март) до 77 % сообщества составляют Proteobacteria, на долю же других филумов приходится не более 4%, в летний период структура сообщества меняется, доминируют бактерии филумов Proteobacteria, Verrucomicrobia, Actinobacteria, Bacteroidetes – типичные представители пресноводных экосистем. Этот факт говорит о том, что весной есть ограничения на развитие бактерий и преобладает монодоминантная группа, а летом эти ограничения снимаются и представленность других таксонов увеличивается. В данном случае лимитирующим фактором для развития микроорганизмов, в первую очередь, может быть температура. Всего в составе сообществ в весенний и летний периоды выявлено 29 бактериальных филумов. В весенней пробе по сравнению с летней определены такие филумы, как Parcubacteria, Microgenomates, SM2F11, Dependentiae, Chlamydiae. Еще одним отличием весеннего периода является детекция Архей филума Crenarchaeota, в то время как в летние месяцы детектировали другой филум – Euryarchaeota. Несмотря на имеющиеся различия в составе микробных сообществ, при сравнении весеннего и летнего периодов выявлено 22 общих OTU, 16 из которых идентифицированы в составе филума Proteobacteria.

Класс Gammaproteobacteria, в состав которого входят представители рода *Vibrio*, преимущественно составлял 14-19% от всех Proteobacteria, только 10 и 17 августа 2015 г. доля данного класса в составе филума уменьшалась до 4% и 7% соответственно. Последовательности *V.cholerae* среди чтений не обнаружены, что может быть в первую очередь связано с низкой численностью этих клеток в составе пробы. Кроме того, это может быть связано с методологическими особенностями ПЦР: влиянием эффекта супрессии амплификации отдельных видов при наличии большого количества ДНК других таксонов и специфичностью отжига праймеров на широкий спектр бактериальных видов.

Оценку видового богатства проводили путем расчета коэффициентов ACE, Chao и разнообразия (индекс Шеннона). Максимальное количество OTU (316) наблюдалось в середине августа, при этом расчетное значение OTU (коэффициент Chao) составляло 686. В марте при количестве выявленных OTU 167 коэффициент Chao составил 223, при этом уровень разнообразия по коэффициенту Шеннона был приблизительно одинаков во все сезоны (3,4-4,4).

При проведении кластерного анализа на основании идентифицированных OTU микробные сообщества, развивающиеся в летние месяцы формировали единый кластер, в то время как сообщество, развивающееся в весенний период, формировало отдельную дистанцированную ветвь.

Заключение. Впервые с помощью метагеномного анализа ампликонов 16S rRNA получены данные о составе микробных сообществ, развивающихся в месте обнаружения холерного вибриона в р. Ангара, получено представление о составе и соотношении доминирующих бактериальных филумов, а также сезонном изменении состава. Для понимания биотических факторов, влияющих на развитие холерного вибриона и индикаторных показателей его наличия в водоеме необходимы дальнейшие исследования микробных сообществ как в сезонной динамике, так и в пространственном аспекте.

РАЗРАБОТКА МУЛЬТИЛОКУСНОЙ ПЦР С УЧЕТОМ РЕЗУЛЬТАТОВ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ШТАММОВ ТУЛЯРЕМИЙНОГО МИКРОБА

Сеничкина А.М., Осина Н.А.

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия

Во многих странах мира эпидемиологическая ситуация по туляремии остается достаточно напряженной, поскольку ежегодно регистрируются случаи заболевания людей данной инфекцией [Petersen *et al.,* 2008; Kaysser *et al.,* 2008; Fujita *et al.,* 2008; Турцева с соавт., 2009; Мещерякова, 2012; Кормилицына с соавт., 2015].

В соответствии с современной классификацией вид *F. tularensis* включает четыре подвида: *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*, *novicida.* Штаммы возбудителя туляремии голарктического подвида представлены тремя биоварами: эритромицинчувствительный (Ery^S), эритромицинустойчивый (Ery^R) и японский (*japonica*). За последние несколько лет накоплены данные об особенностях генома *F. tularensis* подвида *tularensis* на основании которых среди них выделено две генетические субпопуляции AI и AII. Подвиды, биовары и субпопуляции туляремийного микроба различаются по вирулентности для человека и животных, биохимическим свойствам и циркулируют на различных территориях. Поэтому на этапе идентификации штаммов туляремийного микроба важное значение имеет их внутривидовая дифференциация.

Определение подвидов *F. tularensis* в соответствии с действующими нормативно-методическими документами включает изучение способности штаммов ферментировать углеводы, глицерин, фосфатазу, образовывать цитруллинуреидазу, пенициллиназу; их вирулентность для животных, а также обнаружении генетических маркеров, специфичных для разных таксономических групп возбудителя туляремии (*RD1*, *FTM19*, *pdpD* и др.). Среди молекулярно-генетических подходов по внутривидовой дифференциации возбудителя туляремии широкое применение получила ПЦР с электрофоретическим учетом результатов [Versage *et al*., 2003; Tomaso *et al.,* 2006; Zasada *et al.,* 2011, 2013; Woubit *et al.,* 2012; Turingan *et al.,* 2013; Кормилицына с соавт., 2013; Водопьянов с соавт., 2016]. Показана эффективность использования для этих целей RAPD-ПЦР [Романова, 2008; Вахрамеева с соавт., 2011; Мокриевич с соавт., 2013]. Однако предложенные авторами подходы длительны и имеют низкую чувствительность (от 1×10^5 м.к./мл).

Среди перспективных направлений в решении данного вопроса может быть использование ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени. Однако разрешающая способность способов идентификации туляремийного микроба таким методом ограничена одним подвидом или субпопуляцией [Kugeler *et al.,* 2005; Gunnell *et al.,* 2012; Сочивко с соавт., 2015].

Целью нашей работы явилась разработка мультилокусной ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией результатов в режиме реального времени для обнаружения и внутривидовой дифференциации возбудителя туляремии.

В результате проведенного нами анализа *in silico* были выбраны ДНК-мишени, перспективные для определения подвидов туляремийного микроба: ген *FTT 1067c* (гомолог *FTM 0875-0876*), который имеет делецию 19 п.н. у штаммов *F. tularensis tularensis, F. tularensis holarctica* $Ery^{S/R}$, *F. tularensis novicida*; локус *FTT 1670c*, встречающийся только у *F. tularensis tularensis* и *F. tularensis novicida;* участок *FTT 1122*, содержащий делецию размером 273 п.н. у *F. tularensis novicida*; *ISFtu2*-элемент, имеющий различное расположение в геноме *F. tularensis tularensis* и *F. tularensis holarctica.* На основании нуклеотидной последовательности данных участков подобраны специфичные праймеры и зонды формата TaqMan. Для возможности проведения реакции в мультилокусном формате в состав зондов были введены флуоресцентные метки FAM, R6G, ROX и соответствующие им гасители флуоресценции BHQ1 и BHQ2. Показана возможность подготовки двух вариантов комбинаций подобранных праймеров и зондов: 1 – амплификация фрагментов генов *FTT 1122*, *FTT 1670c*, *FTT 1067c*, 2 - *FTT 1122*, *ISFtu2*, *FTT 1067c* (таблица 1). Предложенные варианты ПЦР-смесей позволяют в полной мере провести идентификацию всех подвидов и биовара *japonica* голарктического подвида туляремийного микроба и могут быть использованы каждый самостоятельно, либо оба одновременно, дополняя друг друга, что может способствовать повышению точности молекулярно-генетического анализа штаммов патогена.

Таблица 1. Идентификация возбудителя туляремии с использованием разработанной мультилокусной ПЦР

Наименование РС	Вариант 1			Вариант 2		
Канал детекции флуоресценции	FAM	JOE	ROX	FAM	JOE	ROX
Наименование ДНК-мишени	*FTT 1122*	*FTT 1670c*	*FTT 1067c*	*FTT 1122*	*ISFtu2*	*FTT 1067c*
F. tularensis tularensis	+	+	-	+	-	-
F. tularensis holarctica $Ery^{S/R}$	+	-	-	+	+	-
F. tularensis holarctica japonica	+	-	+	+	+	+
F.tularensis mediasiatica	+	+	+	+	-	+
F. tularensis novicida	-	+	-	-	-	-

Диагностическую ценность разработанных вариантов мультилокусной ПЦР оценивали при исследовании бактериальных суспензий 114 штаммов *F. tularensis* (8 - *tularensis*, 97 - *holarctica Ery$^{S/R}$*, 5 - *holarctica japonica,* 2 - *mediasiatica,* 2 - *novicida*) и 10 гетерологичных микроорганизмов в концентрациях 1×10^4 – 1×10^3 м.к./мл. Показано, что чувствительность реакции вне зависимости от комбинации праймеров и зондов составила 1×10^4 м.к./мл, а специфичность – 100 %. Во всех случаях подвидовая принадлежность штаммов возбудителя туляремии, определенная с помощью предложенной мультилокусной ПЦР, подтверждена рекомендованным ВОЗ методом, направленным на изучение вариабельности RD1 области.

Таким образом, нами разработана мультилокусная ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени для обнаружения и дифференциации всех подвидов возбудителя туляремии, характеризующаяся высокой чувствительностью 1×10^4 м.к./мл и специфичностью – 100 %. Представляется перспективным использование предложенного подхода при молекулярной идентификации туляремийного микроба.

АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЯ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ *YERSINIA PESTIS* ПРИ ПРОВЕДЕНИИ АНИМАЛИЗАЦИИ НА МОРСКИХ СВИНКАХ

Соломенцев В.И., Кисличкина А.А., Кадникова Л.А., Комбарова Т.И., Платонов М.Е., Благодатских С.А., Майская Н.В., Богун А.Г., Анисимов А.П.

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболенск, Россия

Введение. Возбудитель чумы – грамотрицательная бактерия *Yersinia pestis* является одним из наиболее опасных бактериальных патогенов. В составе вида *Yersinia pestis* различают два подвида: основной подвид, ставший причиной трех пандемий чумы, унесших более 200 миллионов человеческих жизней, и неосновной подвид, циркулирующий в популяциях различных видов полевок, вызывающий у людей редкие эндемичные заболевания.

В ходе исследований по поиску факторов избирательной вирулентности штаммов неосновного подвида, для оценки уровня вирулентности был отобран штамм B-6706 неосновного подвида, летальная доза для которого превышала для морских свинок 10^6 КОЕ. После последовательных пассажей на морских свинках было установлено значительное увеличение вирулентности – $ЛД_{50}$ для морских свинок составила 68 КОЕ.

При секвенировании геномов штамма B-6706 до и после анимализации изменений не было. Исходя из этого, мы предположили, что изменение вирулентности не является следствием накопившихся мутаций, а вызвано различным уровнем экспрессии генов, связанных с вирулентностью.

Цель и задачи. Целью настоящего исследования был анализ транскриптомов *Yersinia pestis* штамма B-6706 до и после анимализации на морских свинках для поиска генов с различным уровнем экспрессии.

Материалы и методы. В работе использовался штамм *Yersinia pestis* неосновного подвида B-6706 из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ Оболенск» до и после анимализации. Для выделения тотальной РНК был использован набор PureLink® RNA Mini Kit. Полученная РНК в соответствии с рекомендациями производителя была очищена от остатков ДНК и рибосомальной РНК. Подготовка библиотек для секвенирования осуществлялась с использованием набора ScriptSeq™ v2 RNA-Seq Library Preparation Kit, в соответствии с рекомендациями производителя. Анализ транскриптомов осуществлялся на платформе Illumina MiSeq с использованием набора MiSeq Reagent Kit v3 в соответствии с рекомендациями производителя.

Анализ транскриптомов штамма B-6706 до и после анимализации осуществлялся в приложении SeqMan NGen программы Lasergene Genomics Suite. Для определения уровня транскрипции генов использовалась последовательность штамма *Yersinia pestis* B-6706 (LIYO00000000). Уровни транскрипционной активности генов были сопоставлены с помощью приложения ArrayStar программы Lasergene Genomics Suite.

Основные результаты. Анализ профилей экспрессии генов до и после анимализации с помощью приложения ArrayStar выявил 973 гена с 2-кратным, 219 генов с 4-кратным и 68 генов с 8-кратным и более изменением уровня экспрессии. Далее вручную были исключены гены, у которых минимальное количество картированных ридов было 3 или менее. Полученные данные представлены в таблице.

Таблица 1. Гены с наиболее выраженным уровнем изменения экспрессии (в 8 и более раз) (данные получены в Lasergene Genomics Suite)

Ген	До пассажей (кол-во ридов)	После пассажей (кол-во ридов)	Изменение активности, раз	Продукт (данные NCBI)
RN23_01060	5	38	7,60	membrane protein
RN23_03320	39	4	0,10	reductase
RN23_05780	45	609	13,53	tRNA-Arg

Ген	До пассажей (кол-во ридов)	После пассажей (кол-во ридов)	Изменение активности, раз	Продукт (данные NCBI)
RN23_05785	10	383	38,30	tRNA-Arg
RN23_06250	21	186	8,86	hypothetical protein
RN23_06585	204	16	0,08	ABC transporter ATP-binding protein
RN23_07020	238	15	0,06	gluconate permease
RN23_08235	40	4	0,10	hypothetical protein
RN23_08440	2280	151	0,07	asparagine synthetase AsnA
RN23_15630	5	37	7,40	phage protein
RN23_16050	30	510	17,00	hypothetical protein
RN23_19410	106953	4128	0,04	peptidase
RN23_21255	1496	12400	8,29	hypothetical protein
RN23_21580	11	142	12,91	tRNA-Glu

Заключение. В ходе проведенной работы был проведен анализ транскриптомов *Yersinia pestis* штамма В-6706 до и после пассажей на лабораторных животных. Были отобраны 14 генов с изменением уровня экспрессии более чем в 8 раз.

Помимо генов, кодирующих известные продукты, обнаружено 4 гена, кодирующих гипотетические белки с невыясненными функциями. Уровень экспрессии этих генов после анимализации превосходит исходный в 8-15 раз.

Работа выполнена в рамках проекта РНФ № 14-15-00599 от 26.06.2014 г. «Поиск факторов избирательной вирулентности полевочьих штаммов Yersinia pestis» от 21.07.2014 г.

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ДИАГНОСТИКИ БРУЦЕЛЛЕЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Торопчин М.И.[1], Саяпина Л.В.[2], Малахаева А.Н.[3], Никитюк Н.Ф.[2], Поступайло В.Б.[2]

[1]ГБОУ ВО «Первый Московский государственный университет имени И.М. Сеченова», Москва, Россия
[2]ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия
[3]ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб», Роспотребнадзора, Москва, Россия

В целях обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения своевременной и качественной диагностике бруцеллеза отводится особая роль. Используемые в лабораторной диагностике бруцеллеза бактериологический и комплекс серологических методов имеют определенные недостатки, связанные с длительностью исследования или невысокой чувствительностью [1]. В этой связи разработка и совершенствование методов специфической индикации возбудителя бруцеллеза имеет большое значение для проведения своевременных противоэпидемических и терапевтических мероприятий.

Одним из перспективных методов выявления бруцелл и лабораторного подтверждения диагноза является полимеразная цепная реакция (ПЦР). С помощью ПЦР в короткие сроки определяют наличие специфической последовательности ДНК бруцелл в биологическом материале и объектах окружающей среды [2].

В настоящее время для лабораторной диагностики бруцеллеза успешно используются зарегистрированные тест-система для выявления ДНК *Brucella ssp.* методом ПЦР «Ген-Бру» (РосНИПЧИ «Микроб»), основанная на амплификации фрагмента гена, кодирующего белок внешней мембраны бруцелл *bcsp 31*, с учетом результатов методом электрофореза в агарозном геле; и набор реагентов для выявления ДНК бактерий *Brucella ssp.* в биологическом материале методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Brucella spp.*-FL» («ЦНИИ эпидемиологии», РосНИПЧИ «Микроб»), в основе которых лежит амплификация фрагмента wbo A гена бруцелл с учетом результатов по накоплению специфической флуоресценции в режиме «реального времени» и по «конечной точке» [3].

Медицинские приемочные испытания наборов реагентов «АмплиСенс® *Brucella spp.*-FL» (вариант - FRT способ детекции в режиме «реального времени» и вариант - FEP – по «конечной точке») проводили в соответствии с разработанной программой медицинских испытаний на базах ГИСК им. Л.А. Тарасевича и РосНИПЧИ «Микроб». При определении диагностической ценности набора реагентов «АмплиСенс® *Brucella spp.*-FL» материалом для исследования служили чистые культуры бруцелл (*B. abortus, B.melitensis*, *B. suis*, *B.canis*, *B.neotomae*, *B. ovis, B. rangiferi*)

в концентрациях 1x10^2 м.к./мл, 1x10^3 м.к./мл и 1x10^4 м.к./мл, гетерологичные штаммы (*Y. pestis, Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* и *F. tularensis*) в концентрации 1x10^7 м.к./мл, а также биологический материал от людей и животных, искусственно инфицированный *B. abortus, B. melitensis*, *B. suis* в концентрациях 1x10^3 и 1x10^4 м.к./мл; *Y. pseudotuberculosis* - в концентрации 1x10^7 м.к./мл. Препаратом сравнения служила тест-система «Ген-Бру».

Проведенные исследования показали, что набор реагентов «АмплиСенс® *Brucella spp.*-FL» обладает высокой диагностической ценностью. В ходе проведенных испытаний с помощью набора реагентов с детекцией результатов в режиме «реального времени» (вариант FRT) чистые культуры *Brucella spp.* выявлены в концентрациях 1·10^2 м.к./мл – 53,8 %, 1·10^3 м.к./мл – 96,2 %, 1·10^4 м.к./мл – 100 % случаев. Использование набора реагентов с детекцией результатов по «конечной точке» (вариант FEP) позволило выявить *Brucella spp.* в концентрации 1·10^2 м.к./мл – 61,5 %, в концентрации 1·10^3 м.к./мл – 96,2 %, в концентрации 1·10^4 м.к./мл – 100 %.

С помощью тест-системы (Ген-Бру) количество проб, содержащих *Brucella spp.* в чистых культурах, к числу исследованных штаммов в концентрации 1·10^2 м.к./мл составило 31 %, в концентрации 1·10^3 м.к./мл – 85 % и в концентрации 1·10^4 м.к./мл –100 %.

В биологическом материале, содержащем B. *melitensis, B. abortus* и *B. suis* в концентрации 1·10^3 м.к./мл. с помощью наборов реагентов «АмплиСенс® *Brucella spp.*-FL» вариантов FRT и FEP выявлено 96,5 и 97,4 % проб соответственно, с помощью тест-системы (Ген-Бру) – 93,5 %. По показателям специфичности и воспроизводимости (100 %) оба препарата оказались равноценными.

Для повышения надежности метода ПЦР в набор реагентов «АмплиСенс® *Brucella spp.*-FL» введен внутренний контрольный образец, амплификация которого проводится одновременно с исследуемыми пробами. Использование флуоресцентной детекции результатов амплификации в наборе реагентов «АмплиСенс® *Brucella spp.*-FL» решило одну из ключевых проблем внедрения ПЦР в лабораторную практику – проблему контаминации, в связи с тем, что регистрация результатов (изменение флуоресценции) проводится в закрытой пробирке.

Применение системы детекции результатов ПЦР в режиме «реального времени», наряду с ответом на вопрос о наличии или отсутствии в исследуемом образце ДНК бруцелл, позволяет оценить ее количество, что в ряде случаев дает возможность определить объем проведения противоэпидемических мероприятий. Кроме того, отсутствие постамплификационных этапов детекции значительно сокращает время проведения анализа и получения результатов.

В последнее время в рамках совершенствования молекулярно-генетического метода диагностики бруцеллеза разработаны наборы реагентов «Ген Brucella – идентификация РГФ» (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб») и «ОМ-Скрин Бруцеллез-РВ» (ЗАО «Синтол»), позволяющие одновременно с выявлением ДНК бруцелл определять их видовую принадлежность с учетом результатов в режиме «реального времени» [4].

Таким образом, использование в лабораторной практике перспективных наборов реагентов методом ПЦР с детекцией результатов в режиме «реального времени» позволяет не только упростить процедуру проведения анализа, но и в максимально короткие сроки обнаружить возбудителя бруцеллеза в низкой концентрации и своевременно провести противоэпидемические и лечебные мероприятия.

Список литературы

1. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: Практическое руководство / Под ред. академика РАМН Г.Г. Онищенко, академика РАМН В.В. Кутырева. Изд. 2-е, переработанное и дополненное. М.: ЗАО «Шико», 2013. 555 с.

2. Абдрашитова А.С., Саяпина Л.В., Малахаева А.Н., Осина Н.А. Оценка диагностической эффективности наборов реагентов для выявления ДНК возбудителей сибирской язвы, бруцеллеза и холеры методом ПЦР с учетом результатов в режиме «реального времени» // Здоровье населения и среды обитания. Вып. 1 (238). 2013. С. 32 - 34.

3. Методические указания по порядку организации и проведения лабораторной диагностики бруцеллеза для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней: МУ 4.2.3010–12. Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2013. 67 с.

4. Применение полимеразой цепной реакции для видовой идентификации возбудителя бруцеллеза в пробах биологического материала / Касьян Ж.А., Осина Н.А., Шарова И.Н. и др. // Материалы VII Ежегодной Всероссийского Конгресса по инфекционным заболеваниям с международным участием. – М., 2015. – С. 151-152.

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ ГЕНОМА И ПРОИСХОЖДЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ НЕТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ *Vibrio cholerae* БИОВАРА ЭЛЬ ТОР *ctxA-tcpA+* МЕТОДОМ SNP-ТИПИРОВАНИЯ И ОЦЕНКА ИХ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ С ПОМОЩЬЮ СКОНСТРУИРОВАННОЙ ПЦР-ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Агафонова Е.Ю., Краснов Я.М., Щелканова Е.Ю., Смирнова Н.И.

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Россия

Vibrio cholerae биовара Эль Тор является возбудителем холеры, седьмая пандемия которой продолжается уже более 50 лет. Ключевыми факторами вирулентности возбудителя холеры являются холерный токсин (CT), кодируемый генами *ctxAB,* которые входят в состав профага CTXφ, и токсин-корегулируемые пили (TCP), синтез которых обусловлен кластером генов *tcpA-F*, локализованном на острове патогенности VPI-1. В связи с этим считают, что токсигенные штаммы, содержащие в своем геноме гены *ctxAB* и *tcpA*, являются эпидемически опасными. В геноме

таких штаммов присутствуют также острова пандемичности VSP-I и VSP-II, необходимые для адаптации возбудителя к различным стрессам. Кроме того из водной среды, а также от человека нередко выделяются нетоксигенные штаммы, среди которых особого внимания заслуживают изоляты, имеющие гены, кодирующие TCP. До недавнего времени все штаммы с генотипом *ctxA⁻tcpA⁺* относили к потенциально эпидемически опасным на основании того, что из таких штаммов могут возникнуть эпидемически опасные клоны за счет приобретения ими CTXφ в результате фаговой конверсии, поскольку пили TCP служат рецепторами для этого профага. Вместе с тем вопрос о происхождении штаммов *ctxA⁻tcpA⁺* и сохранении ими характерных других генов патогенности и пандемичности остается до сих пор открытым, хотя эти сведения имеют принципиальное значение для оценки их эпидемиологической значимости.

Цель работы – изучение филогенетических связей нетоксигенных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор *ctxA⁻tcpA⁺* с разным набором генов патогенности и пандемичности с токсигенными на основе SNP-анализа и оценка их эпидемиологической значимости с помощью сконструированной мультилокусной ПЦР-тест-системы.

Материалы и методы. В работе использовали токсигенные и нетоксигенные штаммы *V. cholerae* биовара Эль Тор. Штаммы культивировали на агаре LB. ДНК выделяли коммерческим набором ChargeSwich gDNA Mini Bacteria Kit согласно инструкции производителя. ПЦР проводили на программируемом амплификаторе «Mastercycler Gradient» (Eppendorf, Германия). Детекцию продуктов амплификации проводили методом горизонтального электрофореза в 1,5% агарозном геле. Визуализацию полученных результатов осуществляли с помощью гель-документирующей системы VersaDoc и пакета программ Quantity One v. 4.6.9. Олигонуклеотидные праймеры синтезированы в НПО «Синтол», Москва. Полногеномное секвенирование и SNP-типирование проводили по общепринятым методикам.

Основные результаты. На первом этапе работы для выяснения присутствия в геноме нетоксигенных штаммов *ctxA⁻tcpA⁺* других генов патогенности и пандемичности, характерных для токсигенных изолятов, была определена нуклеотидная последовательность полных геномов семи природных штаммов *ctxA⁻tcpA⁺*, выделенных в разные годы в различных регионах России, а также двух экспериментально полученных штаммов, утративших профаг CTXφ во время пребывания их в водной среде. Сравнительный анализ генов этих штаммов позволил впервые обнаружить их генетическую неоднородность и отнести их к двум группам. Изоляты первой группы, в которую вошли все природные штаммы *ctxA⁻tcpA⁺*, в отличие от токсигенных штаммов были лишены 4 участков ДНК (двух профагов CTXφ и RS1φ, а также двух островов пандемичности VSP-I и VSP-II) общей протяженностью 54,2 т.п.н. В то же время у второй группы, состоящей из двух экспериментально полученных штаммов *ctxA⁻tcpA⁺*, отсутствовал лишь один или два участка ДНК размером 6,9 т.п.н. (профаг CTXφ), либо 9,6 т.п.н. (профаги CTXφ и RS1φ). Следовательно, эпидемиологическая значимость штаммов из двух сравниваемых групп, генотип которых был обозначен как *ctxA⁻tcpA⁺*VSP⁺ и *ctxA⁻tcpA⁺*VSP⁻ не могла быть одинаковой, как считалось ранее. Потенциальную эпидемическую опасность могут представлять лишь штаммы с генотипом *ctxA⁻tcpA⁺*VSP⁺, поскольку они могут служить естественным резервуаром для формирования из них токсигенной популяции в результате приобретения профага CTXφ путем фаговой конверсии. Напротив, штаммы *ctxA⁻tcpA⁺*VSP⁻ не могут нести потенциальную опасность, поскольку приобретение ими различных участков ДНК большой протяженности для формирования эпидемически опасной популяции – весьма маловероятное событие в природных условиях. Последующее SNP-типирование 9 этих штаммов, а также 26 других изолятов *ctxA⁺tcpA⁺* и *ctxA⁻tcpA⁺*, нуклеотидные последовательности полных геномов которых были взяты из международной базы данных GenBank, показало, что исследуемые штаммы четко разделены на две филогенетические группы. В первую вошли 15 токсигенных изолятов *ctx⁺tcpA⁺*, а также все нетоксигенные (10 изолятов) с генотипом *ctxA⁻tcpA⁺*VSP⁺. Вторая группа сформирована из нетоксигенных штаммов с генотипом *ctxA⁻tcpA⁺*VSP⁻. Значительная удаленность нетоксигенных штаммов этой группы от токсигенных изолятов может свидетельствовать об их независимом происхождении.

Обнаруженная гетерогенность штаммов *ctxA⁻tcpA⁺* по структуре генома и эпидемиологической значимости указала на необходимость создания ПЦР-тест-системы для их дифференциации. В результате нами была сконструирована ПЦР-тест-система с электрофоретическим учетом результатов, которая выявляет не только гены *ctxA* и *tcpA*, но и гены, входящие в состав островов пандемичности VSP-I (*VC0180*) и VSP-II (*VC0514*). ПЦР-анализ 28 природных штаммов, изолированных на территории России, Украины и Туркмении (1965-2013 гг.), показал отсутствие у них не только гена *ctxA*, но и генов в составе островов пандемичности. Это означает, что указанные штаммы не имеют потенциальной эпидемической опасности. В тоже время результат проверки 8 экспериментально полученных штаммов *ctxA⁻tcpA⁺*, производных токсигенных штаммов, свидетельствует о сохранении в их геноме островов пандемичности и указывает на их потенциальную эпидемическую опасность. Эти данные свидетельствуют о возможности широкого использования созданной ПЦР-тест-системы для дифференциации штаммов *ctxA⁻tcpA⁺* с различной эпидемиологической значимостью.

Таким образом, секвенирование и анализ полных геномов исследуемых штаммов показал, что нетоксигенные изоляты *V. cholerae* биовара Эль Тор с генотипом *ctxA⁻tcpA⁺* представляют собой генетически неоднородную группу с различной эпидемиологической значимостью. Нетоксигенные штаммы с генотипом *ctxA⁻tcpA⁺*VSP⁺ могут представлять потенциальную эпидемическую опасность. Вторая группа нетоксигенных штаммов *ctxA⁻tcpA⁺*VSP⁻ не имеет потенциальной эпидемической опасности вследствие утраты значительных участков геномов, включающего гены CT, а также два острова пандемичности. SNP-типирование нетоксигенных штаммов с разными генотипами подтвердило значительную удаленность штаммов *ctxA⁻tcpA⁺*VSP⁻ от токсигенных и указало на значительное генетическое сходство изолятов *ctxA⁻tcpA⁺*VSP⁺

с токсигенными. ПЦР-анализ различных групп изученных штаммов показал на возможность дифференциации нетоксигенных штаммов *ctxA⁻tcpA⁺* с различной эпидемиологической значимостью этим методом.

ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНОМА ВИРУСА ЗАИР В ПЕРИОД ЭПИДЕМИИ, ВЫЗВАННОЙ ЛИХОРАДКОЙ ЭБОЛА В ЗАПАДНОАФРИКАНСКОМ РЕГИОНЕ С 2014 ПО 2015 ГОД

Краснов Я.М.[1], Сафронов В.А.[1], Кутырев В.В.[1], Попова А.Ю.[2,3]

[1]ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Россия
[2,3]Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; Российская медицинская академия последипломного образования, Москва, Россия

Последняя эпидемия лихорадки Эбола в Западной Африке в 2014 – 2015 годах была крупнейшей из всех зафиксированных для данной инфекционной болезни. На 28 февраля 2016 года известно о 28639 случаях болезни, 11316 из них закончились летально. Этиологическим агентом данной эпидемии является вирус вида *Zaire ebolavirus*, попавший из неизвестного природного резервуара в удаленном районе Лесной Гвинеи в человеческую популяцию. Мониторинг эволюции вирусного генома позволяет выявлять происходящие мутации и устанавливать филогенетические связи с изолятами, выделенными ранее. Нами проведен сравнительный анализ 16 геномов *Zaire ebolavirus* **(***ZE*), секвенированных в РосНИПЧИ «Микроб», с вариантами геномов вируса Заир из западноафриканского региона, представленными в базе данных NCBI GenBank. Общий филогенетический анализ показал два направления эволюционного развития генома вируса Заир от одного исходного предка.

Цель и задачи. Провести секвенирование геномов вируса *ZE* из полученных образцов кДНК. Сравнить и проанализировать полученные геномы с геномами *ZE* из международной базы данных NCBI GenBank.

Материалы и методы. Исходный клинический материал для диагностического анализа в виде сыворотки крови от лиц с подозрением на лихорадку Эбола на территории Республики Гвинея направлялся в мобильную лабораторию СПЭБ Роспотребнадзора. Инактивация материала проводилась в соответствии с МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности». Диагностический тест на наличие вирусной РНК *ZE* выполняли с помощью технологии ПЦР-РВ и набора «Амплисенс EBOV Zaire-FL» (ЦНИИ эпидемиологии). Из образцов материала с положительным ответом проводили выделение вирусной РНК с помощью набора «QIAamp Viral RNA Mini Kit» (Qiagen) и последующий синтез кДНК с помощью набора «Реверта-L» (ЦНИИ эпидемиологии). Получение необходимых фрагментов ДНК для секвенирования проводили в два этапа, используя гнездовую ПЦР. С помощью рассчитанных нами двух комплектов перекрывающихся пар праймеров сначала получали более протяженные фрагменты ДНК (900–1200 п.н.), которые в дальнейшем использовали для амплификации более мелких участков ДНК (500–750 п.н.). Все полученные фрагменты генома секвенировали после целевого обогащения исходной кДНК, используя систему высокопроизводительного секвенирования «Ion PGM» (IonTorrent) согласно стандартному протоколу производителя. Дополнительно секвенирование полученных специфичных фрагментов ДНК проводили с использованием генетического анализатора «ABI 3500xl» (LifeTechnologies) согласно стандартному протоколу производителя. Фрагменты генома после секвенирования собирали в единую последовательность с помощью выравнивания на референс-изолят Makona-Kissidougou-C15 (KJ660346, 17.03.2014, Гвинея) с использованием программ SeqMan Pro 11 (DNASTAR Lasergene) и MEGA 6.0. Для проведения сравнительного анализа полученных геномов *ZE* нами использована репрезентативная выборка из международной базы данных NCBI GenBank, содержащая 986 геномов вируса Заир, полученных из клинического материала от больных лихорадкой Эбола, взятого с марта 2014 по июль 2015 года на территории стран Западной Африки (Республика Гвинея, Сьерра-Леоне, Либерия и Мали). Поиск и создание матрицы единичных нуклеотидных полиморфизмов (SNP) для всей группы из 1002 геномов *ZE* проводили с помощью программы Wombac 2.0. Для построения филогенетических дендрограмм и дальнейшего анализа использовали программный пакет BioNumerics 7.6.

Результаты. Секвенированы 16 геномов вируса *ZE*. Проведен сравнительный филогенетический анализ полученных геномов с геномами *ZE* из международной базы данных NCBI GenBank. Полученное филогенетическое дерево делится на 5 основных кластеров. В общей сложности были найдены 7 ключевых SNP, которые ответственны за формирование кластеров № 2-5. В то же время данные 7 SNP отсутствуют во всех геномах *ZE,* составляющих кластер № 1, которые были получены из клинического материала от больных на территории Республики Гвинея. Все геномы, составляющие кластер 2, имеют 2 маркерные SNP – первая мутация в позиции 1849 (синонимичная замена T на C в гене NP), вторая – 6283 (несинонимичная замена C на T, приводящая к замене аминокислоты аланин на валин в позиции 82 от начала кодирующей последовательности в гене GP). Геномы *ZE* из кластера 3 имеют, помимо 2 SNP, описанных выше, еще 3 маркерных SNP: в позиции 800 (несинонимичная замена C на T, приводящая к замене аминокислоты аргинин на цистеин в позиции 111 от начала кодирующей последовательности в гене NP). Следующие две синонимичные замены - в позиции 15963 (G на A в гене L) и в позиции 17142 (T на C в гене L). Геномы *ZE* в кластере 4 имеют, помимо 5 SNP, описанных выше, еще 1 SNP – в позиции 10218 (замена G на A в некодирующей части гена VP24). Геномы, составляющие кластер 5, имеют помимо

6 SNP описанных выше, еще 1 SNP в позиции 14019 (синонимичная замена T на C в гене L). Появление данных 4 вариантов генома *ZE* (геномы, составляющие основу, соответственно, 4 кластеров - № 2-5) совпадает со стремительным обострением эпидемиологической ситуации в Сьерра-Леоне, после чего происходит их распространение на территорию Гвинеи и Либерии. Причина столь интенсивного дальнейшего распространения лихорадки Эбола на основе 4 геновариантов *ZE* заключается в их генетических особенностях и/или в результате сложившейся эпидемической ситуации. В этой связи кластер № 1 представляется как альтернативный вариант эволюции *ZE*. Ни один из входящих в его состав геномов, начиная с середины марта 2014 г. и заканчивая вариантами генома *ZE,* полученными из материала, взятого от пациентов в июне 2015 г., не имеют ни одной из 7 ключевых SNP, которые образуют кластеры 2–5, сформированные первоначально изолятами *ZE* из Сьерра-Леоне.

Заключение. Общий филогенетический анализ показал два направления эволюционного развития генома вируса *ZE* от одного исходного предка в период эпидемии, вызванной лихорадкой Эбола в западноафриканского регионе с 2014 по 2015 год. Первая ветвь эволюции представлена относительно небольшим числом изолятов *ZE*, получивших распространение в Гвинее. Второе, наиболее типичное направление эволюции, вызвано 4 вариантами генома *ZE*, которые первоначально начали выделяться в конце мая – начале июня 2014 года в Сьерра-Леоне. За короткий период времени данные варианты вируса *ZE* охватили территорию Сьерра-Леоне, Гвинеи и Либерии, послужив в абсолютном большинстве случаев причиной заболевания людей лихорадкой Эбола.

ПУТИ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ И ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ШТАММОВ *BACILLUS ANTHRACIS*

Куличенко А.Н., Рязанова А.Г.

ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия

Современная эпизоотолого-эпидемиологическая обстановка по сибирской язве в Российской Федерации остается неустойчивой. Так, в 2016 году на территории Ямало-Ненецкого автономного округа зарегистрирована крупнейшая эпизоотия, в процессе которой заболело 2 650 северных оленей. Контакт с больными и павшими животными привел к заболеванию 36 человек с одним летальным исходом.

В действующих санитарно-эпидемиологических правилах СП 3.1.7.2629-10 «Профилактика сибирской язвы» не определена значимость ПЦР-анализа в качестве лабораторного критерия постановки диагноза «сибирская язва» у людей. Тем не менее, многолетняя практика лабораторной диагностики сибирской язвы свидетельствует о том, что ПЦР-анализ с использованием тест-систем с детекцией результатов в формате «реального времени», особенно проводимый на фоне антибиотикотерапии, является нередко единственным методом индикации и идентификации *Bacillus anthracis* в клиническом материале.

Результаты ПЦР неоднократно были использованы в качестве критерия постановки диагноза «сибирская язва» у людей при наличии соответствующей клинической картины и эпидемиологического анамнеза при ряде вспышек, в том числе при диагностике кожной формы инфекции во время вспышек в Чеченской Республике (2010 г.), Республике Дагестан (2010 г.), Краснодарском крае (2011 г.). Диагностическая ценность метода подтверждена в период вспышки в Ставропольском крае (2013 г.). Положительные результаты ПЦР-исследования клинических образцов служили основанием для назначения неотложной специфической терапии до получения результатов бактериологического и биологического исследований и своевременной организации комплекса противоэпидемических мероприятий.

При вспышке сибирской язвы на Ямале (2016 г.) положительные результаты ПЦР стали основополагающим лабораторным критерием окончательного диагноза у 22 больных с кожной и орофарингеальной формами сибирской язвы. У одного пациента данным методом определена первичная, гастроинтестинальная, форма болезни при обнаружении ДНК *B. anthracis* в рвотных массах.

Молекулярные методы исследования также не раз подтверждали целесообразность своего использования при проведении доказательного эпидемиологического анализа в процессе расшифровки вспышек сибирской язвы. MLVA-генотипирование успешно применялось как при эпидемиологическом расследовании, так и ретроспективном анализе вспышек сибирской язвы в Российской Федерации и на сопредельных территориях. Генетический анализ имел ключевое значение при эпидрасследовании ситуации, сложившейся в 2010 г. в Омской области, когда в результате вынужденного убоя лошадей сибирской язвой заболело 6 человек с одним летальным исходом, а мясо больных животных было использовано для изготовления мясных полуфабрикатов на одном из мясоперерабатывающих предприятий. MLVA-типирование показало единое происхождение штаммов, изолированных из полуфабрикатов, материала от павших лошадей и крови умершего больного.

При исследовании штаммов, выделенных из патологоанатомического материала северных оленей и клинических образцов заболевших людей в 2016 г. в ЯНАО, в рамках эпидемиологического расследования вспышки был использован алгоритм последовательного генетического анализа методами с возрастающей разрешающей способностью: типирование по 13 «каноническим» единичным нуклеотидным полиморфизмам (canSNP-типирование), MLVA31-типирование, полногеномное секвенирование с последующим глубоким изучением структурных и регуляторных генов основных факторов патогенности возбудителя сибирской язвы, кластерным и сравнительным анализом с использованием собственных и доступных международных баз данных. Проведенный анализ

показал идентичность и единое происхождение штаммов вспышки в ЯНАО, их уникальность по результатам сравнительного анализа, а также особенности последовательностей генов, ассоциированных с патогенностью *B. anthracis*.

Таким образом, опыт исследования клинического материала в период вспышек сибирской язвы в последние десятилетия, включая вспышку в ЯНАО в 2016 г., свидетельствует о возможности использования положительного результата ПЦР в качестве критерия для установления окончательного диагноза «сибирская язва» у людей при наличии характерных симптомов одной из форм болезни и соответствующего эпидемиологического анамнеза, а также необходимость внесения этого положения в существующую нормативную документацию.

Генетический анализ штаммов *B. anthracis* имеет целью подтвердить видовую принадлежность, определить потенциальную эпидемическую значимость и оценить внутривидовую вариабельность. Выбранный и примененный в ходе вспышки на Ямале алгоритм и набор методов молекулярного анализа штаммов (canSNP-, MLVA-типирование, полногеномное секвенирование) показал его пригодность для проведения оперативного молекулярно-эпидемиологического расследования вспышек сибирской язвы.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРИКЛАДНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПЦР И VNTR - ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ШТАММОВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ О1 *ctxA⁻tcpA+*

Кругликов В.Д., Левченко Д.А., Водопьянов А.С., Архангельская И.В., Ежова М.И.

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия

Введение

При оценке результатов мониторинга холеры в объектах окружающей среды (ООС), изучая разные популяции нетоксигенных штаммов холерных вибрионов в аспекте их сходства и различия, применяют молекулярно-биологические методы, которые имеют разную дискриминирующую силу [Кульшань Т.А. с соавт., 2015; Смирнова Н.И. с соавт., 2015; Титова С.В. с соавт., 2015, 2016].

На современном этапе в качестве стандартного программного средства используются геоинформационные системы (ГИС), которые наилучшим образом подходят для сбора и обработки территориально-распределительной информации в целях комплексного мониторинга и позволяют «привязать» любое явление к определенной местности [Васильева О.В. с соавт., 2012; Москвитина Э.А. с соавт, 2015 и др.]. Результаты микробиологического мониторинга на территории России (по параметрам фенотипа и токсигенности) представлены в зарегистрированной авторской пополняемой ГИС «Холера 1989-2014» [Зубкова Д.А. с соав., 2014], которая интегрирована в ГЕО-информационный портал ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора - референс-центра по мониторингу холеры на территории Российской Федерации.

Целью работы явилось сравнение прикладного использования ПЦР и VNTR-генотипирования штаммов холерных вибрионов О1 серогруппы с генетической характеристикой *ctxA⁻tcpA⁺*, выделенных на территории России с 2001 по 2016 г. для изучения их сходства и различия.

Материалы и методы

В работе использовали 65 штаммов холерных вибрионов О1, отобранных по введенным заданным параметрам с помощью ГИС «Холера 1989-2014». Изученные штаммы *V. cholerae* О1 были изолированы на территориях: Республики Калмыкия - 39 штаммов, Ростовской области (РО) - 22 штамма, Хабаровского края – 3 штамма, Республики Коми – 1 штамм. Данные ГИС показали, что на территории Российской Федерации в водных ООС в 2001 г. был обнаружен один штамм; в 2002 г. – 4; в 2003 г. – 21; в 2005 г. – 10; в 2007 г. – 4; в 2011 г. – 1; в 2012 г. – 11; в 2013 г. – 4; в 2015 г. – 6; в 2016 г. – 3. За исследуемый период наибольшее количество штаммов с интересующей нас генетической характеристикой было выделено на территории Республики Калмыкия из реки Элистинка - 32 штамма, и из прудов Заячий – 4, Сайгаченок – 3. Что касается Ростовской области, то указанными свойствами обладали штаммы, выделенные в 2001г. – 1; 2002г. – 4; в 2005г. – 10; в 2007г. – 4; в 2015г. – 2; в 2016г. – 1. Так, в Каменском районе РО из сточных вод было изолировано 6 штаммов, из Ветровского карьера – 4 штамма. Из ООС в г. Ростове-на-Дону: река Дон– 6 штаммов; река Темерник – 4 штамма; очистные сооружения КНС №2 – 1 штамм и место у водозабора Таганрогского водоканала также 1 штамм. Культуры с такой же характеристикой были обнаружены на территории Хабаровского края: 2013г. – река Черная (2 штамма) и 2016г. – очистные сооружения КНС №3 (1 штамм). А также в 2016 году был выделен один штамм на территории Республики Коми из реки Вычегда.

Отобранные нетоксигенные штаммы были исследованы с помощью ПЦР с использованием специфических праймеров для детекции 14 генов (*rstA, tcpA, nanH, vce, rtxC, acd-rtxA, acd-vgrG1, pbd-vgrG3, vasK, vcsN2, vspD, mshA, stn/sto*), связанных с патогенностью *V. cholerae* [Монахова Е.В., 2012], а также были изучены с помощью VNTR-анализа по четырем локусам вариабельных тандемных повторов (VcA, VcI, VcD, VcG) по методике, описанной ранее [Водопьянов А.С. с соавт., 2001; Мишанькин Б.Н. с соавт., 2003; Онищенко Г.Г. с соавт., 2007].

Основные результаты

По результатам генетических исследований был проведен кластерный анализ, позволивший объединить 65 штаммов холерных вибрионов О1 серогруппы: по данным ПЦР – анализа в 26 генотипов, составивших 5 кластеров с дискриминирующей силой 0,93, а по данным VNTR–анализа в 19 генотипов, составивших 6 кластеров с дискриминирующей силой 0,83. Дискриминирующую (разделение по признаку) силу определяли по формуле Симпсона [Struelens M.J. *et al*., 1996]:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^{S} nj(nj-1),$$

где D - индекс дискриминирующей силы, N - число штаммов, S - число типов и nj - количество штаммов j типа.

Совпадения по результатам VNTR- и ПЦР-типирования были установлены в 80% случаев: 2001г., 2007г., 2011г., 2012г., 2013г., 2015г., 2016г. Различия полученных данных были выявлены в 20%: в 2003г. и в 2005г. По результатам ПЦР-анализа штаммы *V. cholerae* O1, выделенные в 2003 году, составили 10 генотипов, образовавших 4 кластера (B, D, I, H), а по данным VNTR-типирования изучаемые штаммы вошли в один генотип и образовали один кластер. В 2005 году было установлено распределение культур холерных вибрионов O1 серогруппы по данным VNTR-анализа на 4 генотипа, вошедших в один кластер, а по результатам ПЦР-анализа изучаемые штаммы были сгруппированы в один генотип и составили один кластер.

Заключение

Таким образом, была показана большая разрешающая способность метода ПЦР-генотипирования. Вместе с тем, в связи с имеющими место разночтениями в прикладных аспектах использования методов ПЦР- и VNTR-генотипирования, проведенное исследование свидетельствовало об отсутствии универсального метода, позволяющего судить о близкородственности и происхождении нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы. Дальнейшие исследования по сравнительному изучению нетоксигенных культур имеющимися на сегодняшний день молекулярно-биологическими методами позволят, с нашей точки зрения, упорядочить результативность прикладного использования методов генотипирования указанных штаммов *V. cholerae* O1 для выявления их сходства/различия и возможного происхождения.

ТРАНСАЛЬДОЛАЗА - ОДИН ИЗ НАИБОЛЕЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ КОМПОНЕНТОВ ПРЕПАРАТА «ФРАКЦИЯ V» *Yersinia pestis*

Трухачев А.Л.[1], Копылов П.Х.[2], Арсеньева Т.Е.[1], Лебедева С.А.[1], Анисимов А.П.[2]

[1]ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия
[2]ФБУН «Институт прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Россия

Введение. У возбудителя чумы одним из основных антигенов, имеющих диагностическое значение, является так называемая «фракция I» (FI, F1). Комплекс иммунохимических реакций, используемых при детекции *Yersinia pestis*, экспресс- и ретроспективной диагностике чумы, основан в большинстве случаев на обнаружении в исследуемом материале FI, либо на выявлении антител к FI. Утрата возможности микробной клеткой синтезировать основной компонент FI, белок Caf1, приводит к уклонению *Y. pestis* от детекции в иммунологических тестах [Дроздов И.Г и др. 1993, Friedlander A.M. et al., 1995, Worsham P.L. et al., 1995]. Ранее [Божко Н.В. и др., 1998, 2006] был предложен еще один диагностический иммунный комплекс для выявления штаммов возбудителя чумы – «фракция V» (FV, F5), который в отсутствие FI мог бы быть использован для диагностических целей. Однако компонентный состав FV не был достаточно хорошо изучен. Исследование молекулярных составляющих FV позволило бы выяснить, какие из её компонентов отвечают за специфическую иммунохимическую активность в отношении возбудителя чумы. Полученные данные были бы полезны для совершенствования лабораторной диагностики чумы.

Цель и задачи. Целью настоящего исследования было определение иммунологически активных молекулярных компонентов FV возбудителя чумы.

Материалы и методы. Препарат FV выделяли из штамма *Y. pestis* Otten 106, в котором отсутствовали плазмиды pFra и pCad и, соответственно, был невозможен синтез FI и V-антигенов. Изучение компонентов препарата FV проводили с помощью двумерного электрофореза, в котором использовали изоэлектрическое фокусирование в неравновесном градиенте pH и последующее электрофоретическое разделение белков в геле с линейным градиентом плотности акриламида. Выявление наиболее иммунологически активных составляющих препарата FV вели с помощью иммунной блот-гибридизации при использовании моноклональных антител E6H8, полученных ранее, и имеющих специфическую активность в отношении ранее не идентифицированного компонента препарата FV. На следующем этапе выделяли обнаруженные в иммуноблотте наиболее активные иммунологически компоненты FV и осуществляли масс-спектрометрический анализ выбранных белков с предварительным протеолитическим расщеплением трипсином, при помощи прибора Proteomics Analyzer4700, (Applied Biosystems). Результаты, полученные на масс-спектрометре, анализировали с использованием баз данных NCBInr и программного обеспечения Mascot searching engine v.2.1 (Matrix Science, London, UK).

Основные результаты. В ходе исследований по разделению компонентов фракции FV в 2D электрофорезе и последующем иммуноблоттинге были получены несколько белков, обладающих иммунологической активностью, что выражалось во взаимодействии с моноклональными антителами против FV. Из всех белков наибольший по величине сигнал (окрашивание субстрата, индуцированное пероксидазой) был отмечен у белка, расположенного в геле 2D электрофореза ориентировочно на уровне движения белков 45 кДа и pI 5,3. Обработка результатов показала, что выделенный белок, который имел наибольшую иммунную активность по отношению к моноклональным антителам против FV, по своей аминокислотной последовательности может быть идентифицирован как трансальдолаза из одноименного семейства белков.

При сравнительном анализе генов трансальдолазы у возбудителей чумы и псевдотуберкулеза с помощью программы BLAST установлено, что внутри вида *Y. pestis* гены различных штаммов не отличаются друг от друга, тогда как гены трансальдолаз *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis,* а также различных штаммов возбудителя псевдотуберкулеза отличаются друг от друга на 1 % (6-8 нуклеотидов).

Трансальдолаза – фермент, участвующий в катализе реакций неокислительной стадии пентозофосфатного пути метаболизма углеводов. Молекулярная масса белка 35-36 кДа. Для характеристики выявленного в ходе исследования белка применили программы, позволяющие обнаружить сигнальный пептид (SignalP 4.0); трансмембранные α-спиральные области белков (TMHMM Server v. 2.0), β-спиральные участки (BOMP) и вероятное место клеточной локализации отобранных белков (PSORTb 3.0.2).

Попытка определения сигнального пептида, полноценных трансмембранных α-спиральных и β-спиральных участков полипептида не дала положительного результата. Место вероятной локализации белка было определено как цитоплазма. Казалось бы, это плохо согласуется с тем, что антитела к FV реагировали с целыми нелизированными бактериями, то есть с антигеном, локализованным экстрацеллюлярно. Но трансальдолазам свойственно секретироваться по до сих пор не охарактеризованному пути и закрепляться на поверхности бактерий [González-Rodríguez et al., 2012, He Y. et al., 2015]. Функция фермента в этих случаях не всегда связана с участием в метаболизме углеводов – внеклеточную трансальдолазу рассматривают в качестве фактора патогенности [González-Rodríguez et al., 2012, He Y. et al., 2015]. Иммунная активность трансальдолазы также была описана в литературе [Gupta K. et al. 2011; H. Chou et al., 2014].

Каким же образом близкие по своим характеристикам трансальдолазы возбудителей чумы и псевдотуберкулеза позволяют дифференцировать продуцирующие их бактерии? Ранее различные авторы отмечали, что антитела к FV одинаково хорошо реагировали с Fl^+ и Fl^- культурами исследованных штаммов чумного микроба, выращенных как при 28°С, так и при 37°С, но не взаимодействовали с 28-градусными культурами штаммов возбудителя псевдотуберкулеза «дикого типа». Антитела реагировали лишь с R-мутантами *Y. pseudotuberculosis* и культурами, выращенными при 37°С. Эти результаты хорошо согласуются с особенностями строения (ЛПС) этих видов бактерий [Knirel Y.A., Anisimov A.P., 2013]. У *Y. pestis* ЛПС состоит из липида А и корового олигосахарида; О-полисахарид не синтезируется и не экранирует клеточную поверхность, что необходимо для функционирования активатора плазминогена [Kukkonen M. et al., 2004]. В штаммах псевдотуберкулезного микроба при температурах ниже 37°С образуется полноценный ЛПС с О-боковыми цепями, закрывающими клеточную поверхность бактерии от контакта с антителами, а при 37°С образуется вариант ЛПС всего с одним присоединенным к кору звеном полисахарида [Knirel Y.A., Anisimov A.P., 2013], т.е. трансальдолаза на бактериальной поверхности становится почти такой же доступной для диагностических антител, как и на клетках возбудителя чумы. Это же объяснение подходит и для R-мутантов *Y. pseudotuberculosis*, которые в случае утраты не только О-полисахарида, но и части олигосахарида кора, могут реагировать даже сильнее чумного микроба.

Выводы. Трансальдолаза является одним из наиболее иммунологически активных компонентов FV возбудителя чумы. Обсуждаются вопросы использования этих данных для совершенствования серодиагностики и иммунопрофилактики при чуме и псевдотуберкулезе, а также определения роли трансальдолаз в патогенезе этих инфекций.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ V.CHOLERAE O1/NONO1, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ЛЮДЕЙ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ЭПИДЕМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ

Хайтович А.Б.[1], Петренко Е.В.[2], Алексеенко В.В.[2]

[1]ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернандского», Медицинская Академия им. С.И. Георгиевского, Симферополь, Россия
[2]ГУ «Институт эпидемиологии и инфекционных болезней им. Л.В. Громашевского НАМН Украины», Киев, Украина

Введение. В мире продолжается седьмая пандемия холеры, которая охватила многие страны и континенты. Возбудителем холеры является *V.cholerae O1 biovar eltor*, но с 1992 года в Индийском регионе зарегистрирована новая серогруппа *V.cholerae O139*, которая также вызывает клинические проявления холеры. Стоит отметить, что холерные вибрионы различных серологических групп и с разным патогенным потенциалом могут вызывать у людей не только холеру, но и диареи различной степени тяжести. В Украине периодически регистрируются вспышки холеры и ежегодно острые кишечные инфекции (ОКИ), вызванные холерными вибрионами разных серологических групп. В связи с этим актуальным остается вопрос изучения биологических свойств холерных вибрионов на молекулярно-генетическом уровне.

Цель исследования. Изучение молекулярно-генетической характеристики штаммов *V.cholerae O1/nonO1,* выделенных от людей при различных эпидемических ситуациях и в разные годы.

Материалы и методы. Исследовано: 69 штаммов *V.cholerae O1,* выделенных от людей при вспышках холеры в Украине в 1991, 1994, 1995, 2011 гг..; 32 штамма *V.cholerae O1,* выделенных от людей с ОКИ, в 1995-2012 гг.; 100 штаммов *V.cholerae nonO1,* выделенных от людей с ОКИ, в 2011-2013 гг. Генетические исследования проводили методом ПЦР с видоспецифическими праймерами под гены патогенности холерных вибрионов - *ctxA, ace, zot, rstR, rstC, tcpAE, rtxC, toxR, mshA, wbeT, wbfR, hapA, Hly.* Биологические свойства холерных вибрионов определяли по общепринятым методикам.

Основные результаты. Полученные результаты исследований показали, что наличие основных генов патогенности в геноме различных серологических групп холерных вибрионов имеют существенные отличия. В геномах 69 штаммов *V.cholerae O1*, выделенных от людей в период вспышек холеры, выявлено 12 основных генов патогенности: *ctxA,* отвечающий за синтез холерного токсина; *ace* и *zot* - продуцирующие дополнительные токсины Ace

и Zot; ген-репрессор *rstR* с профага RS2; ген-антирепрессор *rstC* с профага RS1; *tcpAE*, отвечающий за синтез токсин-корегулируемых пилей адгезии; *wbeT,* кодирующий синтез О1-серогруппы; *toxR,* основной регуляторный ген; *mshA,* координатор маннозочувствительных пилей адгезии; *rtxC,* регуляторный ген с кластера RTX; *hapA,* кодирующий синтез гемаглютинин/протеазы; *Hly,* отвечающий за синтез гемолизина Hly. При этом не было выделено гена *wbfR,* который отвечает за синтез О139 серогруппы. Штаммы холерных вибрионов, которые несут в своем геноме основные гены патогенности, относятся к вирулентным вариантам и способны вызывать холеру.

В то же время у 8,7% штаммов *V.cholerae O1* не было выделено генов *rstR* и *rstC*, а у 2,9% штаммов - гена *tcpAE,* но следует отметить, что при этом сохранялась холерогенность. Отсутствие некоторых генов в геноме холерных вибрионов указывает на изменчивость генома, а также способность вибрионов терять гены без изменения своих основных свойств.

Генетические исследования генома 32 штаммов *V.cholerae O1*, которые были выделены от людей в межэпидемический период холеры, показали, что они не имеют некоторых изучаемых генов, а именно: *ctxA, ace, zot, rstR, rstC, wbfR*. При этом у 100% штаммов этой группы были выделены гены - *hapA, Hly, rtxC, toxR; у* 71,9% штаммов - ген *wbeT,* у 50,0% - ген *mshA* и у 15,6% - ген *tcpAE*.

Таблица. Процентное (%) соотношение основных генов патогенности в геноме штаммов V.cholerae O1, V.cholerae nonO1

Гены	***V.cholerae O1*** (вирулентные)	***V.cholerae O1*** (авирулентные)	***V.cholerae non O1***
	69 штаммов	32 штамма	100 штаммов
ctxA	100	0	0
ace	100	0	0
Zot	100	0	0
rstR	91,3	0	0
rstC	91,3	0	0
tcpAE	97,1	15,6	0
wbeT	100	71,9	0
wbfR	0	0	0
rtxC	100	100	100
toxR	100	100	95,0
mshA	100	50,0	15,0
hapA	100	100	95,0
Hly	100	100	100

Результаты исследований показывают, что в периоды между вспышками холеры в Украине от людей выделяют *V.cholerae O1*, которые не несут основных генов патогенности, поэтому клинические проявления холеры не проявляются. Такие штаммы *V.cholerae O1* относятся к авирулентным вариантам, но они способны вызвать диарею у людей. Вероятно, что клинические проявления ОКЗ связаны с действием гемолизинов и цитотоксинов, которые были выявлены в геноме исследуемых холерных вибрионов.

Проведенные генетические исследования генома 100 штаммов *V.cholerae nonO1* серогруппы показали, что они также не имеют основных генов патогенности: *ctxA, ace, zot, rstR, rstC, wbfR, wbeT, tcpAE*. В то же время у 15,0% штаммов обнаружен ген *mshA,* у 95,0% гены *hapA* и *toxR,* а у 100% штаммов были выделены гены *Hly* и *rtxC*. Следует отметить, что в геноме штаммов *V.cholerae nonO1* процент выявления исследуемых генов патогенности уменьшается по сравнению с авирулентными штаммами *V.cholerae O1* и значительно - с вирулентными штаммами *V.cholerae O1*.

Таким образом, проведенные молекулярно-генетические исследования генов штаммов *V.cholerae O1/nonO1*, выделенных от людей в Украине позволили провести сравнительную их характеристику по основным генам патогенности, что дает возможность мониторировать изменение их биологических свойств на генетическом уровне, а также проводить быструю идентификацию с помощью ПЦР-метода.

Заключение. При сравнительном изучении штаммов *V.cholerae*, выделенных от людей в Украине, на наличие генов патогенности холерных вибрионов - *ctxA, ace, zot, rstR, rstC, tcpAE, rtxC, toxR, mshA, wbeT, wbfR, hapA, Hly,* выявлен уникальный геномный профиль для каждой группы: для *V.cholerae O1,* выделенных в период вспышек холеры; для *V.cholerae O1* в период между вспышками; *V.cholerae nonO1* – при регистрации острых кишечных заболеваний.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МАСС-СПЕКТРОВ ПЛАНКТОННЫХ И БИОПЛЕНОЧНЫХ ФОРМ *V. CHOLERAE*

Чемисова О.С., Титова С.В., Сагакянц М.М., Рыковская О.А.

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия

Введение. В настоящее время MALDI-ToF MS успешно интегрирован в работу микробиологических лабораторий, в том числе для видовой идентификации клинически значимых микроорганизмов [1]. Успешно проходит разработка методологических подходов к применению масс-спектрометрии в ускоренной идентификации возбудителей особо опасных инфекций [2]. Вместе с тем MALDI-ToF MS может применяться и для внутривидового типирования бактерий путем поиска «биомаркеров» [3].

В настоящее время общепризнанным является факт существования многих микроорганизмов в природной среде в тесном взаимодействии с абиотическими и биотическими поверхностями преимущественно в виде биопленок, состоящих из клеток и внеклеточного матрикса. Absalon C. *et al*. в 2011 году описали протеом матрицы биопленки холерного вибриона, который включает не менее 74 белков с внецитоплазматической локализацией [4]. К ним относятся матричные белки RbmA и RbmC, несколько белков наружной мембраны (OmpA, OmpU, OmpT, OmH, OmpK, OmpW, OmpS и TolC), периплазмические белки, белки жгутиков, белки MSHA, ферменты (гемагглютинин/протеаза HapA и хитиназа ChiA-2) и гемолизин HlyA.

В связи с этим **целью** данной работы явился сравнительный анализ белковых масс-спектров планктонных и биопленочных форм холерных вибрионов.

Материалы и методы. В исследование было взято 66 штаммов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп различного происхождения и токсигенности. Подготовку образцов проводили методом экстракции этанолом/муравьиной кислотой. Видовую идентификацию проводили с использованием базы белковых спектров холерных вибрионов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» (свидетельство о государственной регистрации № 2013620585 от 29.04.2013 г.).

Результаты. В результате идентификации в автоматическом режиме все исследуемые культуры независимо от их формы (планктонная или биопленочная) были отнесены к виду *V. cholerae* с показателями Score выше 2,300, что свидетельствует о высокой достоверности определения вида.

Сходство между масс-спектрами биопленок и планктонных форм испытуемых штаммов холерного вибриона было изучено путем построения в программе Biotyper (Bruker Daltonics) корреляционной матрицы и вычисления композитного индекса корреляции (CCI). Значения CCI близкие к 1 свидетельствуют о высокой степени соответствия спектров, значения близкие к 0 – о четких различиях. В матрице цвет ячеек соответствует значению CCI (1,0 – коричневый, далее по мере уменьшения оранжевый, желтый, зеленый, синий). Индекс корреляции для спектров биопленок и планктонных культур у изученных штаммов составил от 0,55 до 0,93. У 62 (93,9%) CCI штаммов составил более 0,5, что позволяет сделать заключение о стабильности белкового масс-спектрометрического состава при переходе от планктонного состояния к биопленке. В то же время, у четырех штаммов индекс корреляции составил от 0,0117 до 0,0191 (*V. cholerae* El Tor 18251 *(ctxA⁻ tcpA⁻),* 18325 *(ctxA⁻tcpA⁺)*, 18337 *(ctxA⁺ tcpA⁺)*, 19670 *(ctxA⁻ tcpA⁻)*). Все штаммы *V. cholerae* с низкими CCI относились к биовару El Tor, однако по токсигенности и источнику выделения отличались. Наиболее высокие индексы корреляции между биопленочными и планктонными формами отмечены у штаммов холерных вибрионов O139 серогруппы. Возможно, при попадании в условия действия неблагоприятных факторов, стимулирующих холерный вибрион на переход к биопленочной форме существования, у штаммов *V. cholerae* O139 в первую очередь происходят изменения в капсульном полисахариде, отличающем их от холерных вибрионов El Tor.

Следующим этапом данной работы был сравнительный анализ белковых масс-спектров по величине масса/заряд (m/z) и относительной интенсивности пиков. В результате не было выявлено белков, характерных только для планктонных культур или биопленок холерных вибрионов. Подобное сходство можно объяснить особенностями метода, который позволяет выявлять качественный и количественный состав микробных белков в диапазоне 2000-20000 m/z, основную долю которых составляют рибосомальные белки специфичные для микроорганизмов независимо от условий их существования [5]. Однако наблюдалось различие в интенсивности отдельных пиков, особенно выраженное у штаммов, показавших низкий индекс корреляции между планктонной и биопленочной формами. У биопленки штамма *V. cholerae* 19613 более интенсивными по сравнению с планктоном было 2 белка с m/z в районе 9490 и 4746. В то время как у штамма с низким CCI наблюдается разница в интенсивности 5 пиков: пики с m/z 4367 и 4746 имеют большую интенсивность у планктонных форм, а пики с m/z 6163, 6277, 7166 – у биопленки. Подобная закономерность наблюдалась и у других изученных штаммов, что может свидетельствовать о выявленных различиях в белковых масс-спектрах между указанными планктонными и биопленочными культурами.

Распределение планктонных и биопленочных культур при построении дендрограммы соответствовало показателям индекса корреляции: культуры с CCI больше 0,8 относились к одному кластеру.

Заключение. Таким образом, проведенное исследование свидетельствует о стабильности фенотипических свойств холерного вибриона независимо от формы его существования. Показана высокая достоверность MALDI-ToF масс-спектрометрии в идентификации видовой принадлежности как планктонных, так и биопленочных форм *V. cholerae* O1 и O139 и в выявлении различий между вышеназванными формами.

Список используемой литературы

1. Баранцевич Е.П., Баранцевич Н.Е. Применение

MALDI-TOF масс- спектрометрии в клинической микробиологии // Трансляционная медицина. - 2014. - № 3. - С. 23-28.

2. Спицын А.Н., Уткин Д.В., Куклев В.Е., Портенко С.А., Германчук В.Г., Осина Н.А. Применение MALDI масс-спектрометрии в диагностике особо опасных инфекционных болезней: современное состояние и перспективы // Проблемы особо опасных инфекций. - 2014. - № 3. - С. 77-82.

3. Чемисова О.С., Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Чайка И.А., Титова С.В. Внутривидовое типирование генетических вариантов возбудителя холеры Эль Тор с использованием масс-спектрометрии и молекулярно-генетических методов // Сборник конференции «Молекулярная диагностика 2014», г. Москва.

4. Absalon C, Van Dellen K., Watnick P.I. A communal bacterial adhesin anchors biofilm and bystander cells to surfaces // PLoS Pathog. – 2011. - №7: e1002210.

5. Liyanage R., Lay J.O. Jr. An introduction to MALDI-TOF MS // Identification of microorganism by mass spectrometry / John Wiley & Sons. Inc. Hoboken. NJ. - 2006. - P. 39-60.

РАЗРАБОТКА ДИАГНОСТИЧЕСКОГО НАБОРА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ТЯЖЕЛЫХ ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ (ТОРИ) МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

Шмелёва Н.П., Сивец Н.В., Лапо Т.П., Грибкова Н.В.

Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, Республика Беларусь

Введение. На протяжении последних десятилетий участились случаи преодоления межвидового барьера вирусами животных, сопровождающиеся развитием ТОРИ у людей. Особую опасность представляет высокопатогенный вирус гриппа птиц A(H5N1), который регулярно вызывает заболевания людей в природных очагах. Периодически поступают сообщения о заболеваниях, вызванных и другими субтипами вирусов гриппа птиц, такими как A(H7N9) и A(H9N2). Кроме того, за последние два года разнообразие циркулирующих вирусов гриппа пополнили выявленные штаммы вируса гриппа A(H5N2), A(H5N3), A(H5N6) и A(H5N8). Помимо вирусов гриппа способность преодолевать межвидовой барьер демонстрируют и коронавирусы, например, весьма актуальный в настоящее время MERS-CoV. Учитывая развитый гражданский и религиозный туризм в регионы, где регистрируются заболевания, вызванные новыми для человека вирусами, вполне вероятен завоз этих возбудителей и в другие страны. Своевременное выявление этих возбудителей играет существенную роль для обеспечения биобезопасности страны, организации адекватных профилактических мероприятий и обеспечения клинического ведения пациентов. В настоящее время в качестве диагностического метода предпочтение отдается полимеразной цепной реакции (ПЦР), которая отличается высокой специфичностью и позволяет относительно быстро получить результат исследования.

Целью данной работы явилась разработка набора реагентов для выявления методом ПЦР возбудителей ТОРИ, ассоциированных с новыми для человека вирусами гриппа А субтипов H5, H7, H9 и MERS-CoV.

Задачи исследования: подбор пар праймеров и зондов для детекции и идентификации вирусов гриппа субтипов A/H5, A/H7, A/H9 и MERS-CoV, конструирование рекомбинантных плазмид для использования их в качестве положительных контролей, оптимизация параметров проведения ПЦР и оценка специфичности и чувствительности разработанного набора.

Материалы и методы. В работе использованы вирусы гриппа A(H5N1), A(H7N9) и A(H9N2) производства CDC (Атланта, США), полученные в рамках Глобальной сети по надзору за гриппом и представляющие собой неинфекционные инактивированные реассортанты вирусов гриппа А соответствующих субтипов, предназначенные для использования в качестве положительного контроля ПЦР. Образец коронавируса MERS-CoV, представляющий собой плазмиду, предназначенную для использования в качестве положительного контроля ПЦР (производство института вирусологии Роберта Коха, Бонн, Германия).

Подбор праймеров и зондов проводили на основании анализа нуклеотидных последовательностей, представленных в Международном генетическом банке данных (GenBank) с помощью интернет-программ Primer3Plus и Primer-BLAST (NCBI, Национальный центр биотехнологической информации, США). Разработанные праймеры и зонды синтезированы в ОДО «Праймтех» (г. Минск, Республика Беларусь). Положительные контрольные образцы получены методом молекулярной трансформации. Наличие специфической вставки подтверждено методом ПЦР с разработанными праймерами и зондами. Аналитическую чувствительность разработанных праймеров оценивали с использованием 10-кратных разведений положительных контрольных образцов соответствующих вирусов. Концентрацию плазмидной ДНК определяли на спектрофотометре NanoDrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific, США). Аналитическую специфичность разработанного набора определяли путем реакции амплификации с использованием панели положительных контрольных образцов респираторных вирусов и вирусов гриппа А субтипов H1, H3, H5, H7, H9 и коронавируса MERS-CoV. Диагностическую специфичность набора реагентов оценивали на клиническом материале людей, не содержащем РНК искомых возбудителей (100 назофарингеальных мазков). Выделение РНК и получение кДНК на матрице РНК проводили с использованием наборов реагентов «НуклеСорб» и «РЕВЕРТАЗА - M-MuLV-50» (Республика Беларусь). В качестве референс-наборов использовали панели для выявления РНК вирусов гриппа A/H5, A/H7, A/H9 и MERS-CoV, производства CDC (Атланта, США), полученные в рамках Глобальной сети по надзору за гриппом. Детекцию про-

дуктов амплификации проводили на приборе Rotor Gene 6000, Corbett research, (Австралия).

Результаты. При разработке диагностического набора был определен следующий формат: для вирусов гриппа использовали формат дуплекс (детекция генов гемагглютинина вируса гриппа и ВКО); для MERS-CoV использовали формат триплекс (детекция двух генов мишеней MERS-CoV upE, ORF 1a и ВКО); зонды, использующиеся в реакции, мечены флуоресцентными красителями, детектирующимися на каналах FAM, HEX, ROX.

Для каждого из искомых возбудителей были определены консервативные участки соответствующих генов, к которым проводили подбор праймеров и зондов. Для контроля этапов выделения нуклеиновых кислот и реакции амплификации использовали эндогенный внутренний контрольный образец (ВКО) - фрагмент гена 18S рРНК человека. Для исключения конкурентной амплификации ВКО проводили оценку эффективности амплификации целевых кДНК как в присутствии, так и в отсутствие праймеров и флуоресцентных зондов к ВКО в ПЦР-смеси. Было показано отсутствие конкурентной амплификации ВКО с целевым продуктом реакции. Для создания положительных контрольных образцов провели клонирование продуктов амплификации в вектор pJET 1.2/blunt с помощью набора CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific). В результате молекулярной трансформации были получены плазмидные конструкции к вирусам гриппа A/H5, A/H7, A/H9, коронавирусу MERS-CoV и 18S рРНК.

С использованием полученных плазмидных конструкций подобраны условия оптимального проведения амплификации. Оптимизированы соотношения концентрации реагентов в реакционной смеси, а также температурный профиль реакции. В качестве отрицательного контроля использовали ТЕ-буфер и воду для ПЦР. Эффективность амплификации после оптимизации составила 1,0-1,06, что говорит об удвоении продукта амплификации в каждом последующем цикле реакции.

При проведении оценки аналитической специфичности разработанного набора с использованием панели положительных контрольных были показаны специфичность разработанных праймеров и отсутствие перекрестных реакций. Оценка диагностической специфичности показала отсутствие положительного сигнала для всех 100 исследованных назофарингеальных образцов. Таким образом, диагностическая специфичность набора составила 100%. Аналитическая чувствительность набора составила $1*10^3$ Гэ/мл для всех типов плазмид.

Заключение. Разработанный набор реагентов для диагностики возбудителей ТОРИ методом ПЦР в режиме реального времени позволяет выявлять генетический материал вирусов гриппа А субтипов H5, H7, H9 и MERS-CoV. Аналитическая чувствительность набора составляет $1*10^3$ Гэ/мл.

Раздел 7. СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИЙ ОРГАНОВ РЕПРОДУКЦИИ

THE ROLE OF POLYMICROBIAL COMMUNITIES IN URO-GENITAL INFECTIONS

Alexander Swidsinski

Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

Complex microbial communities are almost everywhere. Our knowledge about them is however limited. We are unable to predict what happens, when we introduce more than 3 different bacterial species in the microbial culture. The diversity of bacteria inhabiting surfaces of human body is much higher. The gene sequencing based methods allow identifying participants but do not reveal their interactions with the epithelial surface and each other, response to environmental factors and therapy. To understand polymicrobials, we have to investigate them as a structure-functional unity. One helpful approach is the ribosomal-gene based fluorescence in situ hybridization or FISH. The following lecture summarizes our FISH studies of uro-genital microbiome in healthy, patients with BV, recurrent cystitis and VVC. Our data demonstrate, that aside of mono-infections with single pathogens, bacteria form manifold polymicrobial biofilms with a stable structure. Due to microbial cooperation such biofilms demonstrate properties different to each of the participants, deliberately colonize surfaces in hostile environment and act as true infectious agents. Although most of participants can be often found in environment, the assembly of single players to vital polymicrobial biofilm is a not trivial every day process. Once developed and evolutionally conserved such polymicrobial biofilms grow and spread per continuum which is possible only by close contact of sexually transmitted diseases.

СВЯЗЬ ГЕНОТИПОВ *GARDNERELLA VAGINALIS* С БАКТЕРИАЛЬНЫМ ВАГИНОЗОМ

Крысанова А.А.[1], Шалепо К.В.[1], Хайруллина Г.А.[2], Шипицына Е.В.[1], Гущин А.Е.[2], Савичева А.М.[1]

[1]ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта», Москва, Россия

[2]ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение

Бактериальный вагиноз (БВ) – основная причина патологических выделений из влагалища у женщин репродуктивного возраста. Наиболее часто в качестве доминирующего микроорганизма при БВ выявляется *Gardnerella vaginalis.* Однако этот микроорганизм может также присутствовать во влагалище клинически здоровых женщин. В последние годы было показано значительное генотипическое и фенотипическое разнообразие *G. vaginalis*, которое может определять различия в течении инфекционного процесса и результатах лечения. Так, недавний сравнительный геномный анализ клинических изолятов *G. vaginalis* показал существование четырех групп геномов в пределах вида, очень ограниченно рекомбинирующих между собой, имеющих характерный размер генома, соотношение гуанозин:цитозин и значительное содержание внутригруппового корового генома [Ahmed A., 2012]. Было высказано предположение, что эти 4 генотипа *G. vaginalis* могут составлять отдельные виды.

Цель

Целью исследования было изучение частоты выявления генотипов *G. vaginalis* у женщин с выделениями из влагалища и оценка их связи с БВ.

Материалы и методы

В исследовании участвовали женщины репродуктивного возраста, обратившиеся в лечебные учреждения гинекологического профиля Санкт-Петербурга с жалобами на выделения из влагалища. Критериями исключения являлись беременность и применение антибактериальных препаратов в течение последних 4 недель. Клиническим материалом для исследования служило отделяемое влагалища, которое получали с помощью двух дакроновых тампонов. Содержимое одного тампона наносили на предметное стекло, окрашивали по Граму и оценивали бактериальные морфотипы по методу Нуджента. Содержимое второго тампона помещали в пробирку с транспортной средой ТСМ (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва) для количественного определения генотипов *G. vaginalis* методом ПЦР в реальном времени [Balashov S.V., 2014]. Статистический анализ результатов осуществляли с использованием статистического пакета SPSS (IBM). Для анализа различий в распределении категориальных переменных использовали критерий хи-квадрат, количественных – U-тест Манна – Уитни.

Основные результаты

Всего в исследование были включены 304 женщины в возрасте от 18 до 54 лет (средний возраст – 32 года). У 164 (54%) женщин микробиоценоз влагалища был охарактеризован как нормальная микрофлора (число баллов по Нудженту 0-3), у 58 женщин (19%) – как промежуточная микрофлора (число баллов по Нудженту 4-6), у 82 женщин (27%) – как БВ (число баллов по Нудженту 7-10). ДНК *G. vaginalis* (всех генотипов) была выявлена во влагалище у 210 женщин (69%): у 87 женщин (53%) с нормальной микрофлорой, у 45 женщин (78%) с промежуточной микрофлорой и у 78 женщин (95%) с БВ (таблица). Наиболее распространенным был генотип 4 – 58% среди всех женщин. Генотип 3 был выявлен только у 4% всех женщин. Для всех генотипов *G. vaginalis,* за исключением генотипа 3, наблюдали статистически значимые различия в частоте выявления в группах пациенток с нормальной микрофлорой, промежуточной микрофлорой и БВ.

Таблица. Частота выявления генотипов *Gardnerella vaginalis* у женщин с нормальной микрофлорой, промежуточной микрофлорой и бактериальным вагинозом (по Нудженту)

Генотипы *G. vaginalis*	Частота (%)				Значение *p*
	Все женщины (*n*=304)	Женщины с нормальной микрофлорой (*n*=164)	Женщины с промежуточной микрофлорой (*n*=58)	Женщины с БВ (*n*=82)	
1	101 (33)	21 (13)	24 (41)	56 (68)	0,000
2	113 (37)	27 (16)	26 (45)	60 (73)	0,000
3	11 (4)	3 (2)	3 (5)	5 (6)	0,187
4	176 (58)	70 (43)	36 (62)	70 (85)	0,000
Все генотипы	210 (69)	87 (53)	45 (78)	78 (95)	0,000

Концентрация ДНК всех генотипов *G. vaginalis,* за исключением генотипа 3, также значительно различалась в трех группах женщин и была самой высокой в группе женщин с БВ. Таким образом, для генотипов 1, 2 и 4 была показана значительная ассоциация с БВ, тогда как для генотипа 3 такой ассоциации не выявлено.

Из 210 образцов, содержащих ДНК *G. vaginalis*, 95 образцов (45%) содержали один генотип, 115 образцов (55%) – несколько генотипов. Образцы, содержащие 2 и более генотипов, выявлялись с частотой 29% у женщин с нормальной микрофлорой (25 из 87), 62% – с промежуточной микрофлорой (28 из 45), 79% – с БВ (62 из 78) (*p*=0,000).

Выводы

Распространенность генотипов *G. vaginalis* существенно варьирует (33%, 37%, 4% и 58% для генотипов 1, 2, 3 и 4, соответственно). Все генотипы, за исключением генотипа 3, значительно чаще и в значительно более высокой концентрации выявляются у женщин с БВ, чем у женщин без БВ. Содержание в образце двух и более генотипов *G. vaginalis* ассоциировано с БВ.

Список используемой литературы

1. Ahmed A, Earl J, Retchless A, Hillier SL, Rabe LK, Cherpes TL, Powell E, Janto B, Eutsey R, Hiller NL, Boissy R, Dahlgren ME, Hall BG, Costerton JW, Post JC, Hu FZ, Ehrlich GD. Comparative genomic analyses of 17 clinical isolates of Gardnerella vaginalis provide evidence of multiple genetically isolated clades consistent with subspeciation into genovars. J Bacteriol. 2012 Aug; 194(15):3922-37.

2. Balashov SV, Mordechai E, Adelson ME, Gygax SE. Identification, quantification and subtyping of Gardnerella vaginalis in noncultured clinical vaginal samples by quantitative PCR. J Med Microbiol. 2014;63(Pt 2):162-75.

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОФЛОРЫ ЭНДОМЕТРИЯ ПРИ ЛЕЙОМИОМАХ

Орадова А.Ш., Сапаргалиева А.Д., Шумкова Э.Н., Джардемалиева Н.Ж.

Казахский национальный медицинский университет имени С.Д. Асфендиярова, Алматы, Республика Казахстан

Актуальность. Миома матки является одним из самых распространенных заболеваний у женщин и составляет до 12 - 25% всех гинекологических заболеваний. Частота заболеваемости миомой к 35 годам достигает 45%. Ранее пик заболеваемости приходится на возрастную группу 29 - 49 лет, но в последнее время миома матки "помолодела" и становится диагностической проблемой в группе женщин репродуктивного возраста [1].

Цель: оценить микрофлору слизистой эндометрия 98 у больных женщин репродуктивного возраста.

Материалы и методы. Исследованы образцы из биоптатов внутреннего слоя матки у 58 женщин репродуктивного возраста г. Алматы, выделили ДНК с помощью ПЦР в режиме реального времени. ПЦР - анализ проводили с использованием тест-системы АО «ДНК-Технология» (Candida albicans, Gardnerella vaginalis, Ureaplasma urealyticum+ Ureaplasma parvum, HPV16, HPV18), Москва, в термоциклере «ДТ-322». Режим амплификации после внесения минерального масла составлял: денатурация - 94^0 С, 35 сек; отжиг - 60^0 С, 25 сек; синтез - 72^0 С, 35 сек (всего - 45 циклов).

Результаты исследования. В скрининге участвовали 98 женщин репродуктивного возраста г. Алматы в рамках научного гранта 2015- 2016 гг. В результате проведенных исследований биоптатов эндометрия 98 пациенток с лейомиомами, было обнаружено, что наиболее часто среди идентифицированных микроорганизмов (Candida albicans, Gardnerella vaginalis, Ureaplasma urealyticum+ Ureaplasma parvum, HPV16, HPV18) в образцах регистрировались грибы рода Candida albicans в 15% случаев. Также определялся высоко канцеронгенный вирус папилломы человека 16 типа – в 7% случаев.

Заключение. Таким образом, установлено что, особенностью лейомиом у женщин репродуктивного возраста, помимо его малосимптомности и высокой частоты осложнений, относится часто встречающаяся ассоциация с возбудителями урогенитальных инфекций - Candida albicans и HPV16, HPV18.

Большие надежды в этом плане возлагаются на полимеразно-цепную реакцию с использованием ДНК-зондов с генетическими маркерами основных перечисленных видов [2]. Преимуществами этой методики являются высокая специфичность, быстрота (за несколько часов), необязательно присутствие живых микробов, т.е. нет необходимости создавать анаэробные условия при транспортировке материала в лабораторию.

Список литературы

1. A. Sapargaliyeva, E. Shumkova, Zh. Imanbayeva, N. Dzhardemaliyeva a, Zh. Kulekesheva, A. Oradova. – Morphological characteristics of endometriosis in women older than 40 years of age // 27 th European Congress of Pathology, Virhows Archiv, The European Journal of Pathology, - London, September 2015. Vol. - 467, supplement 1, - P.137.

2. Тихомиров А.Л. Комплексное лечение смешанных генитальных инфекций / А.Л. Тихомиров, С.И. Сарсания // Гинекология. – 2004. – Т.6, № 6. – С. 289–292.

АНАЛИЗ ИНФОРМАТИВНОСТИ ПОЛУЧАЕМОГО У МУЖЧИН БИОМАТЕРИАЛА ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ НА УРОГЕНИТАЛЬНЫЕ ИНФЕКЦИИ МЕТОДОМ ПЦР

Воронова Е.А., Судоплатова Е.В., Никонорова И.В.

ЗАО «Медицинская компания ИДК», группа компаний «Мать и Дитя», Самара, РФ

Введение. В диагностике репродуктивно значимых инфекций большая роль отводится лабораторным исследованиям. От точности поставленного этиологического диагноза на 95% зависит успех лечения. Правильное установление диагноза зависит от того, насколько адекватен биологический материал, направленный на исследование, и насколько правильно выбраны методы лабораторной диагностики.

Диагностика генитальных инфекций до недавнего времени была ориентирована на выделение возбудителя и его стандартную идентификацию по биологическим свойствам и антигенному строению. Введение в широкую практику методов анализа нуклеиновых кислот с применением соответствующих праймеров может решить проблему быстрой и точной диагностики бактериальных и вирусных инфекций.

В настоящее время основным биоматериалом у мужчин при диагностике инфекций урогенитального тракта является соскоб из уретры. Однако во время его взятия у мужчин отмечается высокая болезненность и повышенная частота осложнений. По этой причине часть пациентов отказываются от проведения диагностических исследований. В ряде случаев соскоб можно заменить исследованием первой порции утренней мочи.

Существует точка зрения, что урогенитальный соскоб более информативен при выявлении инфекций, передающихся половым путем (ИППП), ввиду большего количества эпителиальных клеток, внутри и/или на поверхности которых преимущественно локализуются возбудители ИППП. Однако информативность мочи как биоматериала отмечена при ПЦР-диагностике гонореи, уреаплазмоза, микоплазмоза, хламидиоза, трихомониаза как в российских, так и в зарубежных публикациях и рекомендациях.

Целью работы являлась оценка содержания ДНК человека в соскобах из уретры и в образцах первой порции утренней мочи у мужчин методом ПЦР в режиме реального времени. В задачи работы входили: валидация образцов; оценка процентного количества образцов, непригодных для анализа; выявление причины брака; а также выявление корреляции между результатами, полученными у одних и тех же пациентов при ПЦР-диагностике ИППП в соскобах из уретры и в образцах первой порции утренней мочи.

Материалы и методы. В качестве биоматериала для исследования использовали соскоб из уретры и первую порцию утренней мочи мужчин.

Для экстракции ДНК использовали набор РеалБест ДНК-экспресс, основанный на щелочном лизисе пробы с помощью SDS (ВекторБест, Россия). Оценку количества ДНК в полученном образце выполняли с помощью набора РеалБест Валидация образца (ВекторБест, Россия). Мишенью праймеров, входящих в данную тест-систему, является ген HMBS человека.

Валидными, т.е. содержащими достаточное количество человеческой ДНК, считали пробы с содержанием ДНК человека более 2,4 lg (≥ 250 копий HMBS/образец), что обеспечивало получение достоверных результатов при обследовании биоматериала на ИППП.

Результаты. Для оценки валидации были исследованы соскобы из уретры (n = 210) и образцы первой порции утренней мочи (n = 151) у мужчин.

Положительную валидацию, т.е. достаточное количество ДНК человека, наблюдали для 90,5% соскобов из уретры и 92,7% образцов первой утренней порции мочи. Соответственно, для 9,5% соскобов и 7,3% образцов мочи валидация была отрицательна, и образцы содержали менее 250 копий HMBS/образец.

Кроме того, для оценки количества отбракованных образцов было исследовано в общей сложности 12035 образцов соскобов из уретры и 586 образцов первой порции утренней мочи. Процентное количество отбракованных образцов составило 586 (1,54%) и 14 (2,3%), соответственно.

При этом было отмечено несколько основных причин брака (таблица 1).

Одной из основных причин брака соскобов из уретры было недостаточное количество эпителиальных клеток (человеческой ДНК) - 41%. При анализе мочи этот фактор встречался реже (18%) и в основном был характерен для образцов, собранных не в утренние часы. Наиболее частой причиной брака при анализе первой порции утренней мочи оказался неправильный сбор биоматериала (35% по сравнению с 7% при анализе соскобов из уретры), в частности, с использованием нестерильных контейнеров. Частота брака, связанная с ингибированием ПЦР, была сопоставима в соскобах из уретры и в моче (40 и 35% соответственно).

Таблица 1. Причины брака при ПЦР-исследовании соскобов из уретры и первой порции утренней мочи у мужчин

Причины брака	Соскоб из уретры, %	Первая порция утренней мочи, %
Недостаточное количество эпителиальных клеток (< 250 копий HMBS /образец)	41	18
Неправильное взятие /сбор биоматериала	7	35
Ингибирование ПЦР-реакции	40	35
Ошибка идентификации	2	12
Отказ от исследования	10	0

Кроме того, при анализе образцов первой порции утренней мочи не было зафиксировано отказов от исследования, а при анализе соскобов их доля составила 10%. Это согласуется с литературными данными о том, что мужчины более охотно сдают мочу, чем соскобы из уретры – так, по литературным данным, при скрининге на генитальную инфекцию *Chlamydia trachomatis* только 30% мужчин являются сдавать соскоб из уретры, в то время как мочу сдают 94%.

При проведении исследований на ИППП методом ПЦР была отмечена 100% корреляция по выявлению абсолютных и условно-патогенных микроорганизмов в соскобах из уретры и в образцах первой порции утренней мочи.

Выводы

В проведённом исследовании положительная валидация наблюдалась для 90,5% соскобов из уретры и 92,7% образцов первой порции утренней мочи, что указывает на достаточное количество эпителиальных клеток, необходимых для анализа, в образцах обоих типов.

Выявлена 100% корреляция между результатами, полученными у одних и тех же пациентов при ПЦР-диагностике ИППП в соскобах из уретры и в первой порции утренней мочи.

Таким образом, скрининговое исследование образцов первой порции утренней мочи в качестве биоматериала у мужчин для диагностики урогенитальных инфекций является целесообразным ввиду информативности, отсутствия болезненности и осложнений после взятия биоматериала.

ВЫЯВЛЯЕМОСТЬ *NEISSERIA GONORRHOEAE* И ДРУГИХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ УРОГЕНИТАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ У ПАЦИЕНТОВ С СИФИЛИСОМ

Герасимова Н.А., Евстигнеева Н.П., Сурганова В.И.

ГБУ СО «Уральский НИИ дерматовенерологии и иммунопатологии» Минздрава Свердловской области, Екатеринбург, Россия

Введение. По оценкам ВОЗ (2016), ежегодно в мире отмечается 5,6 млн. случаев сифилиса и 78 млн. случаев гонококковой инфекции при возрастающей угрозе устойчивости *N. gonorrhoeae* к антимикробным препаратам [1]. Согласно официальным статистическим материалам, в Российской Федерации отмечается тенденция к снижению заболеваемости сифилисом и гонококковой инфекцией [2]. Больные сифилисом относятся к группе с высоким риском заболеваемости ИППП [3], однако эти инфекции часто не диагностируются в связи с отсутствием клинических проявлений. Изучение ассоциаций при сифилисе представляет интерес для уточнения резервуара невыявленной заболеваемости возбудителями ИППП и урогенитальных инфекций.

Цель и задачи исследования. Оценить выявляемость *N. gonorrhoeae* у пациентов с сифилисом, при отсутствии клинических проявлений со стороны урогенитального тракта бактериоскопическим, бактериологическим и молекулярно-биологическим методами и других возбудителей урогенитальных инфекций.

Материалы и методы. Проведено комплексное клинико-лабораторное обследование 44 пациентов с сифилисом в возрасте от 20 до 53 лет (средний возраст 37,7 лет, женщин – 22,7%, мужчин – 77,3%) дерматовенерологического отделения с первичным сифилисом 4,6%, вторичным – 22,7%, ранним скрытым сифилисом – 9,1%, поздним скрытым сифилисом – 40,9%, поздним нейросифилисом – 13,6%, с серорезистентностью – 9,1%, без объективных симптомов со стороны урогенитального тракта. Забор отделяемого из урогенитального тракта проводили в день поступления, до начала специфической терапии. Для бактериологического исследования на *N. gonorrhoeae* использовали питательные среды *GC Medium Base* с ростовой добавкой *IsoVitalex (Becton Dickinson*, США) и *Chocolate Agar* с ростовой добавкой *PoliVitalex* и селективной добавкой *VCN-Mixture* (*BioMerieux*, Франция). Идентификацию сопутствующей микрофлоры проводили методом времяпролетной масс-спектрометрии экстрагированных в матриксе белков из суточной культуры на анализаторе *VITEK MS MALDI-TOF*. Для молекулярно-биологического исследования на *N.gonorrhoeae* и другие облигатные

и условно-патогенные возбудители применяли наборы реагентов «АмплиСенс» *Neisseria gonorrhoeae*-скрин-FL»; «АмплиСенс» *C.trachomatis/Ureaplasma/M.genitalium/M. hominis* Мультипрайм-FL», согласно инструкции производителя.

Основные результаты. При бактериоскопическом исследовании отделяемого из уретры пациентов отмечалось низкое (соотношение Л/Э<1) содержание полиморфноядерных лейкоцитов и скудная или умеренная кокковая микрофлора. У пациенток бактериоскопия отделяемого уретры и цервикального канала была в пределах нормы. У 9,1% пациенток наблюдалось повышенное содержание полиморфноядерных лейкоцитов в отделяемом из влагалища, в 50% случаев - обильная кокковая микрофлора.

При бактериологическом исследовании у пациентов идентифицированы *S. epidermidis, S. haemolyticus, Str. anginosus, C. albicans;* у пациенток *G. vaginalis, S. epidermidis, E. coli, C. albicans;* и др.

При молекулярно-биологическом обследовании всех пациентов с сифилисом у 63,6% выявлена ДНК возбудителей ИППП и урогенитальных инфекций: ДНК *N. gonorrhoeae* выявлена в 13,6% случаев (20,0% среди женщин и 11,8% среди мужчин), при этом рост культуры *N. gonorrhoeae* на питательных средах отсутствовал во всех случаях. Кроме того выявлены ДНК *C. trachomatis (*13,6%*), M. genitalium* (4,5%), *M. hominis* (27,3%), *Ureaplasma spp*.(45,5%). Моноинфекции у больных сифилисом представлены в 31,8% случаев, ассоциация из 2 возбудителей в 22,7%, три инфекции – в 9,1% случаев.

Заключение/выводы. У пациентов с сифилисом, при отсутствии клинических проявлений со стороны урогенитального тракта, применение молекулярно-биологического метода позволяет выявлять резервуар невыявленной заболеваемости ИППП, в том числе 13,6% гонококковой инфекцией, и урогенитальных инфекций. Полученные генетические изоляты *N. gonorrhoeae* интересны в плане изучения мутаций резистентности в генах *PenA, MTRR, PenB* и др., ответственных за устойчивость к цефалоспоринам, поскольку полирезистентные штаммы *N. gonorrhoeae* могут терять способность к росту на искусственных средах [4].

Список литературы

1. WHO releases new treatment guidelines for chlamydia, gonorrhoea and syphilis.2016. http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2016/antibiotics-sexual-infections/

2. Ресурсы и деятельность медицинских организаций дерматовенерологического профиля. Заболеваемость инфекциями, передаваемым половым путем, заразными кожными болезнями и болезнями кожи.-2016 г.

3. Торшина И.Е. Изучение клинических особенностей приобретенного сифилиса при микст инфекциях, передаваемых половым путем (ИППП). Сборник научных тезисов и статей «Здоровье и образование в XXI Веке». - Т.12. №4., 2010 г.

4. Gonza Z., Laia W., Liub M., Huac Z., Sund Y., Xua Q., Xiaa Y., Zhaoa Y., Xie X. Novel Genes Related to Ceftriaxone Resistence Found among Ceftriaxone-Resistant *Neisseria gonorrhoeae* Strains// Antimicrob. Agents Chemother. – 2016. – V. 60, №4. – P. 2043-2051.

АНАЛИЗ ФАКТОРОВ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ РАЗЛИЧИЯ В ПОКАЗАТЕЛЯХ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ И ТЕНДЕНЦИЯХ ЭПИДЕМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ИНФЕКЦИЙ, ПЕРЕДАВАЕМЫХ ПОЛОВЫМ ПУТЕМ, В РФ И ЗА РУБЕЖОМ

Гущин А.Е.

ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение.

Инфекции, передаваемые половым путем, вызванные в первую очередь гонококковая инфекция (ГИ), хламидийная инфекция (ХИ) и трихомонадная инфекция (ТИ) являются одним из основных факторов неблагоприятного воздействия на репродуктивную функцию человека. Эпидемиологический надзор за данными инфекциям и является важнейшей областью здравоохранения многих стран в том числе РФ. Показатели заболеваемости и тенденции эпидемического процесса позволяют планировать объем и характер медицинской помощи, а также профилактических мероприятий на снижение социального и экономического бремени, вызванного как самими инфекциями, так и их осложнениями. В целом по РФ и в г. Москве официальные статистические данные свидетельствуют о постоянной тенденции к снижению уровня заболеваемости всеми ИППП, включая ГИ, ХИ, ТИ. При этом ТИ официально остается самой распространенной среди других ИППП [1]. Наоборот, в США и экономически развитых странах Европы ТИ преобладает исключительно среди африканской этнической группы населения, и при этом наблюдается постоянный рост заболеваемости ХИ и ГИ [2,3]. Если в США в 2014г заболеваемость ХИ составила 465, а ГИ - 110 случаев на 100 тыс. населения соответственно и была самой высокой за предыдущие 15 лет наблюдений, то показатели заболеваемости в среднем по РФ в этом году стали наоборот самыми низкими за этот же период и составили: для ХИ – 46 и для ГИ – 23.5, а по Москве – 22.1 и 5.3. на 100 тыс. населения соответственно [4]. Причины таких серьезных различий могут находиться в области организации выявления и учета ИППП в нашей стране. Действующая в РФ система регистрации случаев ИППП, в первую очередь сифилиса, гонореи, трихомониаза и хламидиоза проводится в учреждениях кожно-венерологической службы, а другие медицинские организации, оказывающие услуги, связанные с диагностикой и лечением ИППП и не входящие в КВД (не-КВД), в подавляющем большинстве не регистрируют выявленные случаи инфекций. При этом количество пациентов, обращающиеся в учреждения не-КВД ежегодно увеличивается [5]. В США же доля случаев ГИ, как

и других ИППП, зарегистрированных в кожно-венерологических учреждениях, постоянно уменьшается и в 2014 г. составила всего 15.1%. Важным обстоятельством является и то, что в КВД РФ по-прежнему в качестве основных методов диагностики ГИ и ТИ используются микроскопия, реже – культуральное исследование, в то время как в развитых зарубежных странах они вытеснены высоко чувствительными молекулярно-биологическими методами диагностики. Наконец, ни в одной из стран, включая РФ, пока не налажена система регистрации случаев *M.genitalium*-инфекции, несмотря на то, что накопленная к настоящему времени научная информация позволила признать *M.genitalium* в качестве еще одного возбудителя ИППП, ответственного в развитии широко спектра репродуктивных патологий. В итоге, данные официальной статистики в РФ по заболеваемости ГИ, ХИ и ТИ могут в значительной степени не соответствовать реальному состоянию инфицированности населения и направлению эпидемического процесса указанными ИППП.

Литература:

1. Кубанова А.А., Кубанов А.А., Мелехина Л.Е., Богданова Е.В. Дерматовенерология в Российской Федерации. Итоги 2014 г. Успехи, достижения. Основные пути развития. Вестник дерматологии и венерологии. 2015. №4, 13-26.

2. Centers for Disease Control and Prevention. *Sexually Transmitted Disease Surveillance 2014.* Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, 2015.

3. Annual epidemiological report 2014 – STIs including HIV and blood-borne viruses. European Centre for Disease Prevention and Control, 2015.

4. Ресурсы и деятельность медицинских организаций дерматовенерологического профиля. Заболеваемость инфекциями, передаваемыми половым путем, заразными кожными болезнями и болезнями кожи (статистические материалы). Москва 2015.

5. Анисимова Н.С. Организация системы эпидемиологического наблюдения за хламидийной инфекцией. Диссертация канд.мед.наук. Москва 2014.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВЫЯВЛЕНИЯ ГОНОКОККОВОЙ И ТРИХОМОНАДНОЙ ИНФЕКЦИЙ У БЕРЕМЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ МИКРОСКОПИИ И ПЦР С УЧЕТОМ КЛИНИЧЕСКОГО СТАТУСА ПАЦИЕНТОК И КО-ИНФЕКЦИИ С ДРУГИМИ ИППП

Гущин А.Е.[1], Руднева Н.С.[2]

[1]ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, г. Москва, Россия
[2]ГУЗ «Тульский областной клинический кожно-венерологический диспансер» МЗ Тульской области, г. Тула, Россия

Введение. Инфекции, передаваемые половым путем (ИППП), при беременности представляют угрозу невынашивания, риск преждевременных родов, рождения детей с низким весом тела и перинатального инфицирования. В соответствии с приказом №572н МЗ РФ от 01.11.2012г., все беременные подлежат обследованию на наличие возбудителей различных инфекции, в том числе ИППП, вызванных *N.gonorrhoeae* (Ng)*, C.trachomatis* (Ct)*, M.genitalium* (Mg) и *T.vaginalis* (Tv). Согласно приказу, выявление Ct и Mg следует проводить с помощью ПЦР, в то время как обследование на наличие Ng и Tv следует выполнять с помощью микроскопии (МС). Однако в связи с низкой чувствительностью микроскопии во всех зарубежных рекомендациях для диагностики гонококковой и трихомонадной инфекций у женщин предпочтение отдается методам амплификации нуклеиновых кислот, к которым относится и ПЦР. При этом акцент делается на преимущества ПЦР для бессимптомных пациентов. Кроме того, ранее было показано, что в 50% ГИ и в 24% ТИ у женщин протекают как в ко-инфекции в различных комбинациях с Mg и Ct, а также друг с другом. В этом случае, с учетом чувствительности возбудителей к антибактериальным препаратам, требуется изменение тактики лечения [Гущин А.Е., 2015].

Цель исследования: сравнить частоту выявления Ng и Tv при использовании ПЦР и микроскопии у беременных с манифестной и бессимптомной формами инфекции, а также оценить частоту ко-инфекции возбудителей с другими ИППП.

Материалы и методы. В анализ были включены беременные, обследованные в 2015г. в рамках государственной программы «УЛУЧШЕНИЕ ДЕМОГРАФИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ И ПОДДЕРЖКА СЕМЕЙ, ВОСПИТЫВАЮЩИХ ДЕТЕЙ, В ТУЛЬСКОЙ ОБЛАСТИ», у которых были установлены гонококковая или трихомонадная инфекции с помощью ПЦР и/или микроскопии. У пациенток проводилась оценка наличия и характера жалоб и клинических признаков урогенитальной инфекции, а также наличие других ИППП – хламидийной и вызванной *M.genitalium*. Для выявления всех перечисленных ИППП использовали методику мультиплексной ПЦР в реальном времени с использованием набора реагентов «АмплиСенс *N.gonorrhoeae/C. trachomatis/M.genitalium/T.vaginalis*-МУЛЬТИПРАЙМ-FL» производства ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора.

Результаты. Общее количество женщин с Ng и Tv составило 247, из которых Ng была выявлена у 43 (17.4%), а Tv – у 214 (86.6%) пациенток. Среди инфицированных беременных подавляющее большинство 227 (92%) составили пациентки с жалобами на выделения, которые соответствовали клинической картине, описываемой дерматовенерологом (Таблица 1). При сравнительном анализе результатов микроскопии и ПЦР не было выявлено ни одного случая, когда обнаружение гонококков или трихомонад при микроскопии не подтверждалось бы результатами ПЦР. Следует отметить, что подавляющее число не выявленных с помощью микроскопии случаев гонококковой и трихомонадной инфекций протекали с клиническими проявлениями, требующими назначения лечебно-профилактических мероприятий, и без ис-

пользования высокочувствительного метода ПЦР такие мероприятия могли носить эмпирический характер. Дополнительным преимуществом применения мультиплексной ПЦР стала возможность установления случаев инфицирования одновременно несколькими возбудителями ИППП. У женщин с Ng инфекция чаще протекала как ко-инфекция с другими ИППП – у 24 (58.5%), чем моно-инфекция. У пациенток с Tv ко-инфекция с другими ИППП была установлена также у значительной части инфицированных – у 43 (20%). При этом случаи ко-инфекции были вызваны двумя или даже тремя возбудителями ИППП в разных комбинациях.

Таблица 1. Результаты выявления Ng и Tv и случаев ко-инфекции с другими ИППП с помощью микроскопии и ПЦР

Вариант инфекции	Клинич. статус	Выявленные случаи *N.gonorrhoeae*			Выявленные случаи *T.vaginalis*		
		Только методом ПЦР	Только МС	Одновр. методами ПЦР и МС	Только методом ПЦР	Только МС	Одновр. методами ПЦР и МС
Ng – моно, n=19	симптом	17	0	1			
	бессимп	1	0	0			
Ng+Ct, n=9	симптом	6	0	0			
	бессимп	2	0	1			
Ng+Mg n=3	симптом	2	0	0			
	бессимп	1	0	0			
Ng+Mg+Ct, n= 2	симптом	2	0	0			
	бессимп	0	0	0			
Ng+Tv, n=5	симптом	4	0	0	3	0	1
	бессимп	1	0	0	1	0	0
Ng+Tv+Ct, n=5	симптом	5	0	0	3	0	2
	бессимп	0	0	0	0	0	0
Tv – моно, n=171	симптом				150	0	4
	бессимп				17	0	0
Tv+Ct, n=27	симптом				19	0	5
	бессимп				3	0	0
Tv+Mg, n=6	симптом				5	0	0
	бессимп				1	0	0
Всего выявлено Ng		41	0	2			
Всего выявлено Tv					202	0	12

Выводы. Использование микроскопии при обследовании беременных на наличие гонококковой и трихомонадной инфекции не позволяет выявить инфекцию у подавляющего большинства инфицированных даже при наличии симптомов заболевания. Применение метода мультиплексной ПЦР позволяет не только выявлять случаи инфицирования отдельными возбудителями, но и состояния ко-инфекции, доля которых достаточно велика. Получаемые в результате исследования данные о спектре и комбинации патогенов с учетом существующих при беременности ограничений дают возможность выбрать соответствующую схему терапии.

ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ И ДОМИНИРОВАНИЯ ОТДЕЛЬНЫХ ВИДОВ ЛАКТОБАЦИЛЛ У ЖЕНЩИН РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА С УМЕРЕННЫМ ДИСБИОЗОМ ВЛАГАЛИЩА

Зорников Д.Л., Ворошилина Е.С., Плотко Е.Э.

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Екатеринбург, Россия
МФЦ «Гармония», Екатеринбург, Россия

Введение

На сегодняшний день установлено множество факторов, предрасполагающих к патологической трансформации вагинальной микробиоты. Однако точные причины и механизмы развития дисбиоза, лежащего в основе такого патологического состояния как бактериальный вагиноз (БВ), до сих пор не установлены, что не позволяет разработать средства для этиотропной терапии данного состояния. Метронидазол и клиндамицин – препараты, используемые в настоящее время для лечения БВ, позволяют добиться продолжительного терапевтического эффекта только у половины пациенток.

Все вышеперечисленное диктует необходимость поиска предикторов развития дисбиоза. Одним из таковых может являться видовой состав лактофлоры. Многие исследователи отмечают, что различные виды лактобацилл обладают разными протективными потенциалами. Появление возможности генотипировать вагинальные лактобациллы и определять их количественные взаимоотношения методом ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ) может способствовать разработке новых прогностических критериев, которые будут применяться для оценки стабильности микробиоценоза влагалища. Для ассоциации отдельных видов лактобацилл с «нормой» или «патологией» необходимо проведение исследований по частоте выявления этих видов у пациенток с нормоценозами и дисбиозами влагалища.

Цель исследования – оценить частоту выявления и доминирования отдельных видов лактобацилл методом ПЦР-РВ у женщин репродуктивного возраста с умеренным дисбиозом влагалища.

Материалы и методы

В исследование были включены 94 женщины в возрасте от 18 до 45 лет, состояние микробиоценоза влагалища которых удовлетворяло критериям умеренного дисбиоза по данным ПЦР-РВ. Женщины проходили обследование в клинике «Гармония» (г. Екатеринбург) в период с сентября 2011 по август 2014 года. Помимо возраста критериями включения в исследуемую группу являлось отсутствие у пациенток ВИЧ-инфекции, парентеральных гепатитов, возбудителей ИППП: *Treponema pallidum, Neisseria gonorrhoeae, Chlamydia trachomatis, Mycoplasma genitalium* и *Trichomonas vaginalis*, а также отсутствие системного или местного приема антимикробных препаратов в течение четырех недель перед исследованием.

Материал для исследования собирали с заднебоковой стенки влагалища с помощью одноразового урогенитального ДНК-зонда (делали соскоб со слизистой влагалища, предварительно освобожденной от избытка выделений) в пробирку Эппендорф, содержащую 1 мл физиологического раствора. Хранение и транспортировку материала проводили согласно инструкции производителя. ДНК выделяли с использованием комплекта реагентов ПРОБА-ГС (ООО «НПО ДНК-Технология», Москва). Выделенную ДНК хранили в морозильной камере при температуре –20°С.

Состояние микробиоценоза влагалища оценивали с помощью метода ПЦР-РВ (тест система «Фемофлор-16», ООО «НПО ДНК-Технология», Москва). Вагинальные лактобациллы типировали также методом ПЦР-РВ с применением набора реагентов для научного применения (ООО «НПО ДНК-Технология», Москва). Амплификацию выполняли на приборах ДТ-96 этого же производителя.

Основные результаты

Состояние микробиоценоза влагалища всех обследуемых пациенток соответствовало критериям умеренного дисбиоза (доля лактобацилл – 20-80% от всех выявляемых бактерий). В каждой пробе выявляли от 1 до 4 видов лактобацилл одновременно. У 53 пациенток (56,4%) выявляли единственный вид лактобацилл, у 21 – два вида (22,3%), у 17 – три вида (18,1%) и лишь у 3 женщин (3,2%) выявляли сразу четыре вида лактобацилл.

Отдельные виды лактобацилл идентифицировали в пробах с различной частотой (таблица). Чаще остальных обнаруживали виды *L. iners* и *L. gasseri* (54,3% и 36,2% случаев, соответственно). Тогда как виды *L. jensenii, L. vaginalis, L. crispatus* выявляли у 20,2%-24,5% обследуемых женщин (*L. jensenii* – 24,5%, *L. vaginalis* – 23,4% , *L. crispatus* – 20,2%). *L. johnsonii* удалось обнаружить только в 1 пробе (1,1%).

Следующим шагом оценивали частоту доминирования отдельных видов лактобацилл. В случае выявления нескольких видов одновременно доминирующим считали тот, доля которого была наибольшей. В качестве доминирующего вида у 43 (45,7%) женщин выявляли *L. iners* (таблица). Вторым по частоте доминирования видом являлся *L. gasseri,* который преобладал у 23 (24,5%) обследуемых. Виды *L. jensenii* и *L. crispatus* преобладали у 13 (13,8%) и 12 (12,8%) пациенток, соответственно. Крайне редко в качестве доминирующих видов фиксировали *L. vaginalis* и *L. johnsonii*: первый – у 2 (2,1%) пациенток, второй – у 1 (1,1%).

Заключение

У женщин с умеренным дисбиозом влагалища чаще выявляются и доминируют виды *L. iners* и *L. gasseri*. Лактофлора у данных пациенток преимущественно представлена одним или двумя видами.

Список используемой литературы

1. Зорников Д.Л., Тумбинская Л.В., Ворошилина Е.С. Взаимосвязь отдельных видов лактобацилл с суммарной долей лактофлоры в вагинальном микробиоценозе и группами условно-патогенных микроорганизмов, ассоциированными с дисбиозом влагалища. Вестник Уральской медицинской академической науки. 2015. № 4 (55). С. 99-105.

Таблица

Частота выявления и доминирования отдельных видов лактобацилл у женщин репродуктивного возраста с умеренным дисбиозом влагалища (n=94).

	Выявление		Доминирование	
	кол-во случаев	%	кол-во случаев	%
L. crispatus	19	20,2%	12	12,8%
L. iners	51	54,3%	43	45,7%
L. jensenii	23	24,5%	13	13,8%
L. gasseri	34	36,2%	23	24,5%
L. johnsoni	1	1,1%	1	1,1%
L. vaginalis	22	23,4%	2	2,1%

СРАВНЕНИЕ ЧАСТОТЫ ОБНАРУЖЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИППП НА ФОНЕ ДИСБИОТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ У ЖЕНЩИН С ОПУХОЛЕВЫМИ И ИНФЕКЦИОННО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Зыкова Т.А., Неродо Г.А., Франциянц Е.М., Гуськова Н.К.

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону, Россия

Введение. В настоящее время нет общепризнанной теории возникновения онкологических заболеваний, а имеющиеся гипотезы канцерогенеза объясняют лишь отдельные особенности возникновения этих заболеваний. Одной из важных составляющих в этиопатогенетической цепи канцерогенеза является инфекционный фактор.

Цель исследования. Сравнить частоту выявления возбудителей инфекций, передающихся половым путем (ИППП) на фоне инфицирования вирусами папилломы человека (ВПЧ) и развития дисбиотических состояний у женщин с опухолевыми и инфекционно-воспалительными заболеваниями репродуктивных органов.

Материал и методы исследования. Исследовали мазки из влагалища и цервикального канала у женщин с воспалительными и гиперпластическими процессами, обратившимися за помощью в клинико-диагностическое отделение ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России. Выделение ДНК проводили с использованием набора реагентов «АмплиПрайм® ДНК-сорб-АМ», амплификацию и детекцию ДНК проводили методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени с использованием наборов реагентов производства ЦНИИЭ Роспотребнадзора. Всего обследовано 390 женщин.

Результаты исследования и их обсуждение. Средняя частота выявления ДНК *C.trachomatis* составила 1,8%, *U.parvum/U.urealyticum* – 50,9%, *M.hominis* – 11,5%, *M.genitalium* – 1,1%, *T.vaginalis* – 1,4%, *G.vaginalis* – 46,3%, *C.albicans* – 17,0%, *CMV* – 14,0%, *HSV 1,2* – 1,3%.

В ходе исследования у женщин с гиперпластическими процессами в репродуктивных органах, по сравнению с группой пациенток с воспалительными заболеваниями, было установлено некоторое преобладание частоты инфицирования *M.genitalium* (2,6% против 0,9%, а при доброкачественных процессах 12,5% против 0,9%) и *HSV 1,2* (3,1% против 0,9%, а при доброкачественных процессах 14,3% против 0,9%). Частота инфицирования *C.trachomatis* наибольшей была у больных с миомой матки и составила 12,5% против 1,8% у больных с инфекционно-воспалительными заболеваниями. Отмечено, что у 60,0% больных, инфицированных *C.trachomatis,* была обнаружена ДНК и других возбудителей ИППП. Так, у 20,0% больных выявлена ДНК трех возбудителей (*C.trachomatis, U.parvum/U.urealyticum* и *HPV*), у 20,0% – четырех возбудителей (*C.trachomatis, M.genitalium, G.vaginalis* и *CMV*), у 20,0% – пяти возбудителей (*C.trachomatis, U.parvum/U. urealyticum, G.vaginalis, C.albicans* и *HPV*).

Другие возбудители, напротив, реже выявлялись у пациенток с опухолевыми процессами. Так, ДНК *G.vaginalis* в этой группе была выявлена у 32,8%, а при воспалительных заболеваниях у 49,4% больных, *U.parvum/U. urealyticum* у 44,7% и 51,8%, *M.hominis* у 7,9% и 12,1%, *CMV* у 5,3% и 16,0%, *C.albicans* у 7,9% и 18,6% соответственно. ДНК *T.vaginalis* в нашем исследовании были обнаружены только у женщин с воспалительными заболеваниями урогенитального тракта (1,8%).

Нам представилось интересным сравнить частоту инфицирования различными возбудителями ИППП женщин в пре- и постменопаузальном периоде. Считается, что основой дистрофических изменений при менопаузе служит эстрогенная недостаточность. Отсутствие эстрадиола приводит к истончению или полному исчезновению поверхностного пласта гликогенсодержащих клеток многослойного плоского эпителия, редукции сосудистой системы многослойного плоского эпителия, что приво-

дит к значительному увеличению частоты микротравм, трещин и мацераций кожи и слизистых наружных половых органов. Возникшие изменения создают благоприятный фон для размножения патогенной и условно-патогенной микрофлоры, вызывающей длительно текущие, хронические воспалительные процессы. Однако, в нашем исследовании, данная закономерность была отмечена только в отношении облигатно-патогенных возбудителей. Так, ДНК *C.trachomatis* у женщин в возрасте до 45 лет вне зависимости от диагноза была обнаружена только в 2%, а после 45 лет – в 25%, ДНК *M.genitalium* в 1% и 2%, а ДНК *HSV 1,2* в 0% и 2% соответственно. В отношении условно-патогенных возбудителей, таких как *U.parvum/U. urealyticum*, *M.hominis*, *G.vaginalis* подобных закономерностей в нашем исследовании установлено не было. Так, ДНК *U.parvum/U.urealyticum* у женщин в пременопаузе была выявлена в 57% случаев, а в постменопаузе – в 40%, ДНК *M.hominis* в 14% и 7%, а ДНК *G.vaginalis* в 54% и 34% соответственно.

Далее мы сравнили частоту развития дисбиотических состояний у женщин в обследуемых группах. Исследования проводили с использованием теста «АмплиПрайм® Флороценоз-Бактериальный вагиноз», позволяющего оценить общее количество бактерий, количество *Lactobacillus spp*., *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae*. У всех больных с гиперпластическими процессами женских репродуктивных органов отмечено снижение количества общей бактериальной массы и лактобактерий, а у 25% из них зарегистрировано состояние бактериального вагиноза. На фоне снижения общего количества бактерий у 66,7% пациенток выявлены различные возбудители ИППП, а у 33,3% – ВПЧ. Частота установления баквагиноза по данным лабораторных исследований у пациенток с воспалительными заболеваниями была сопоставила с частотой возникновения этого состояния у больных с гиперпластическими процессами и составила 26,2%. Однако, другие дисбиотические состояния у больных в инфекционно-воспалительными заболеваниями были установлены лишь у 21,4%, у 52,4% женщин отмечено нормальное состояние микрофлоры влагалища.

Заключение. У пациенток с опухолевыми заболеваниями органов репродуктивной системы, по сравнению с воспалительными, чаще были обнаружены облигатно-патогенные возбудители, а также различные нарушения микробиоценоза. Выявленные различия в частоте инфицирования возбудителями ИППП и развитии дисбиотических состояний у женщин с воспалительными заболеваниями и гиперпластическими процессами подтверждают гипотезу о возможном участии микрофлоры в процессах онкогенеза в качестве ко-фактора или триггера.

ИЗУЧЕНИЕ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ШТАММОВ *MYCOPLASMA GENITALIUM,* УСТОЙЧИВЫХ К МАКРОЛИДАМ, В МОСКВЕ

Хайруллина Г.А., Махова Т.И., Гущин А.Е.

ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение. *Mycoplasma genitalium* – бактерия, передаваемая половым путем, часто является причиной возникновения негонококковых нехламидийных уретритов у мужчин и ассоциирована с цервицитами, воспалительными заболеваниями органов малого таза у женщин. Наиболее распространенной первой линией терапии для эрадикации *M.genitalium* по всему миру являются макролиды: азитромицин в Европе и США и джозамицин в России. Но за последние 5 лет наблюдается катастрофическое снижение эффективности эрадикации *M.genitalium* макролидами – в некоторых регионах Европы эффективность снижается на 5-10% в год.

*П*ричиной неудач в лечении *M.genitalium* является появление мутаций в домене гена 23S рРНК, в положениях преимущественно в 2058, 2059 (нумерация по *Escherichia coli*). Мутантный генотип *M.genitalium м*ожет присутствовать как до лечения, так и образоваться в процессе в ответ на действие антибиотика, что приводит к формированию хронического рецидивирующего процесса. На сегодняшний день в Европейских странах доля таких штаммов *M.genitalium* варьирует от 18 до 80%, что послужило толчком к изменениям в рекомендациях по алгоритму обследования и лечения *M.genitalium*. Международные рекомендаций IUSTI по ведению пациентов с инфекцией, вызванной *M.genitalium,* предлагают проводить исследования по выявлению штаммов *M.genitalium*, устойчивых к действию макролидов при обнаружении *M.genitalium* и до начала антибиотикотерапии. Выявление мутантного генотипа *M.genitalium* предполагает изменения схемы лечения с макролидов (азитромицин) на фторхинолоны (моксифлоксацин).

Ранее для нашей страны показано наличие мутаций устойчивости в гене 23S рРНК *M.genitalium* как указанных выше, так и не описанных в других странах в положении 2062 в ответ на лечение джозамицином.

Цель. Выявление распространенности штаммов *M.genitalium*, несущих мутации устойчивости к действию макролидов, среди пациентов клиник г Москвы.

Материалы и методы. *Н*аличие мутаций устойчивости *M.genitalium* к макролидам проводили на *о*бразцах от пациентов обоих полов, обратившихся в клиники Москвы в марте-сентябре 2016 года. Выделение ДНК из образцов проводили с помощью набора реагентов «ДНК-Сорб-АМ» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) с последующим исследованием с помощью набора реагентов «АмплиПрайм®-NCMT». Образцы ДНК, содержащие *M.genitalium*, тестировали с помощью разработанной методики для определения принадлежности штамма к дикому или мутантному типу. Все результаты, полученные с использованием разработанной методики, подтверждали методом секвенирования по Сэнгеру. Выявление достоверности различий групп относительно распространенности мутантных генотипов *M.genitalium* выполняли двусторонним точным тестом Фишера с по-

мощью программного обеспечения GraphPad QuickCalcs (http://graphpad.com/quickcalcs/contingency1.cfm). При значении p-value (p) ≤ 0,05 различие групп считали достоверным.

Результаты. В исследование было включено 765 образцов биологического материала. Средний возраст пациентов составил 31,6±5,7 лет среди мужчин и 28,7±5,1 лет среди женщин. Распространенность генотипов *M.genitalium*, содержащих мутации устойчивости к действию макролидов в исследуемой выборке составила 5,23% (40 случаев). Распространённость мутантных штаммов среди женщин составила 4,3% (21), среди мужчин – 6,9% (19), хотя достоверных отличий между группами выявлено не было p = 0,32.

Последующее секвенирование продуктов амплификации фрагмента гена 23S рРНК подтвердило полученные результаты. Для 725 образцов было показано наличие дикого типа *M.genitalium*, среди остальных образцов было выявлено 5 различных типов мутаций устойчивости к действию макролидов (Таблица 1). В исследуемой выборке, как и в разных странах по всему миру, наиболее распространенными мутациями оказали замены A2059G и A2058G. Также были обнаружены два образца с мутацией, описанной только для нашего региона, A2062G.

Таблица 1. Распространенность различных типов мутаций V домена гена 23S рРНК *M.genitalium,* приводящих к появлению устойчивости к действию макролидов у этого микроорганизма

Мутация	Кол-во выявленных случаев	Распространенность, %
A2059G	26	3,40
A2058G	10	1,31
A2058T	1	0,13
A2058C	1	0,13
A2059T	0	0,00
A2059C	0	0,00
A2062T	0	0,00
A2062G	2	0,26

Заключение. Полученные результаты демонстрируют показатели распространенности штаммов *M.genitalium*, содержащих мутации устойчивости к макролидам, в Москве на уровне 5,23%, что существенно ниже, чем в странах Европы, США и Австралии. Регулярное проведение исследований по молекулярно-биологическому мониторингу позволит контролировать уровень распространенности мутантных генотипов *M.genitalium* на территории РФ.

ИЗУЧЕНИЕ ЭТИОЛОГИИ УРЕТРИТА И БАЛАНОПОСТИТА У МУЖЧИН

Хайруллина Г.А.[1], Ким Д.Г.[2], Головешкина Е.Н.[1], Гомберг М.А.[3], Гущин А.Е.[1]

[1] ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

[2] Городской Фонд ДНК-исследований, Москва, Россия

[3] Московский научно-практический центр дерматологии и косметологии Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия

Введение. Уретрит - наиболее распространенный клинический синдром у мужчин, обращающихся за дерматовенерологической и урологической помощью. В качестве этиологических агентов уретрита в первую очередь рассматриваются возбудители ИППП - *N.gonorrhoeae, C.trachomatis, M.genitalium, T.vaginalis,* HSV1,2. Но в 20-50% случаев уретрита указанные возбудители отсутствуют, в этом случае уретрит рассматривается как идиопатический или неспецифический. Вторым по частоте клиническим синдромом мужчин является баланопостит – воспаление головки полового члена и крайней плоти. Согласно современным представлениям этиологией баланопоститов являются некоторые из возбудителей ИППП - *M.genitalium, T.vaginalis, HSV1,2,* представители анаэробной микробиоты, в первую очередь ассоциированные с бактериальным вагинозом (БВ), аэробные микроорганизмы, и грибы рода Candida. В некоторых случаях причины воспаления уретры у мужчин могут носить неинфекционный характер: травматический, аллергический, обменный, конгестивный, а головка полового члена и крайняя плоть может поражаться при целом ряде кожных заболеваний, или быть отражением некоторых предраковых состояний. В последнее время особый интерес вызывает возможная связь бактерий, ассоциированных с бактериальным вагинозом (БВ) у женщин - *Leptotrichia/Sneathia spp, A.vaginae, Megasphaera spp, BVAB2,3, G.vaginalis,* с воспалением в урогенитальном биотопе у мужчин. Частота и роль отдельных условно-патогенных микроорганизмов до конца не изучена. Установление этиологического фактора воспаления в уретре и на головке полового члена у

мужчин влияет на выбор адекватного этиотропного лечения и способствует повышению его эффективности.

Цель. Изучить роль анаэробных и аэробных микроорганизмов в развитии идиопатических уретритов и баланопоститов у мужчин.

Материалы и методы. В исследование вошли образцы соскобного материала из уретры мужчин, обратившихся на прием к дерматовенерологу, из которых выделялась ДНК для последующего ПЦР-исследования на наличие различных микроорганизмов. Оценку лабораторных признаков уретрита проводили на основании микроскопии по Граму. Выявление возбудителей ИППП проводили использованием наборов реагентов для ПЦР «АмплиПрайм®-NCMT» и «АмплиСенс® HSV I, II-FL» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора). Все образцы были дополнительно исследованы на наличие ДНК с определением концентрации генитальных микоплазм (*U.parvum, U.urealyticum, M.hominis*), аэробных бактерий (*Enterobacteriaceae spp, Staphylococcus spp, Streptococcus spp*), анаэробных бактерий, ассоциированных с бактериальным вагинозом (*G.vaginalis, A.vaginae, BVAB2,3, Megasphaera spp, Leptotrichia/Sneathia spp*) и грибов рода *Candida*.

Результаты. В исследование было включено 114 мужчин, средний возраст составил 35,8±8,1 лет, из них: у 66 (57,8%) имелись симптомы уретрита и\или баланопостита, а 48 человек (33.2%) обратились с целью профилактического обследования. Из 66 пациентов, обратившихся с жалобами, 14 (21,2%) имели клинические симптомы уретрита, 22 (33,3%) – клинические симптомы баланопостита, 30 (45,4%) - одновременно и уретрита и баланопостита. По результатам обследования у 114 мужчин диагноз уретрит был установлен у 31 пациента (из них специфической этиологии у двух), баланопостит у 20 (ни одного случая со специфической этиологией) и сочетанная патология (уретрит и баланопостит) - у 32 мужчин (из них 6 имели специфическую этиологию). Среди пациентов с ИППП - 6 человек (75%) имели клинические и лабораторные критерии уретрита и баланопостита, и 2 (25%) - только уретрита.

Для анаэробных ассоциированных с БВ микроорганизмов (G.*vaginalis, A.vaginae, BVAB2,3, Megasphaera spp, Leptotrichia/Sneathia spp*) в группах пациентов с уретритом, баланопоститом и смешанной (одновременно уретрит и баланопостит) достоверные отличия от нормы были показаны только по распространенности *G.vaginalis* (Таблица 1) p=0,0448, p=0,0042, p=0,0001, соответственно. Для остальных микроорганизмов, ассоциированных с БВ, а также для генитальных микоплазм (*U.parvum, U.urealyticum, M.hominis*) достоверных отличий по распространенности в группах не показано. При оценке роли аэробных микроорганизмов достоверные отличия распространенности были установлены для *Enterobacteriaceae spp* и *Streptococcus spp,* p=0,0169 и 0,0448, между контрольной группой и пациентами с баланопоститом. Также в группе образцов от пациентов с баланопоститом выявлено достоверное отличие в распространенности грибов рода *Candida*, p=0,0085.

Таблица 1. **Распространённость условно-патогенных микроорганизмов при различных синдромах**

Флора мужчин	Количество случаев, n (%)			
	Контроль (31)	Уретрит (29)	Баланопостит (20)	Баланопостит+ Уретрит (26)
G.vaginalis	5 (16,13)	12 (41,38)	15 (75,00)	20 (76,92)
A.vaginae	0 (0,00)	1 (3,45)	3 (15,00)	12 (46,15)
BVAB2	0 (0,00)	1 (3,45)	4 (20,00)	3 (11,54)
BVAV3	0 (0,00)	1 (3,45)	1 (5,00)	1 (3,85)
Megasphaera spp	1 (3,23)	1 (3,45)	3 (15,00)	6 (23,08)
Leptotrichia/ Sneathia spp	2 (6,45)	3 (10,34)	8 (40,00)	7 (26,92)
U.parvum	5 (16,13)	8 (27,59)	4 (20,00)	12 (46,15)
U.urealyticum	0 (0,00)	1 (3,45)	0 (0,00)	2 (7,69)
M.hominis	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (5,00)	2 (7,69)
Staphylococcus spp	14 (45,16)	17 (58,62)	18 (90,00)	14 (53,85)
Streptococcus spp	24 (77,42)	20 (68,97)	14 (70,00)	19 (73,08)
Enterobacteriaceae spp	20 (64,52)	22 (75,86)	19 (95,00)	20 (76,92)
Candida spp	1 (3,23)	1 (3,45)	8 (40,00)	1 (3,85)

Заключение. Возникновение и развитие идиопатических уретритов и баланопоститов может быть связано со множеством факторов в том числе и с появлением условно-патогенной микрофлоры. Более частое обнаружение *G.vaginalis* у пациентов с уретритами и баланопоститами, может говорить о возможной роли этого микроорганизма в развитии заболевания, а обнаружение *Enterobacteriaceae spp, Streptococcus spp* и грибов рода *Candida* на поверхности головки полового члена может быть признаком баланопостита.

ЛАКТОБАЦИЛЛЫ ВЛАГАЛИЩА В НОРМЕ И ПРИ ДИСБИОТИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ

Будиловская О.В., Шипицына Е.В., Савичева А.М.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Введение

Состав вагинального биотопа является индикатором репродуктивного здоровья женщины. У здоровых женщин детородного возраста вагинальная микрофлора представлена, в основном, лактобациллами. Эстрогензависимая способность лактобацилл к адгезии на эпителиальных клетках влагалища, продукция ими перекиси водорода, молочной кислоты и антибиотикоподобных веществ обеспечивают барьерную функцию, препятствуя размножению условно-патогенных и появлению чужеродных микроорганизмов. Ранее в качестве доминирующего вида вагинальной микробиоты рассматривали вид *Lactobacillus acidophilus.* Позже, секвенируя ген 16S rRNA, удалось выявить, что *L. acidophilus* представляет собой комплекс, включающий несколько видов вагинальных лактобацилл: собственно *L. acidophilus, L. crispatus, L. gasseri, L. jensenii, L. iners, L. johnsoni* и некоторые другие. Но не все лактобациллы способны обеспечивать надежную защиту женского организма. Большинство исследователей указывает на явное преобладание *L.crispatus* в биотопе здоровых женщин, в то время как *L. gasseri* и *L. iners* чаще встречаются у женщин с бактериальным вагинозом. Однако частота встречаемости *L. iners* в качестве доминирующего вида при нормоценозе также не редкость.

Цель исследования

Охарактеризовать видовой и количественный состав лактобациллярной микрофлоры влагалища женщин детородного возраста в норме и при дисбиозе.

Материалы и методы

Обследуемую популяцию составили амбулаторные пациентки поликлинических отделений ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта». Клинический материал (отделяемое влагалища) был получен от 123 женщин в возрасте от 15 до 54 лет (среднее значение 32 года) и протестирован методом количественной ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени с помощью тест-системы Фемофлор-16 (ДНК-технология, Москва) и тест-системы для исследовательских целей, позволяющей определить семь наиболее распространенных видов вагинальных лактобацилл (*L. crispatus, L. iners, L. jensenii, L. gasseri, L. johnsonii, L. vaginalis и L. acidophilus*) (ДНК-технология, Москва).

Основные результаты

По результатам теста Фемофлор-16 у 65 женщин микробиоценоз влагалища был охарактеризован как нормоценоз, у 14 – условный нормоценоз, у 21 – умеренный дисбиоз, у 23 – выраженный дисбиоз. Наиболее часто выявлялся вид *L. jensenii* (у 53 женщин, 43%), за ним следовали *L. iners* (у 51 женщины, 41%), *L. crispatus* и *L. vaginalis* (каждый у 49 женщин, 40%), *L. gasseri* (у 44 женщин, 36%), *L. johnsonii* (у 32 женщин, 26%) *L. acidophilus* (у 17 женщин, 14%). При нормоценозе превалирующим по частоте был вид *L. crispatus* (57%), при условном нормоценозе чаще других выявляли вид *L. vaginalis* (71%), при умеренном дисбиозе – *L. gasseri* (67%), при выраженном дисбиозе – *L. iners* (39%).

Для изучения различий в видовом и количественном составе лактобациллярной микрофлоры при нормальном и дисбиотическом состояниях влагалища все женщины были разделены на две группы – с нормальным и нарушенным микробиоценозом. В группу с нормальным микробиоценозом вошли женщины с нормоценозом и условным нормоценозом, в группу с нарушенным микробиоценозом – женщины с умеренным и выраженным дисбиозом влагалища.

Количество видов лактобацилл, выявляемых у одной женщины, варьировало от 1 до 6. У 34 женщин был выявлен один вид лактобацилл (из них у 15 – с нормальным микробиоценозом, у 19 – с нарушенным микробиоценозом влагалища). У 89 женщин присутствовали два и более видов лактобацилл (из них у 64 – с нормальным микробиоценозом, у 25 – с нарушенным микробиоценозом). Видовое разнообразие лактобацилл (выявление ≥2 видов) наблюдалось значительно чаще у женщин с нормальным микробиоценозом в (64 из 79, 81%), чем у женщин с нарушенным микробиоценозом влагалища (25 из 44, 57%) (p=0,004).

Учитывая, что большинство проб содержали несколько видов лактобацилл, был проведен сравнительный анализ частоты видов лактобацилл в норме и при дисбиозе после определения доминирующего вида в каждом образце. Доминирующим считали вид, концентрация которого относительно общей концентрации лактобацил-

Таблица. Сравнение частоты выявления видов лактобацилл (по доминирующему виду) при нормальном и нарушенном микробиоценозе влагалища

Вид лактобацилл	Число женщин (%)			Значение *p*
	Все женщины (*n*=118)	Женщины с нормальным микробиоценозом влагалища (*n*=78)	Женщины с нарушенным микробиоценозом влагалища (*n*=40)	
L. iners	41 (35)	28 (36)	13 (33)	0,714
L. crispatus	35 (30)	34 (44)	1 (3)	0,000
L. jensenii	14 (12)	5 (6)	9 (23)	0,011
L. gasseri	29 (25)	12 (15)	17 (43)	0,001
L. acidophilus	1 (1)	1 (1)	0 (0)	0,472

лярной микрофлоры составляла 50% и более. *L. iners* были доминирующим видом у 41 женщины, *L. crispatus* – у 35 женщин, *L. jensenii* – у 14 женщин, *L. gasseri* – у 29 женщин, *L. acidophilus* – у 1 женщины (табл.), при этом у двух женщин доминирующими были признаны два вида лактобацилл – *L. iners* и *L. crispatus,* так как их содержание было равным. В 5 образцах относительная концентрация всех изучаемых видов была существенно ниже 50%, поэтому эти образцы были исключены из данного анализа. *L. crispatus* как доминирующий вид значительно чаще выявлялась в норме, чем при дисбиозе влагалища, тогда как *L. jensenii* и *L. gasseri* значительно чаще обнаруживались при дисбиозе влагалища, чем в норме (табл.). Для *L. iners* и *L. acidophilus* статистически значимых различий между группами не выявлено. *L. johnsonii* и *L. vaginalis* ни в одном образце не были доминирующими видами, и показатели их максимального содержания составили 2 и 6%, соответственно.

Выводы

Наиболее распространенными видами лактобацилл являются *L. jensenii*, *L. iners*, *L. crispatus* и *L. gasseri*. Видовое разнообразие лактобацилл (выявление ≥2 видов) наблюдается значительно чаще у женщин с нормальным микробиоценозом, чем у женщин с дисбиозом влагалища. Наше исследование подтверждает, что *L. crispatus* является доминирующим видом вагинального биотопа здоровых женщин.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИЙ, ПРИВОДЯЩИХ К НАРУШЕНИЮ РЕПРОДУКТИВНЫХ ФУНКЦИЙ ЧЕЛОВЕКА, С ОДНОВРЕМЕННЫМ АНАЛИЗОМ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ

Лейнсоо А.Т.[1], Шаскольский Б.Л.[1], Дементьева Е.А.[1], Петрова Н.П.[2], Честков А.В.[2], Образцова О.А.[2], Шпилевая М.В.[2], Дерябин Д.Г.[2], Грядунов Д.А.[1]

[1] Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН), Москва, Россия

[2] ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Введение. Инфекции, приводящие к нарушению репродуктивных функций (ИПНРФ), могут быть представлены как облигатными патогенами (*Neisseria gonorrhoeae, Treponema pallidum, Mycoplasma genitalium*), так и различными оппортунистическими микроорганизмами (*Atopobium vaginae, Bacteroides fragilis, Gardnerella vaginalis, Mycoplasma hominis, Ureaplasma sp.* и др.), многие из которых не относятся к передающимся половым путём. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) ежегодное число новых случаев ИПНРФ в мире оценивается приблизительно в 500 млн., среди которых 106,1 млн. составляет гонорея, 105,7 млн. – хламидийная инфекция и 10,6 млн. – сифилис. Этиология ИПНРФ часто носит полимикробный характер, что усугубляет клиническую картину заболевания, снижает специфичность диагностики и в итоге может привести к назначению неадекватной терапии.

Другой глобальной проблемой, отмеченной ВОЗ, является рост числа лекарственно-устойчивых микроорганизмов, что вызывает значительные затруднения при выборе методов лечения. В настоящее время отмечено появление изолятов *N. gonorrhoeae*, резистентных ко всем основным препаратам, применяемым для лечения гонореи – β-лактамным антибиотикам, фторхинолонам, макролидам, тетрациклинам, спектиномицину, азитромицину и цефалоспоринам. Среди других ИПНРФ также наблюдается распространение резистентных форм: так, для *T. pallidum* отмечен рост устойчивости к макролидам, а для *M. genitalium* – к фторхинолонам, главным образом, вследствие появления мутаций в гене *parC*.

Цель/задачи. Разработка метода идентификации актуального спектра возбудителей ИПНРФ с одновременным анализом генетических маркеров антибиотикорезистентности.

Материалы и методы. Разработан молекулярный метод на основе технологии гидрогелевых микрочипов ИМБ РАН. Микрочип содержит иммобилизованные олигонуклеотидные зонды, соответствующие видоспецифичному полиморфизму гена 16S рРНК для идентификации микроорганизмов, а также зонды, специфичные к последовательностям генов *rrs*, *rrl*, *gyrA*, *parC*, *mefA*, *mtrR*, *nimB-G*, *penA*, *ponA*, *porB*, *rpsJ*, *ntr4tv*, *ntr6tv*, *blaSHV*, *blaTEM*, *tetM*, являющихся детерминантами резистентности возбудителей ИПНРФ к β-лактамным антибиотикам, включая цефалоспорины, макролидам, аминогликозидам, тетрациклинам, спектиномицину, фторхинолонам и нитроимидазолам. Процедура анализа включала мультиплексную ПЦР с одновременным флуоресцентным маркированием исследуемых сегментов геномов с последующей гибридизацией на микрочипе. В качестве референсных тестов использовали методы культивирования микроорганизмов посредством серийных разведений в агаре в соответствии с критериями CLSI и EUCAST на предмет чувствительности к антибиотикам, ПЦР в реальном времени, таргетное секвенирование и тест-системы *Mycoplasma* IST2 (bioMérieux, Франция) и *Mycoplasma* SIR (Bio-Rad, США).

Основные результаты. Разработанный микрочип позволяет выявлять 12 различных облигатных и условно-патогенных микроорганизмов – *N. gonorrhoeae*, *T. pallidum*, *M. genitalium, A. vaginae*, *B. fragilis*, *Fusobacterium nucleatum*, *G. vaginalis*, *Mobiluncus mulieris*, *M. hominis*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma parvum* и *Ureaplasma urealyticum* с дифференцированным анализом 39 генетических детерминант устойчивости к β-лактамным антибиотикам, макролидам, аминогликозидам, тетрациклинам, спектиномицину, фторхинолонам и нитроимидазолам. Диагностические чувствительность и специфичность

метода, рассчитанные по результатам анализа 189 образцов ДНК возбудителей ИПНРФ, превысили 95% при определении возбудителей ИПНРФ.

С использованием разработанного подхода исследовано ДНК 128 изолятов *N. gonorrhoeae*. Более трети анализируемых штаммов (55 изолятов, 43%) обладали множественными детерминантами устойчивости. В большинстве случаев наличие фенотипической устойчивости *N. gonorrhoeae* к антимикробным препаратам коррелировало с сочетанием ряда мутаций в анализируемых детерминантах. В частности, изолятам с мутациями $gyrA_{S83F+D87G}$ и $parC_{S80R}$ соответствовали устойчивые к ципрофлоксацину фенотипы. Значительная доля образцов, устойчивых к тетрациклинам, имела комбинацию мутаций $mtrR_{-35delA}$ и $rpsJ_{V57M}$. Изоляты, резистентные к пенициллину, несли, как правило, сочетания мутаций $penA_{insD345}$, $ponA_{L421P}$ и $mtrR_{-35delA}$. Существенный вклад в современную эволюцию *N.gonorrhoeae*, заключающуюся в прогрессирующем снижении чувствительности к цефалоспоринам III поколения, вносят мутации в генах *penA* и *ponA*, ассоциированные с устойчивостью к пенициллинам.

Большая часть (31 из 32) клинических изолятов *T. pallidum,* проанализированных на микрочипе, была отнесена к категории дикого типа, что согласуется с ранее полученными данными о низкой частоте распространения генетических детерминант резистентности к антибиотикам в российской популяции возбудителя сифилиса.

Исследование выборки из 29 клинических изолятов *Ureaplasma spp*. с использованием коммерчески доступных тест-систем *Mycoplasma* IST2 и *Mycoplasma* SIR выявляло в ней 11 культур (38%), демонстрирующих различную степень устойчивости к макролидам (эритромицину, азитромицину, джозамицину) и 12 культур (41%) – к фторхинолонам при абсолютной чувствительности к тетрациклинам. В то же время высокая эффективность видовой идентификации данных возбудителей ИПНРФ на чипе не сопровождалась выявлением анализируемых детерминант резистентности, что вступало в определенное противоречие с результатами фенотипического анализа. Причины подобной ситуации требуют своего дополнительного исследования, в том числе связанного с расширением спектра анализируемых полиморфизмов целевых генов, а также поиском новых детерминант резистентности *Ureaplasma spp. / Mycoplasma spp.* к антимикробным препаратам.

Заключение/выводы. Разработанный метод является перспективным инструментом персонализированной диагностики ИПНРФ, позволяющим устанавливать видовую принадлежность возбудителей и анализировать генетические маркеры устойчивости к различным классам антимикробных препаратов. Дальнейшее развитие предложенного подхода, связанное с расширением спектра детектируемых возбудителей ИПНРФ и анализируемых маркеров их резистентности, а также проведением развернутых клинико-лабораторных испытаний биочипа, должно позволить на единой технологической платформе решать весь спектр задач лабораторной диагностики данной этиологически разнообразной и часто резистентной к терапии группы заболеваний. Работа выполнена при поддержке Программы ФНИ государственных академий на 2013 - 2020 годы (№ подтемы 0103-2014-003).

РЕЗУЛЬТАТЫ СКРИНИНГА ЖЕНЩИН, ПОДЛЕЖАЩИХ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОМУ МЕДИЦИНСКОМУ ОБСЛЕДОВАНИЮ НА ИППП И СОПУТСТВУЮЩИЕ УРОГЕНИТАЛЬНЫЕ ИНФЕКЦИИ

Махова Т.И.[1], Анисимова Н.С.[1], Головешкина Е.Н.[1], Кисина В.И.[2], Гущин А.Е.[1]

[1]ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

[2]Московский научно-практический центр дерматовенерологии и косметологии Департамента здравоохранения Москвы. Филиал «Клиника им. В.Г. Короленко», Москва, Россия

Введение. Для женщин репродуктивного возраста большое значение имеют инфекции, передаваемые половым путем (ИППП) и различные нарушения баланса микрофлоры влагалища (НБМВ). Такие ИППП, как гонококковая, трихомонадная, хламидийная инфекции и *M.genitalium*-инфекция, а также НБМВ: бактериальный вагиноз (БВ), аэробный вагинит (АВ), кандидозный вульвовагинит (КВВ) могут приводить к развитию серьезных репродуктивных осложнений. Наиболее тяжелыми осложнениями являются воспалительные заболевания органов малого таза (ВЗОМТ), неблагоприятные исходы беременности, бесплодие, инфицирование новорожденных. При этом у значительного числа женщин ИППП и вагинальные инфекции, обусловленные НБМВ, протекают субъективно асимптомно.

Для выявления патологических состояний, заболеваний и факторов риска их развития в РФ проводится профилактическое медицинское обследование, которое регламентируется федеральными законами №323 РФ и №52 РФ, трудовым кодексом РФ и приказом № 302н МЗ РФ. В соответствии с данными документами для скрининга урогенитальных инфекций рекомендуется бактериологическое исследование биологического материала органов мочеполовой системы на микрофлору и бактериоскопическое исследование на гонококковую инфекцию (последнее – лишь для некоторых категорий работников). Данные методы диагностики не позволяют выявить *C.trachomatis* (CT) и *M.genitalium* (MG) и имеют более низкую диагностическую эффективность по сравнению с молекулярно-биологическими методами (МБМ), вследствие чего значительное число НБМВ и ИППП остаются не выявленными.

Бессимптомное течение заболеваний (30 - 70%) и отсутствие официального статистического учета для ряда заболеваний (БВ, АВ и *M.genitalium*-инфекция) также являются важными проблемами ИППП и НБМВ.

Цель. Изучение распространенности ИППП и НБМВ у небеременных пациенток, подлежащих профилактическому медицинскому обследованию.

Материалы и методы. Обследованы женщины (461 пациентка) в возрасте от 18 до 45 лет, подлежащие профилактическому медицинскому обследованию на базе Филиала «Клиника им. В.Г. Короленко» в период с января по август 2014 года. На каждую пациентку оформлялась анкета с анамнестическими данными и результатами клинического обследования, осуществлялось получение биологического материала из влагалища для проведения микроскопического исследования и ПЦР в реальном времени. В лаборатории филиала проводили микроскопическое исследование с окраской по Граму на наличие грамотрицательных диплококков (*N.gonorrhoeae* (NG)), *T.vaginalis* (TV), «ключевых» клеток и маркеров микотической инфекции (*Candida spp*.). В ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора проводили тестирование образцов на наличие ИППП (NG, CT, TV, MG) и на различные НБМВ (основные маркеры БВ, АВ и КВВ) с использованием наборов реагентов «ДНК-Сорб-АМ», «АмплиПрайм® NCMT», «АмплиСенс® Флороценоз / Бактериальный вагиноз-FL», «АмплиСенс® Флороценоз / Аэробы-FL», «АмплиСенс® ФлороЦеноз / Кандиды-FL».

Результаты.

По полученным результатам ПЦР-исследования каждой пациентке выдавалось заключение: «норма» (при отсутствии ДНК ИППП и маркёров БВ, АВ, КВВ), «результат соответствует БВ» (при выявлении высокой концентрации ДНК *G.vaginalis* и/или *A.vaginae*, равной или превышающей концентрацию лактобактерий), «преобладание аэробной микрофлоры» (ПАМ) (при выявлении высокой концентрации ДНК аэробных микроорганизмов (энтеробактерии, стрептококки, стафилококки), равной или превышающей концентрацию лактобактерий) и «относительный баланс микрофлоры» (ОБМ) (при обнаружении одного из видов *Candida* или при наличии концентраций *G.vaginalis* и/или *A.vaginae*, не превышающих концентрацию лактобактерий); при выявлении ДНК ИППП врачом-дерматовенерологом устанавливался соответствующий диагноз: хламидийная, гонококковая, трихомонадная инфекция, и/или инфекция, вызванная *M.genitalium* – инфекция.

Обследованные пациентки (461 женщина, средний возраст 34,6 ± 5,6 лет) были разделены на 2 группы. Первую группу - 19 (4,2%) женщин составили пациентки, у которых имелись субъективные симптомы урогенитальных заболеваний: влагалищные выделения, зуд/жжение в области наружных половых органов, боль в нижней части живота. Во вторую группу вошла большая часть обследованных женщин - 442 (95,8%), которые не предъявляли жалоб.

С помощью метода ПЦР у 18 из 19 (95%) женщин первой группы были выявлены различные НБМВ, в то время как микроскопическим методом никаких отклонений от нормы у этих пациенток выявлено не было (*Таблица)*.

Во второй группе обследованных у 292 женщин (66,1%) были обнаружены: ИППП у 9 (2%) , «БВ» - у 164 (35,6%), «ПАМ» - у 41 (8,9%) и «ОБМ» - 98 (21,3%) пациенток.

Среди всех случаев ИППП моно-инфекция была выявлена у 8 пациенток, а микст-инфекция у 1: CT - в 4 (0,9%) образцах, TV- в 3 (0,7%), MG - в 1 (0,2%) и 1 (0,2%) – TV+MG. Микроскопический анализ, так же как и в 1 группе, не выявил лабораторных признаков ИППП и НБМВ.

Обращает на себя внимание тот факт, что распространенность БВ незначительно отличается у симптоматичных (36,8%) и бессимптомных пациенток (37,1%), а ПАМ в группе бессимптомных даже выше в 1,75 раза по сравнению симптоматичными пациентками.

Выводы. Большая часть женщин (95,8%), подлежащих профилактическому медицинскому обследованию не имеют жалоб и клинических проявлений урогенитальной инфекционной патологии на фоне нормальных результатов микроскопического исследования. При этом у большинства (66%) таких пациенток имеются объективные лабораторные признаки различных нарушений баланса микрофлоры влагалища, а также ИППП, установленные с помощью ПЦР. Полученные данные свидетельствуют о необходимости внедрения молекулярно-биологических методов, как более чувствительных, для скрининга населения на наличие НБМВ и ИППП.

Таблица. Число случаев выявленных ИППП и НБМВ

	Всего	ИППП	ИППП+БВ	БВ	БВ+ ПАМ	ПАМ	ОБМ	«Норма»
С жалобами	19	-	-	7	-	1	10	1
	4,2%			36,8%		5,3%	52,6%	5,3%
Без жалоб	442	4	5	144	15	26	98	150
	95,8%	0,9%	1,1%	32,6%	3,4%	5,9%	22,2%	33,9%

ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИППП У ЖЕНЩИН ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СОСТОЯНИЯХ ВАГИНАЛЬНОЙ МИКРОБИОТЫ

Махова Т.И., Гущин А.Е.

ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение. Инфекции, передаваемые половым путем (ИППП) – социально значимые инфекции, являющиеся причиной целого ряда осложнений репродуктивной системы человека, патологий беременности и заболеваний новорожденных. Изучение факторов, способствующих поддержанию эпидемического процесса ИППП, представляет собой важную задачу профилактики этих инфекций. В целом ряде зарубежных исследований было показано, что одним из факторов, способствующих инфицированию ИППП, является нарушения микробиоты влагалища (НМВ), прежде всего бактериальный вагиноз (БВ). Женщины с БВ имеют повышенный риск инфицирования *T.vaginalis* (TV) [1] и *M.genitalium* (MG) [2]. Бактериальный вагиноз является высоко информативным предиктором наличия *C.trachomatis* (CT) и *N.gonorrhoeae* (NG) [Weisenfeld HC., 2003]. Одним из механизмов повышенного риска инфицирования ИППП при БВ является снижение колонизационной резистентности слизистой в результате снижения концентрации лактобактерий [4]. С учетом того, что НМВ у пациенток 40 - 60% носят бессимптомный характер, это создает дополнительный фактор поддержания эпидемического процесса ИППП. В настоящее время в РФ систематизированных исследований по оценке взаимосвязи ИППП с НМВ не проводилось. Современные молекулярно-биологические методы на основе ПЦР в реальном времени, обладающие высокими диагностическими характеристиками, позволяют обеспечить комплексное обследование пациенток, как на наличие возбудителей ИППП, так и заболеваний, вызванных условно-патогенными микроорганизмами - бактериальный вагиноз, аэробный вагинит (АВ), и вульвовагинальный кандидоз (ВВК).

Цель. Оценить распространенность ИППП при различных НВМ среди женщин репродуктивного возраста и изучить их взаимосвязь.

Материалы и методы. В исследование были включены 22974 пациентки, проходившие лабораторное обследование в ФБУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора на наличие основных маркеров БВ, АВ; выявление грибов рода *Candida*, *U.parvum* (UP), *U.urealyticum* (UU), *M.hominis* (MH) и ИППП (*N.gonorrhoeae* (NG), *C.trachomatis* (CT), *T.vaginalis* (TV) и *M.genitalium* (MG)). Тестирование проводили с использованием наборов реагентов «ДНК-Сорб-АМ», «АмплиПрайм® NCMT», «АмплиСенс® Флороценоз / Бактериальный вагиноз-FL», «АмплиСенс® Флороценоз / Аэробы-FL», «АмплиСенс® ФлороЦеноз / Кандиды-FL», «АмплиСенс® Флороценоз Микоплазмы-FL» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора). Выявление достоверности отличия групп, относительно частоты выявления NG, CT, MG, TV, выполняли с использованием критерия хи-квадрат Пирсона, применяя поправку Йетса на непрерывность, с помощью программного обеспечения GraphPad QuickCalcs (http://graphpad.com/quickcalcs/contingency1.cfm). При значении p-value (p) < 0,05 различие групп считали достоверным.

Результаты. Среди протестированных 22974 образцов ИППП встречались в 961 (4,2%) случае: NG – 45 (0,2%), CT – 525 (2,3%), MG - 220 (1%), TV – 171 (0,7%).

По состоянию вагинальной микробиоты были сформированы 4 группы:

Первая группа: 6320 (27,5%) – пациентки с «БВ».

Вторая группа: 738 (3,2%) - пациентки, у которых концентрация ДНК аэробных микроорганизмов (энтеробактерии, стрептококки, стафилококки) была выше, чем концентрация ДНК лактобактерий и других микроорганизмов, заключение «преобладание аэробной микрофлоры» (ПАМ).

Третья группа: 770 (3,4%) - пациентки с концентраций ДНК лактобактерий превышающих ДНК других анаэробных и аэробных микроорганизмов не менее чем в 5 раз, но не более чем в 10 раз ставилось заключение «промежуточное состояние микрофлоры» (ПСМ).

Четвертая группа: 15146 (65,9%) пациентки, у которых концентрация ДНК лактобактерий более чем в 10 раз преобладала над концентрацией ДНК других бактерий «условная норма» (УН).

Для всех четырех возбудителей ИППП установлена статистически значимая зависимость между частотой их выявления и степенью нарушения баланса микробиоты. (Таблица).

Таблица. Распространенность ИППП у женщин с БВ, ПАМ и ПСМ

		БВ	ПСМ	ПАМ	УН
NG	%	0,3	0	0	0,2
	p vs УН	0.0176	0.5291	0.5207	-
CT	%	3,9	3,2	0,4	1,6
	p vs УН	<0.0001	0.0014	0.0133	-
MG	%	1,7	1,2	0,3	0,7
	p vs УН	<0.0001	0.1564	0.2831	-
TV	%	1,6	0,4	1,6	0,4
	p vs УН	<0.0001	0.9532	<0.0001	-

NG в группе БВ выявлялась в 1,5 раза чаще по сравнению с группой УН. Для CT и MG преобладание в группе с бактериальным вагинозом было в 2,4 раза выше, чем среди условно здоровых лиц. А соотношение показателей распространенности TV в группе с БВ было самым высоким среди других ИППП – в 4 раза. Даже промежуточное состояние микробиоты способствовало повышению в 1,7 - 2 раза частоты выявления CT и MG соответственно.

Выводы. По результатам исследования установлено, что распространенность ИППП достоверно выше среди женщин с нарушением баланса микробиоты влагалища, прежде всего с бактериальным вагинозом.

Список литературы.

1. Balkus J.E., Richardson B.A., Rabe L.K., Taha T.E., Mgodi N., Kasaro M.P., Ramjee G., Hoffman I.F., Abdool Karim S.S. Bacterial vaginosis and the risk of trichomonas vaginalis acquisition among HIV-1-negative women. // Sex Transm Dis. 2014 Feb; 41(2):123-8.

2. Huppert J.S., Bates J.R., Weber A.F., Quinn N., Gaydos C.A. Abnormal vaginal pH and Mycoplasma genitalium infection. // J Pediatr Adolesc Gynecol. 2013 Feb; 26(1):36-9.

3. Wiesenfeld H.C., Hillier S.L., Krohn M.A., Landers D.V., Sweet R.L. Bacterial vaginosis is a strong predictor of Neisseria gonorrhoeae and Chlamydia trachomatis infection. // Clin Infect Dis. 2003 Mar 1; 36(5):663-8.

4. Brotman R.M., Klebanoff M.A., Nansel T.R., Yu K.F., Andrews W.W., Zhang J., Schwebke J.R. Bacterial vaginosis assessed by gram stain and diminished colonization resistance to incident gonococcal, chlamydial, and trichomonal genital infection. // J Infect Dis. 2010 Dec 15; 202(12):1907-15.

ПУЛИРОВАНИЕ ОБРАЗЦОВ И ПРИМЕНЕНИЕ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР КАК ЭФФЕКТИВНЫЙ МЕТОД СКРИНИНГА ИНФЕКЦИЙ, ПЕРЕДАВАЕМЫХ ПОЛОВЫМ ПУТЕМ

Махова Т.И.[1], Румянцева Т.А.[1], Головешкина Е.Н.[1], Руднева Н.С.[2], Суханова Л.Н.[2], Гущин А.Е.[1]

[1]ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, г. Москва, Россия

[2]ГУЗ «Тульский областной КВД» МЗ ТО, г. Тула, Россия

Введение. На территории РФ на основании действующего Приказа №572н МЗ проводят обследование беременных женщин на наличие урогенитальных инфекций, в том числе и на инфекции, передаваемые половым путем (ИППП). Для всех беременных назначают только микроскопическое исследование для выявления гонококковой инфекции (*N.gonorrhoeae* (NG)). Как было неоднократно показано ранее, микроскопический метод имеет невысокие показатели чувствительности (до 64%). Для таких инфекций как *C.trachomatis* (CT), *T.vaginalis* (TV) и *M.genitalium* (MG) обязательный скрининг беременных не проводят, однако доказано их непосредственное отношение в развитии репродуктивных осложнений.

В зарубежных методических рекомендациях имеются указания на проведения скрининга беременных на различные ИППП с помощью методов амплификации нуклеиновых кислот. Исходя из вышесказанного, есть необходимости оптимизировать скрининг на ИППП у беременных на территории РФ.

В настоящее время, для возможности использования тестов на основе мультиплексной ПЦР в широкомасштабных скрининговых программах, предлагается использовать методику пулирования. Данная методика была описана зарубежными и российскими авторами, как методика позволяющая сократить денежные затраты и продолжительность работы персонала лаборатории на проведения исследования.

Цель. Целью исследования явилась оценка эффективности работы методики пулирования образцов биологического материала совместно с набором для одновременного выявления ДНК четырех возбудителей ИППП (NG, CT, TV и MG) при скрининге беременных.

Материалы и методы. В исследовании использовали объединенный биоматериал (вагинальный, цервикальный и уретральный), полученный от 1025 беременных пациенток. Биологический материал собирали в Тульском областном КВД с марта по апрель 2015 г. Пулирование образцов осуществлялось по схеме двойного пулирования. Для проведения двойного пулирования все 1025 образцов разделили на партии по 25 образцов в каждой и формировали 10 пулов по 5 образцов. Экстракцию ДНК проводили с помощью набора «ДНК-сорб-АМ», для амлификации использовали набор «АмплиСенс® N.gonorrhoeae/ C.trachomatis/ M.genitalium/ T.vaginalis–МУЛЬТИПРАЙМ-FL» (ФБУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора). После тестирования пулированных образцов все 1025 образцов были протестированы индивидуально с помощью тех же наборов реагентов.

Результаты. Среди проанализированных образцов в 3 (0,29%) была выявлена NG и в 29 (2,8%) образцах TV в пулах и в индивидуальных образцах. CT обнаружили в 68 (6,7%) образцах, из них в пулах в 67 (6,5%). MG была выявлена у 36 (3,7%) пациенток в отдельных образцах и в пулах у 34 (3,3%). Диагностическая чувствительность при использовании методики двойного пулирования совместно с набором на основе мультиплексной ПЦР в реальном времени для NG и TV достигает 100%, для CT-98,5%, а для MG-94,7%, диагностическая специфичность для каждого патогена достигает 100%.

Использование данной методики позволило сократить количество тестируемых образцов и, следовательно, стоимость проводимых исследований на 37%. Проведение тестирования с помощью метода двойного пулирования и мультиплексной ПЦР в реальном времени в сравнении с моноплексной ПЦР позволяет сократить продолжительность работы персонала лаборатории с этими образцами на 63%.

Выводы. Использование метода двойного пулирования совместно с мультиплексной ПЦР в реальном времени позволяет существенно сократить материальные затраты на проведение исследований и продолжительность манипуляций выполняемых персоналом лаборатории при диагностике ИППП у беременных. Такой подход может способствовать внедрению скрининга на ИППП для всех беременных с использованием метода ПЦР.

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ВЫЯВЛЕНИЯ РНК *T.PALLIDUM* НА ОСНОВЕ РЕАКЦИИ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АМПЛИФИКАЦИИ (НАСБА) В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

Головешкина Е.Н., Гущин А.Е.

ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение. Эпидемиологическая ситуация в РФ по сифилису характеризуется постепенным снижением заболеваемости в целом, но на фоне снижения общей заболеваемости, отмечается увеличение числа зарегистрированных случаев поздних форм, что свидетельствует о необходимости оптимизации лабораторных методов диагностики сифилиса.

Прямые методы диагностики при обследовании на сифилис занимают важное место, в особенности в период «серологического окна». Классическим прямым методом диагностики ранних форм сифилиса является темнопольная микроскопия (ТПМ). Диагностическая чувствительность и специфичность ТПМ на ранних стадиях сифилитической инфекции составляет 70-86% и 73-100% соответственно. К достоинствам этого метода относятся короткий срок проведения и относительно невысокая стоимость исследования. Недостатками метода являются низкая аналитическая чувствительность (10^5 клеток/мл и более), сложность дифференциации патогенных и сапрофитных трепонем, необходимость наличия высококвалифицированного персонала, высокая степень субъективизма и опасность заражения сотрудников лаборатории. В зарубежных и отечественных рекомендациях имеются указания на использование высокочувствительных и высокоспецифичных методов амплификации нуклеиновых кислот (МАНК) для диагностики ранних форм заболевания сифилиса при исследовании эрозивно-язвенных элементов. Одним из МАНК является НАСБА (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification, NASBA). Принцип метода НАСБА основан на изотермической транскрипционной амплификации молекул РНК на матрице образующихся в процессе реакции промежуточных молекул ДНК. При диагностике бактериальных инфекций с помощью метода НАСБА мишенью для амплификации служит рибосомальная РНК. Количество рибосом в одной клетке содержится от нескольких сотен до нескольких десятков тысяч, обеспечивая тем самым, даже при минимальной концентрации бактериальных клеток в пробе достаточно высокую концентрацию мишеней для амплификации. Поскольку НАСБА является высокочувствительным и высокоспецифичным методом, а принцип амплификации отличается от наиболее часто используемого метода – ПЦР, то НАСБА может использоваться в качестве независимого метода для подтверждения результатов ПЦР.

Цель: разработка набора реагентов для выявления рРНК *T. pallidum* с помощью реакции транскрипционной амплификации (НАСБА) в режиме реального времени.

Материалы и методы. Последовательности генов 16S рРНК микроорганизмов получали из базы данных нуклеотидных или геномных последовательностей NCBI (National Center for Biotechnology Information). Выравнивание полученных последовательностей выполняли с помощью программы AlignX пакета программ Vector NTI 11.

Для получения рекомбинантных контролей использовали ДНК фага лямбда gt10 и плазмиду pET20N7.

Выделение НК проводили с помощью набора реагентов «РИБО-сорб» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора) в соответствии с инструкцией производителя.

Для проведения реакции НАСБА использовали комплект реагентов для амплификации «Базового набора Nuclisens» (bioMerieux, The Netherlands), который содержал солевые компоненты, дНТФ, комплекс ферментов в виде лиофилизированной сферы с AMV - обратной транскриптазой, Т7 РНК-полимеразой, РНКазой Н и необходимые для их растворения компоненты.

В работе использовали культуру патогенной бледной трепонемы (штамм Никольса), полученную из 7-суточного орхита кролика.

Концентрацию трепонем в используемой культуре определяли методом лимитирующих разведений. Для оценки концентрации (в ГЭ/мл) была использована область однокопийного гена *tpp47*. Анализ результатов амплификации проводили с использованием программного обеспечения к прибору «Rotor-Gene Q» («Qiagen», Германия). Определение концентрации *T. pallidum* по полученным положительным сигналам проводили с помощью программы Quality (Rodrigo A.G., et al., 1997).

Результаты. Для разработки мишень-специфических реагентов был проведен сравнительный анализ последовательностей генов 16S рРНК у широкого спектра микроорганизмов, включая представителей рода *Treponema* на основе информации GeneBank. Был определен участок высоко специфический для *T. pallidum* и в пределах данного участка выбраны последовательности для праймеров и гибридизационного зонда. Выбранная область нуклеотидной последовательности 16S рРНК *T. pallidum* комплементарная зонду содержит не менее 8 отличий от гомологичных последовательностей других ближайших представителей вида *T. pallidum*, что обеспечивает высокую аналитическую специфичность разрабатываемой методики. Последовательность прямого праймера была идентична последовательности мишени, а последовательность обратного праймера, кроме последовательности комплементарной мишени, на 5` конце содержала последовательность промотора полимеразы Т7 РНК.

Положительный контроль реакции (ПКО) был получен клонированием фрагмента гена 16S рРНК *T. pallidum,* включающего область праймеров, с последовательностью промотора Т7 РНК-полимеразы, в вектор фага λ gt 10.

Внутренний контрольный образец (ВКО) был получен путем клонирования фрагмента ВКО в плазмиду pET20N7, содержащую последовательности, кодирующие минимальный необходимый набор компонентов для сборки частиц фагов ms2. При разработке ВКО гибридизационная область зонда была подобрана таким образом,

чтобы она не была комплементарна нуклеотидным последовательностям, опубликованным в GeneBank.

Таким образом, разработанный набор мишень - специфических реагентов включает: специфические для 16S рРНК *T. pallidum* праймеры и флуоресцентно-меченый гибридизационный зонд; флуоресцентно-меченый гибридизационный зонд для внутреннего контрольного образца РНК; ВКО РНК и ПКО ДНК в виде препаратов фагов со стандартной концентрацией.

Предел обнаружения мишень-специфических реагентов был определен на культуре *T. pallidum*. Для этого были приготовлены последовательные 10-кратные разведения культуры *T. pallidum* с концентрацией $1x10^8$ ГЭ/мл, из которых были выделены НК. Амплификация была проведена для каждого разведения в 9-кратной повторности. Предел обнаружения для культуры *T. pallidum* составил 10 ГЭ/мл.

Выводы. Предел обнаружения разработанной методики – 10 ГЭ/мл *T. pallidum*, что позволяет определять возбудителя в значительно более низких концентрациях, чем метод ТПМ и обеспечивает более высокую диагностическую чувствительность.

В дальнейшем планируется определить диагностические характеристики разработанного набора реагентов.

ВЫЯВЛЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИЙ, ПЕРЕДАВАЕМЫХ ПОЛОВЫМ ПУТЕМ, У НОВОРОЖДЕННЫХ

Руднева Н.С.

ГУЗ «Тульский областной клинический кожно-венерологический диспансер» МЗ Тульской области, г. Тула, Россия

Введение. Одним из основных индикаторов эффективности здравоохранения, отражающих здоровье и благополучие населения, является младенческая смертность [1]. В структуре младенческой смертности значительную роль играют внутриутробные инфекции, вызываемые в т.ч. возбудителями инфекций, передающихся половым путем (ИППП) [2,3]. Так, наличие хламидийной инфекции способствует невынашиванию и преждевременным родам, микоплазмы и хламидии, инфицируя плод, приводят к летальному исходу в 15,4% случаев [4,5]. Имеются данные о выявлении возбудителя трихомониаза в дыхательных путях новорожденных [6]. Однако неонатологи не рассматривают *T.vaginalis* как значимого патогена внутриутробных инфекций [7].

Таким образом, актуальным является организация скрининга новорожденных для выявления возбудителей ИППП, как патогенов внутриутробных инфекций с целью выбора этиотропного лечения.

Цель исследования: провести анализ данных скрининга новорожденных на возбудителей инфекций, передаваемых половым путем.

Материалы и методы: в 2015-2016 гг. в Тульской области проводился скрининг новорожденных для исключения внутриутробных инфекций. Критерием отбора детей для обследования являлось среднетяжелое и тяжелое состояние ребенка, требующее реанимационных мероприятий. Скрининг проводился с целью определения этиотропного фактора внутриутробной инфекции.

Материалом для исследования служил соскоб со слизистой оболочки полости рта новорожденных. Наличие возбудителей ИППП, генитальных микоплазм и герпесвирусов проводили методом ПЦР в реальном времени с использованием наборов реагентов «АмплиСенс» производства ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора. Для выявления возбудителей ИППП использовали набор реагентов на основе мультиплексной ПЦР «АмплиСенс ® *N.gonorehoae/C.trachomatis/M.genitalium/T.vaginalis* - МУЛЬТИПРАЙМ-FL». Исследования проводили на базе клинической лаборатории ГУЗ «Тульский областной клинический кожно-венерологический диспансер»

Результаты. В течение 2-х лет методом ПЦР в реальном времени, на хламидийную, микоплазменные, герпетические инфекции, было обследовано 2864 ребенка, из них у 2245 детей исследование проводилось на трихомонадную и гонорейную инфекции. Случаи неонатальной инфекции были выявлены у 13% новорожденных. Чаще всего в полученном материале выделялись *Mycoplasma hominis, Ureaplasma spp*. - 88% всех инфицированных новорожденных, у 18% выявлялись герпетические инфекции. Среди невирусных ИППП, в 6% случаев была выявлена *C.trachomatis*, в 9% случаев - *T.vaginalis*. Было проанализировано 20 случаев инфекции, вызванной *T. vaginalis* у новорожденных. Все матери встали на учет по беременности в поздние сроки. Скрининг на ИППП во время беременности был проведен только у двух из них в конце второго триместра. У обеих трихомонадная инфекция была установлена методом ПЦР и у одной из них – микроскопически. Большинство детей, в материале которых находили ДНК *T.vaginalis*, родились преждевременно на сроках гестации от 25 до 35 недель и имели низкую или экстремально низкую массу тела, только в одном случае имела место переношенная беременность (41 неделя), однако масса тела новорожденного составила 2750 гр., отмечалась гипотрофия плода. Все новорожденные в первые минуты рождения имели оценку по Апгар не выше 7 баллов, в 75% менее 6 баллов. При гистологическом обследовании плаценты определились тромбофлебит, гнойный децидуит у 18% женщин. Состояние детей оценивалось как тяжёлое и крайне тяжёлое, были диагностированные перинатальное поражение ЦНС, дистресс-синдром, в 2-х случаях пневмония. Все дети находились на лечении в реанимационном отделении. 3 ребёнка умерло.

Заключение. Учитывая тяжёлое состояние новорожденных, вызванное трихомонадной инфекцией, и летальные исходы, необходимо широкое внедрение молекулярно-биологического скрининга беременных с использованием мультиплексной ПЦР в реальном времени на наличие *T.vaginalis* и других возбудителей ИППП, и также дальнейшее изучение влияния данной группы инфекций на перинатальные потери.

Список используемой литературы.

1. Баранов А. А. и др. Закономерности и тенденции младенческой и детской смертности в российской федерации //Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины. – 2015. – Т. 23. – №. 1. – С. 35-41.

2. Кваша Е. А. Смертность детей до 1 года в России: что изменилось после перехода на новые определения живорождения и мертворождения //Демографическое обозрение. – 2014. – Т. 1. – №. 2 (2).

3. Аполихин О. И., Москалева Н. Г., Комарова В. А. Современная демографическая ситуация и проблемы улучшения репродуктивного здоровья населения России //Экспериментальная и клиническая урология – 2015. - №. 4 - С.4 www.ecuro.ru

4. Малкова Е. М., Гавалов С. М., Гришаева О. Н. Хламидийная инфекция у новорожденных детей //Под ред. член-корр. РАМН, проф. СМ Гавалова. – 2005.

5. Lis R., Rowhani-Rahbar A., Manhart L. E. Mycoplasma genitalium infection and female reproductive tract disease: a meta-analysis //Clinical Infectious Diseases. – 2015. – Т. 61. – №. 3. – С. 418-426.

6. Silver B. J. et al. Trichomonas vaginalis as a cause of perinatal morbidity: a systematic review and meta-analysis //Sexually transmitted diseases. – 2014. – Т. 41. – №. 6. – С. 369-376.

7. Trintis J. et al. Neonatal Trichomonas vaginalis infection: a case report and review of literature //International journal of STD & AIDS. – 2010. – Т. 21. – №. 8. – С. 606-607.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ЗНАЧИМОЙ БАКТЕРИУРИИ У БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН

Хуснутдинова Т.А.[1], Савочкина Ю.А.[2], Шипицына Е.В.[1], Тимошина О.Ю.[2], Гущин А.Е.[2], Савичева А.М.[1]

[1] ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

[2] ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение

Инфекции мочевыводящих путей (ИМП) относятся к наиболее распространенным инфекционным заболеваниям в акушерстве и гинекологии. Развитие ИМП во время беременности и отсутствие своевременного лечения может приводить к появлению серьезных осложнений со стороны матери и плода. Диагностика ИМП в настоящее время основывается на культивировании средней порции мочи. Культуральный метод исследования мочи довольно трудоемкий и длительный (24-48 часов), требует особых условий культивирования и идентификации микроорганизмов, относительно дорогой. Молекулярно-биологические методы для выявления и идентификации микроорганизмов с их количественным определением активно внедряются в диагностику инфекционных заболеваний, включая диагностику ИМП. Разработка и внедрение новых методов на основе количественного анализа ДНК возбудителей ИМП в моче с помощью полимеразной цепной реакции является актуальной задачей.

Цель исследования

Оценка методики на основе количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени для выявления значимой бактериурии у беременных женщин.

Материалы и методы

Проведено ретроспективное исследование средней порции свободно выпущенной мочи, полученной от беременных женщин на разных сроках беременности, поступивших в отделения патологии беременности ФГБНУ «НИИАГиР им. Д.О. Отта». Бактериологическое исследование клинического материала проводилось количественным методом с использованием 5% кровяного агара. Значимой бактериурией считали содержание бактерий не менее 10^5 КОЕ/мл. Идентификацию выделенных микроорганизмов проводили методом масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS, BRUKER Daltonics, Германия). Образцы мочи анализировали методом количественной мультиплексной ПЦР в реальном времени с применением наборов реагентов «АмплиСенс» серии «ИМП» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии», Москва). Концентрацию ДНК бактерий рассчитывали в ГЭ (геномных эквивалентах) в 1 мл мочи. Пороговые значения клинически значимой концентрации общей ДНК бактерий, ДНК *Enterobacteriaceae* и *E. coli* определяли путем ROC-анализа (ROC – receiver operating characteristic) по максимальной пропорции правильно классифицированных образцов. Для остальных маркеров в качестве клинически значимой концентрации использовали значение $\geq 2\times10^5$ копий ГЭ/мл. Чувствительность и специфичность метода количественной ПЦР оценивали по отношению к результатам культурального исследования. Статистический анализ результатов осуществляли с использованием статистического пакета NCSS 11 (NCSS, LCC).

Основные результаты

Были проанализированы пробы мочи от 896 беременных женщин, значимая бактериурия была выявлена у 28 женщин (3%). Частота выделения *E. coli* составила 50% (в 14 пробах из 28), *Enterococcus* spp. – 25% (7 из 28), *Klebsiella* spp. - 7% (2 образца мочи), *Proteus* spp. и *S. saprophyticus* по 4% (в 1 пробе мочи каждый), *Streptococcus* spp. – 14% (4 образца мочи). Совокупная доля представителей семейства *Enterobacteriaceae* составила 61%.

Пороговые значения концентрации общей ДНК бактерий, ДНК *Enterobacteriaceae* и *E. coli,* определенные методом ROC-анализа, составили $\geq 1{,}2\times10^6$, $\geq 4{,}6\times10^5$ и $\geq 3{,}1\times10^5$ ГЭ/мл, соответственно. Показатели чувствительности и специфичности выявления значимой бактериурии с помощью методики на основе количественной ПЦР в реальном времени для большинства видов/групп бактерий составили от 99% до 100%. В целом, с применением данной методики были правильно идентифицированы 27 из 28 случаев значимой бактериурии и 852 из 868 отрицательных случаев. Чувствительность и специфичность

оцениваемой методики на основе количественной ПЦР по отношению к бактериологическому методу составили 96% и 98%, соответственно.

Чувствительность выявления бактериурии по критерию содержания общей бактериальной ДНК, используемой в качестве дополнительного критерия, составила 96%. Из 868 проб, отрицательных в отношении значимой бактериурии при культуральном исследовании, для 764 проб методом ПЦР было определено содержание общей ДНК бактерий ниже порога значимости, таким образом, специфичность ПЦР-анализа по этому критерию составила 88%.

Таблица. Чувствительность и специфичность выявления клинически значимой бактериурии с применением количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени

Бактериальные маркеры	Число истинно положительных проб	Число ложноотрицательных проб	Число истинно отрицательных проб	Число ложноположительных проб	Чувствительность,%	Специфичность, %
Enterobacteriaceae	17	0	873	6	100	99
Escherichia coli	14	0	877	5	100	99
Klebsiella spp.	2	0	893	1	100	99,9
Proteus spp.	1	0	894	1	100	99,9
Enterococcus spp.	7	0	883	6	100	99
Streptococcus spp.	3	1	885	7	75	99
Staphylococcus saprophyticus	1	0	895	0	100	100
Staphylococcus spp.	1	0	889	6	100	99
Все определяемые виды/группы бактерий	27	1	852	16	96	98
Bacteria	27	1	764	104	96	88

Выводы

Распространенность значимой бактериурии с порогом $\geq 10^5$ КОЕ/мл в обследованной группе беременных женщин составляет 3%. В половине всех случаев значимой бактериурии у женщин в моче была выявлена *E. coli*. Полученные показатели чувствительности и специфичности выявления значимого содержания ДНК уропатогенных бактерий с помощью методики на основе количественной ПЦР в реальном времени для большинства видов/групп бактерий составили от 99 до 100%. Чувствительность и специфичность оцениваемой методики по отношению к результатам бактериологического посева при выявлении бессимптомной бактериурии беременных составили 96% и 98%, соответственно.

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МАКРОЛИД-РЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ *MYCOPLASMA GENITALIUM* НА ОСНОВЕ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Хайруллина Г.А., Гущин А.Е.

ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение. *Mycoplasma genitalium* является вторым по частоте возбудителем ИППП. В настоящее время одной из наиболее серьезных проблем является появление и распространение штаммов *M.genitalium*, устойчивых к препаратам выбора – макролидам. В европейских странах доля таких штаммов *M.genitalium* варьирует от 18 до 80%, что приводит к формированию хронического рецидивирующего процесса и необходимости изменения тактики лечения. Международные рекомендации IUSTI по ведению пациентов с инфекцией, вызванной *M.genitalium,* предлагают проводить исследования по выявлению штаммов *M.genitalium*, устойчивых к действию макролидов до начала лечения. Обнаружение устойчивых к макролидам (азитромицину) штаммов *M.genitalium* до начала или после окончания лечения требует применения альтернативных схем лечения с использованием фторхинолонов (моксифлоксацина).

Устойчивость *M.genitalium* к действию макролидов обусловлена появлением мутаций в V домене гена 23S рРНК, главным образом в положениях 2058, 2059 и 2062 (нумерация по *Escherichia coli*). Разработанные на сегодняшний день методики выявления мутантных штаммов включают различные варианты пост-амплификационного этапа исследования, что затрудняет их использование в

рутинной лабораторной практике особенно при скрининговых исследованиях.

Новые технологии синтеза открыли возможность создавать ДНК-зонды, чувствительные к замене 1 нуклеотида в последовательности, что позволяет разработать высокочувствительную методику, точно дифференцирующую мутантный генотип от дикого на основе мультиплексной ПЦР в реальном времени.

Цель. Разработка методики на основе ПЦР в реальном времени с использованием LNA-модифицированных оснований, позволяющей выявлять наличие ДНК *M.genitalium* и дифференцировать мутантный генотип от дикого, с возможностью ее интегрирования в алгоритм обследования пациентов.

Материалы и методы. Оценку дифференцирующих возможностей зонда проводила на линейке рекомбинантных контролей, созданной на основе вектора pGem-t и участка последовательности гена 23S рРНК. Один рекомбинантный контроль содержал одну из возможных мутаций: A2058T, A2058C, A2059T, A2059C, A2062T, A2059G, A2058G.

Апробацию разработанной методики проводили на образцах биоматериала, содержащих ДНК *M.genitalium*. В качестве референсного метода определения принадлежности *M.genitalium* к дикому или мутантному генотипу, а также тип мутации использовали метод секвенирования по Сэнгеру.

Результаты. Для подбора зонда, чувствительного ко всем возможным мутациям, была создана модельная система, состоящая из рекомбинантных контролей, несущих участок гена 23S рРНК *M.genitalium*. В линейку контролей входили образцы, содержащие по одной из возможных мутаций: A2058T, A2058C, A2059T, A2059C, A2062T, A2059G, A2058G и образец, соответствующий дикому генотипу. Такая модельная система помогла выбрать из более чем десятка созданных последовательностей, зонд, позволяющий выявлять участок гена 23S рРНК соответствующий дикому генотипу. При наличии любой из возможных мутаций происходят критические изменения в кинетике накопления флуоресцентного сигнала во время проведения ПЦР в реальном времени. Точная дифференциация мутантного генотипа от дикого проводится на основе присутствия сигнала, наклона кривых кинетики накопления флуоресценции, уровня максимальной интенсивности сигнала.

Одновременное выявление наличия *M.genitalium* в количественном формате и оценка принадлежности штамма к дикому или мутантному генотипу обеспечивается положительным контрольным образцом, представляющим собой препарат плазмидной ДНК, содержащей в своей последовательности как участок гена гиразы *M.genitalium*, так и участок гена 23S рРНК. Положительный контроль такого типа позволяет дифференцировать мутантный и дикий генотипы *M.genitalium* на основе разницы сигнала детекции общей концентрации *M.genitalium* и сигнала детекции дикого генотипа.

Вторым критерием при выборе последовательности праймеров и зонда являлась чувствительность. Разработанная методика позволяет выявлять присутствие *M.genitalium* в концентрации от 10^3 ГЭ/мл, что важно при определении этого возбудителя, поскольку для данного микроорганизма характерна низкая бактериальная нагрузка. Показатель чувствительности методики становится особенно актуальным в ходе контроля лечения, когда под действием препаратов происходит снижение концентрации возбудителя и возможно появление мутаций устойчивости к действию препаратов. При этом предел детекции выявления мутантных генотипов *M.genitalium* совпадает с пределом детекции выявления наличия ДНК *M.genitalium*, что позволяет избежать ложноположительных результатов.

Алгоритм выдачи заключения очень простой и базируется на результатах детекции двух мишеней *M.genitalium* и внутреннего контроля (таблица 1).

Методика была опробована на 789 образцах биологического материала. Все результаты, полученные с помощью разработанной методики, были подтверждены последующим секвенированием продуктов амплификации фрагмента гена 23S рРНК. Дискордантных результатов обнаружено не было.

Таблица 1. Алгоритм выдачи заключения методики выявления макролид-резистентных генотипов *M.genitalium*

Канал детекции общего кол-ва *M.genitalium*	Канал детекции дикого типа *M.genitalium*	Канал детекции внутреннего контроля	Результат
-	**-**	**+**	*M.genitalium* – НЕ обнаружена
+	+	+	*M.genitalium* – обнаружена Мутации устойчивости к макролидам - НЕ обнаружены
+	-	+	*M.genitalium* – обнаружена Мутации устойчивости к макролидам - обнаружены

Заключение. Внедрение разработанной методики в лабораторную практику позволит изучать распространенность мутантных генотипов *M.genitalium*, устойчивых к действию макролидов и корректировать тактику лечения пациентов при выявлении мутантного штамма.

ДИАГНОСТИКА ДИСБИОЗОВ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА У ЖЕНЩИН В ПОСТМЕНОПАУЗЕ

Тимощук Г.И.[1], Казакова Л.А.[1], Заднепровская Н.В.[2], Денисова Е.В.[1], Болтунова О.С.[1], Устюжанина А.В.[1], Винчковская Е.Е.[1]

[1]ООО «Кабинет лабораторных исследований «Овум», Кемерово, Россия
[2]ЧУЗ «Поликлиника Овум», Кемерово, Россия

В период постменопаузы у женщин происходит существенное снижение уровня эстрогенов, приводящее к истончению слизистой влагалища и изменению микроценоза. За счет утраты защитных свойств слизистой влагалища легко происходит инфицирование как патогенными, так и условно-патогенными микроорганизмами, развиваются дисбиотические процессы, возникают инфекционно-воспалительные заболевания.

Комплексное исследование «Фемофлор 16», выполняемое методом Real-Time ПЦР, позволяет быстро и качественно оценить спектр микрофлоры, провести его количественную характеристику, выявить соотношения между видами нормальной флоры и условно-патогенными микроорганизмами, определить трудно-культивируемые анаэробные бактерии, выявить микроорганизмы, резистентные к действию стандартных лекарственных препаратов. Исследование позволяет диагностировать и дифференцировать дисбиотические процессы от атрофических процессов слизистой, оценивать эффект от лечения.

Цель исследования. Оценить состояние биоценоза влагалища у женщин старшей возрастной группы с помощью метода Real Time ПЦР, определить частоту встречаемости дисбаланса микрофлоры.

Материалы и методы. Было проведено обследование 188 женщин старшей возрастной группы, обратившихся с жалобами на зуд, дискомфорт, выделения или неприятные ощущения во влагалище. Возраст обследованных женщин составил от 45 до 63 лет (средний возраст 52 года). У всех пациенток было исключено инфицирование безусловными патогенами методом ПЦР.

Материал для исследования - соскобы из влагалища. Исследование микроценоза влагалища проводилось методом Real-Time ПЦР с использованием тест-системы «Фемофлор 16», характеризующей микрофлору по 25 параметрам, исследования проводились на приборе «ДТ-96», производитель реактивов и оборудования ООО «ДНК-Технология», Москва, Россия.

Параллельно всем пациенткам проводилась световая микроскопия мазков из влагалища, препараты окрашивались по методам Папенгейма и Грама, исследование выполнялось на микроскопе Axio Lab.A1 фирмы «Карл Цейс», Германия.

Результаты. По результатам ПЦР-исследования у обследованных женщин уровни общей бактериальной массы (ОБМ) регистрировались в интервале от $10^{3,8}$ до $10^{9,2}$ ГЭ/мл. В 19,7% (37) уровни ОБМ были ниже $10^{5,0}$ ГЭ/мл, у данных пациенток при микроскопическом исследовании регистрировался атрофический тип мазка, а низкая микробная обсемененность влагалища объяснялась выраженными атрофическими процессами слизистой.

Уровни *Lactobacillus spp.* выявлялись в достаточных количествах (в пределах нормы для репродуктивного возраста) у 12,2% (23) обследованных, были снижены у 48,4% (91), *Lactobacillus spp.* не обнаруживались у 39,4% (74).

У 12,2% (23) женщин баланс микрофлоры не был нарушен, уровень *Lactobacillus spp.* находился в пределах нормы, что позволило диагностировать нормоценоз, у данных пациенток при микроскопическом исследовании определялась картина нормоценоза или промежуточного типа мазка, уровень лейкоцитов был в пределах нормы.

Дисбиоз микрофлоры различной степени выраженности выявлялся в 87,8% (165). По данным микроскопии у пациенток с дисбиозом определялся промежуточный типа мазка в 18,8% (31), бактериальный вагиноз в 49,1% (81) и неспецифический вагинит в 32,1% (53).

У 67,3% (111) дисбиоз микрофлоры был представлен ассоциацией нескольких (от 2 до 6) групп условно-патогенных микроорганизмов. Среди пациенток с дисбиозами анаэробный дисбиоз выявлен в 46,7% (77), аэробный в 20,0% (33), смешанный в 33,3% (55).

Среди всех обследованных пациенток в 76,6% (144) определялись грибы *Candida species*, в концентрациях 10^3-10^4 ГЭ/мл – 47,9% (90), в концентрациях более 10^4 в 28,7% (54). Частота встречаемости повышенных концентраций определенных групп условно-патогенных микроорганизмов у обследуемых женщин представлена в таблице:

№	Название групп микроорганизмов	Повышение уровней	
		абс.	%
Факультативно-анаэробные микроорганизмы			
1	*Enterobacterium species*	10	5,3
2	*Streptococcus species*	57	30,3
3	*Staphylococcus species*	19	10,1
Облигатно-анаэробные микроорганизмы			
4	*Gardnerella vag./ Prevotella bivia/ Porhyromanas sp.*	78	41,5
5	*Eubacterium species*	50	26,6
6	*Sneathia species / Leptotrihia species/ Fusobacterium sp.*	12	6,4

№	Название групп микроорганизмов	Повышение уровней	
		абс.	%
7	*Megasphera species / Veilonella species / Dialister sp.*	25	13,3
8	*Lachnobacterium species / Clostridium species*	21	11,2
9	*Mobiluncus species / Corynebacterium species*	14	7,4
10	*Peptostertococcus species*	9	4,8
11	*Atopobium vaginae*	16	8,5
Микоплазмы			
12	*Mycoplasma hominis*	21	11,2
13	*Ureaplasma species*	52	27,7
Дрожжеподобные грибы			
14	*Candida species*	54	28,7

Выводы

Дисбиоз вагинальной микрофлоры методом Real-Time ПЦР выявляется у значительного числа женщин в постменопаузе, он был диагностирован у 87,8% обследованных пациенток. Высокая частота диагностики дисбиоза объясняется замещением *Lactobacillus spp.* представителями условно-патогенной микрофлоры.

Среди дисбиозов преобладает анаэробный, частота его регистрации составила 46,7% дисбиозов.

Превалирующая часть пациенток в постменопаузе имеет в микробном пейзаже грибы *Candida species*, их количественное исследование помогает избежать гипердиагностики кандидоза.

Данные ПЦР-исследования у пациентов с низкой ОБМ и отсутствием *Lactobacillus spp.* коррелируют с наличием атрофического типа мазка по данным микроскопии.

Исследование вагинальной микрофлоры методом Real-Time ПЦР позволяет оценить состояние микроценоза, количественно характеризовать каждый компонент микроэкосистемы. Данный метод исследования помогает врачу-клиницисту провести дифференциальный диагноз между атрофическими процессами и дисбиозами, быстрее поставить диагноз, выбрать тактику и начать этиологически направленное лечение, исходя из состояния конкретной пациентки.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА АЭРОБНОГО ВАГИНИТА – НОВАЯ РЕАЛЬНОСТЬ

Румянцева Т.А., Гущин А.Е.

ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение

Аэробный вагинит (АВ) – относительно новая нозологическая форма, описанная в 2002 году профессором Г. Дондерсом (Бельгия). До того, как были описаны конкретные критерии постановки диагноза АВ, часто обнаружение любой кишечной микрофлоры во влагалище рассматривалось как повод для назначения терапии. На сегодняшний день описаны критерии постановки диагноза АВ и назначения терапии, в соответствии с которыми АВ – это вариант нарушения микрофлоры влагалища, при котором лактобактерии замещаются аэробной микрофлорой. В отличие от БВ, АВ характеризуется развитием воспалительной реакции на слизистой влагалища. Распространенность АВ составляет 8.3%-10.8% среди беременных женщин и 5%-23.74% среди женщин, предъявляющих жалобы на наличие вагинальных выделений. АВ или отдельные бактерии, приводящие к его развитию, ассоциированы с развитием тяжелых осложнений беременности: хороамнионит, фунисит, неонатальный сепсис и преждевременные роды.

По данным исследований, в развитии АВ ключевая роль принадлежит следующим микроорганизмам: *E.coli, Streptococcus spp*., *Staphylococcus aureus*, коагулазонегативные стафилококки, *Staphylococcus epidermidis, Enterococcus faecalis*. Роль каждого из перечисленных микроорганизмов изучена недостаточно, а потому изучение состава микрофлоры пациенток с АВ представляет особый интерес.

Для диагностики АВ «классическим» является метод микроскопии нативного препарата с особой системой интерпретации данных (учитывается количество полиморфноядерных лейкоцитов (ПМЯЛ), соотношение ПМЯЛ и эпителиальных клеток (ЭК), количество парабазальных эпителиоцитов, а также токсических лейкоцитов). В России этот метод не применяется и внедрен в ближайшее время не будет. Исходя из этиологии и патогенеза БВ, мы изучили возможности молекулярно-биологического метода в диагностике данного заболевания.

Цель и задачи

Целью данного исследования стала оценка информативности молекулярно-биологического метода в диагностике АВ. В рамках проведенной работы была оценена распространенность энтеробактерий, стафилококков, энтерококков и стрептококков среди пациенток с АВ и пациенток с нормальным состоянием микрофлоры влагалища, определены количественные характеристики для каждого микроорганизма, определена их роль в развитии АВ, а также установлены критерии постановки диагноза АВ с учетом результатов молекулярно-биологического метода.

Материалы и методы

В исследование были включены образцы от 99 пациенток, проходящих ежегодное обследование в научно-консультативном клинико-диагностическом центре ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» в 2011 году. Критерии исключения: возраст менее 18 лет, менструация на момент визита к гинекологу. От каждой пациентки было получено 2 вагинальных образца: 1 – для микроскопии нативного препарата (высушен на воздухе и отправлен для анализа в референс-лабораторию Г. Дондерса (Бельгия)); 2 – для проведения исследования методом ПЦР в реальном времени.

Результаты микроскопии интерпретировали следующим образом: оценивались 4 параметра (количество ПМЯЛ и их соотношение с ЭК; наличие токсических лейкоцитов; наличие парабазальных эпителиоцитов; общий состав микрофлоры), за каждый из которых присваивались баллы (0, 1 или 2 балла для каждого параметра). В соответствии с суммой баллов выдавалось финальное заключение: менее 3 баллов – АВ не выявлен; 3-4 балла – легкий АВ; 5-6 баллов – умеренный АВ; более 6 баллов – тяжелый АВ.

Для проведения ПЦР-анализа предварительно проводили экстракцию ДНК с применением набора реагентов ДНК-Сорб-АМ (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии»). В каждом образце оценивали наличие и концентрацию *Enterobacteriacea, Staphylococcus spp, Streptococcus spp, Enterococcus spp, Lactobacillus spp.*, общей бактериальной массы.

Основные результаты

Средний возраст пациенток составил 37.6±10.6 лет.

АВ был установлен по результатам микроскопии у 23 (23,7%) пациенток. Легкий АВ выявлен в 13 (13,4%), умеренный – в 7 (7,2%), тяжелый - в 3 (3,1%) случаев.

Enterobacteriacea, Staphylococcus spp, Streptococcus spp были выявлены в различных концентрациях во всех образцах. *Enterococcus spp* был выявлен в 76 (78,3%) образцах; частота обнаружения энтерококков среди АВ-позитивных и АВ-негативных пациенток не имела достоверных различий (p=0.198).

Концентрация энтеробактерий среди АВ-позитивных и АВ-негативных пациенток составила $2,7*10^3$ ГЭ/мл и $1,5*10^3$ ГЭ/мл соответственно (p=0.38); стафилококков - $5,7*10^4$ ГЭ/мл и $7,8*10^4$ ГЭ/мл соответственно (p=0.30); стрептококков - $1,2*10^7$ ГЭ/мл и $8*10^5$ ГЭ/мл соответственно (p=0.03); энтерококков -$3,5*10^3$ ГЭ/мл и $3,3*10^2$ ГЭ/мл соответственно (p=0.003).

Энтеробактерии доминировали в составе микрофлоры в 1/22 (4,5%) случае среди всех пациенток с АВ; стафилококки – в 2/22 (9,1%) случаях; стрептококки – в 19/22 (86,4%) случаях; энтерококки – ни в одном случаев. Во всех случаях тяжелого и умеренного АВ доминировали стрептококки.

Медиана соотношения логарифмов концентраций лактобактерий и аэробных микроорганимов составила -1.98 для АВ-позитивных случаев (суммарная концентрация аэробов превышала концентрацию лактобактерий практически на 2 порядка) и 2.12 для АВ-негативных случаев (суммарная концентрация лактобактерий превышала концентрацию аэробов более, чем на 2 порядка), p<0.0001.

Выводы

Применение молекулярно-биологического метода позволяет диагностировать АВ при наличии признаков воспаления у пациентки. Основная роль в развитии АВ принадлежит энтеробактериям, стафилококкам и стрептококкам; определение энтерококков в диагностике данной нозологической формы неинформативно. Результатом данной работы стала разработка теста «Флороценоз-Аэробы», который валидирован относительно «золотого стандарта» и позволяет диагностировать АВ с высокой точностью.

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ УПГМ СРЕДИ ПАЦИЕНТОК С РАЗЛИЧНЫМИ СОСТОЯНИЯМИ МИКРОФЛОРЫ ВЛАГАЛИЩА

Румянцева Т.А., Хайруллина Г.А., Гущин А.Е.

ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение

Mycoplasma hominis и *Ureaplasma* spp. (*U. parvum* и *U. urealyticum)* - условно-патогенные генитальные микоплазмы (УПГМ), которые колонизируют урогенитальный тракт человека.

Распространенность УПГМ варьирует в широких пределах по данным различных исследований: 4,5-40%, 28,8-63,8%, 1,3-26,2% для *U.urealyticum, U.parvum* и *M.hominis* соответственно.

Существует мнение о широком распространении УПГМ среди здоровых лиц, однако клиническое здоровье не исключает бессимптомного течения патологических процессов, в том числе различных вариантов нарушений микрофлоры влагалища.

В зарубежных работах описано, что частота обнаружения УПГМ, в частности, *M.hominis*, выше среди пациенток с бактериальным вагинозом (БВ). Их связь с другими вариантами нарушениями микрофлоры влагалища изучена недостаточно.

Цель и задачи

Целью данной работы являлось изучение распространенности и концентрации УПГМ в норме и при различных вариантах нарушения микрофлоры влагалища женщин. В рамках данного исследования была установлена распространенность и концентрация *U.urealyticum, U.parvum* и *M.hominis* среди пациенток с нормальным состоянием микрофлоры влагалища, а также с БВ, аэробным вагинитом (АВ) и относительным балансом (ОБ) микрофлоры.

Материалы и методы

В исследование были включены образцы биологического материала (мазок из влагалища) от женщин

репродуктивного возраста (18-45 лет), обратившихся в клиники Москвы в 2015 году для обследования с целью выявления облигатно- и условно-патогенных микроорганизмов.

Все образцы были исследованы для обнаружения *N.gonorrhoeae, C.trachomatis, M.genitalium, T.vaginalis* (качественное исследование), а также *Lactobacillus spp, G.vaginalis, A.vaginae*, бактерий семейства *Enterobacteriaceae, родов Staphylococcus и Streptococcus*, грибов рода *Candida*, УПГМ: *U. parvum, U. urealyticum, M. hominis* (Комплексное исследование «Флороценоз и NCMT»).

Из дальнейшего анализа были исключены образцы, в которых была обнаружена одна из ИППП (*N.gonorrhoeae, C.trachomatis, M.genitalium, T.vaginalis*), а также образцы с содержанием *Candida* более 103ГЭ/мл (предположительно образцы от пациенток с ВВК).

Исходя из полученных данных, все образцы были разделены на группы:

БВ – бактериальный вагиноз по данным исследования «Флороценоз»;

ОБ – относительный баланс микрофлоры (*G.vaginalis* и/или *A.vaginae* присутствуют в концентрации, не превышающей *Lactobacillus spp*.)

АВ – аэробный вагинит (преобладание аэробной флоры по данным исследования «Флороценоз»);

Норма – в образце выявлены только лактобактерии.

Основные результаты.

В исследование были включены 2594 пациентки; средний возраст составил 31 ± 5 лет. У 1665 (64%) женщин существенных нарушений баланса микрофлоры влагалища выявлено не было, из них менее у 28% женщин были обнаружены только лактобактерии («Норма»), у 36% помимо лактобактерий были обнаружены какие-либо другие микроорганизмы в невысокой концентрации («ОБ»). БВ был диагностирован у 33% пациенток; АВ – у 3%.

U.parvum была обнаружена у 1239 (47,8%), *U.urealyticum* – у 207 (8,0%), *M.hominis* – у 359 (13,8%) пациенток.

Распространенность и медианы концентраций УПГМ, полученные для четырех изучаемых групп, представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Распространенность (Расп.) и медианы концентраций (Конц.) *U.parvum, U.urealyticum, M.hominis,* полученные для пациенток с бактериальным вагинозом (БВ), аэробным вагинитом (АВ), относительным балансом микрофлоры (ОБ) и нормальным состоянием микрофлоры (Норма).

Микроорганизм	БВ		ОБ		АВ		Норма	
	Расп. (%)	Конц. (ГЭ/мл)	Расп. (%)	Конц. (ГЭ/мл)	Расп. (%)	Конц. (ГЭ/мл)	Расп. (%)	Конц. (ГЭ/мл)
U.parvum	60,6%	$1*10^6$	52,9%	$2*10^5$	23,9%	$1*10^5$	28,1%,	$1*10^5$
U.urealyticum	12,8%	$8*10^4$	7,1%	$1*10^4$	4,5%	$1*10^5$	3,7%	$1*10^5$
M.hominis	24,7%	$1*10^6$	12,8%	$3*10^2$	6,0%	$5*10^2$	3,0%	$1*10^2$

U. parvum и *M. hominis* присутствовали в достоверно больших концентрациях у пациенток с БВ, чем у пациенток со всеми остальными состояниями микрофлоры (АВ, ОБ, Норма) ($p<0,0001$). В свою очередь, концентрации *U. parvum* и *M. hominis* среди пациенток групп АВ, ОБ, Норма не имели достоверных различий. Выявленные концентрации *U.urealyticum* не имели достоверных различий во всех исследуемых группах пациенток ($p=0,0816$).

Выводы.

В данной работе подтверждена ассоциация *M.hominis* с самым частым нарушением микрофлоры влагалища – БВ. У здоровых лиц *M.hominis* встречается достаточно редко. Уреаплазмы также достоверно чаще определяются среди пациенток с БВ и относительным балансом микрофлоры, при этом действительно широко распространена среди здоровых лиц только *U. parvum*. Наиболее существенно группы БВ и Норма отличаются как по распространенности, так и по концентрации *M.hominis*. Другими словами, несмотря на то, что УПГМ отнесены к одной группе, их клинико-эпидемиологические характеристики различаются, что говорит о необходимости оценки индивидуальной роли каждого представителя данной группы.

УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫЕ МИКОПЛАЗМЫ И БАКТЕРИАЛЬНЫЙ ВАГИНОЗ: ВЗАИМОСВЯЗЬ, ТРЕБУЮЩАЯ ИЗМЕНЕНИЙ В ПОДХОДАХ К ЛЕЧЕНИЮ ПАЦИЕНТОК

Румянцева Т.А., Гущин А.Е.

ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение

К условно-патогенным генитальным микоплазмам (УПГМ), представляющим интерес в акушерстве и гинекологии, относят три вида класса Mollicutes: *Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum* и *Mycoplasma hominis*.

Описана связь УПГМ со множеством акушерских и гинекологических заболеваний и осложнений: бесплодием, внематочной беременностью, воспалительными заболеваниями органов малого таза (ВЗОМТ), преждевременными родами, послеродовым сепсисом. При этом конкретные условия, при которых развиваются те или иные осложнения, до конца не изучены.

В связи с тем, что УПГМ могут как обнаруживаться у здоровых женщин, так и являться одной из причин

развития тяжелых заболеваний и осложнений, возникает вопрос определения показаний к лечению и выбора тактики терапии.

В соответствии с отечественными рекомендациями, лечение при обнаружении генитальных микоплазм должно назначаться, если у пациентки есть признаки воспаления слизистой влагалища/цервикального канала, и при этом не обнаруживаются облигатно-патогенные микроорганизмы. В зарубежных работах подтверждений взаимосвязи УПГМ с вагинитом/цервицитом не найдено.

В международных рекомендациях (IUSTI, CDC, ВОЗ) УПГМ (главным образом, *M. hominis*) относят к БВ – ассоциированной флоре.

Связь между УПГМ и БВ в отечественной литературе упоминается, однако взаимодействие между УПГМ и БВ не находит отражения в схемах лечения пациенток.

Цель и задачи

Целью данной работы стала оценка динамики концентрации, а также возможности элиминации условно-патогенных микоплазм в ответ на изменение состояния микробиоты влагалища в процессе лечения БВ препаратами 5-нитроимидазолов.

В рамках поставленной цели определяли распространенность УПГМ среди пациенток с БВ, частоту элиминации и динамику концентрации УПГМ в процессе лечения БВ препаратами 5-нитроимидазолов.

Материалы и методы

В рамках данного исследования был проведен анализ данных 63 пациенток, принимавших участие в исследовании, посвященном лечению бактериального вагиноза 5-нитроимидазолами. Основным критерием включения в данное исследования являлся подтвержденный клинически (критерии Амсель) и лабораторно диагноз БВ. Биологический материал от пациенток получали до начала лечения и через 1 месяц после окончания терапии БВ (для лечения использовали метронидазол per os или орнидазол вагинально). Полученный материал исследовали с целью постановки диагноза БВ (микроскопия с оценкой по Ньюджменту, ПЦР-теста «Флороценоз» (Флороценоз -Бактериальный вагиноз), а также для количественного определения УПГМ (Флороценоз-Микоплазмы).

Основные результаты

Средний возраст пациенток составил 34±7 лет (разброс 19-44 года). У всех пациенток на первом визите был диагностирован БВ по критериям Амсель, баллам Ньюджента и с помощью теста «Флороценоз».

У 20 пациенток (31,7%) условно-патогенных микоплазм обнаружено не было. У 43 пациенток (68,3%) были обнаружены УПГМ: *U. parvum* была обнаружена до лечения БВ у 33 (52,4%) пациенток, *U. urealyticum* – у 12 (19%) пациенток, *M. hominis* – у 22 (34,9%) пациенток.

Элиминация *U.parvum* в процессе лечения БВ препаратами 5-нитроимидазолов произошла у 5 (15,1%) пациенток (у всех этих пациенток лечение оказалось успешным); *U. urealyticum* - у 4 (33,3%) пациенток (у всех этих пациенток лечение оказалось успешным); *M. hominis* - у 14 (63,6%) пациенток (лечение оказалось успешным у 12 из них (85,7%); у 2 (14,3%) на контрольном визите установлен БВ).

Медиана концентрации *U. parvum* до лечения БВ составила $6*10^5$ ГЭ/мл, после лечения при успешной терапии БВ - $2*10^5$ ГЭ/мл (p=0.0078), при неуспешной терапии - $9*10^5$ ГЭ/мл (p=0.3899); медиана концентрации *U. urealyticum* до лечения БВ составила $7*10^5$ ГЭ/мл, после лечения при успешной терапии БВ - $5*10^4$ ГЭ/мл (p=0.0038), при неуспешной терапии - $5*10^6$ ГЭ/мл (p=0.4297); медиана концентрации *M. hominis* до лечения БВ составила $3*10^7$ ГЭ/мл, после лечения при успешной терапии БВ - $2*10^4$ ГЭ/мл (p<0.0001), при неуспешной терапии - $3*10^6$ ГЭ/мл (p=0.0607).

Выводы

В процессе лечения БВ 5-нитроимидазолами отмечается элиминация или снижение концентрации УПГМ, причем выраженность снижения концентрации и частота элиминации зависят от степени ассоциации вида УПГМ с БВ (элиминация *M. hominis* происходит достоверно чаще, чем элиминация уреаплазм; концентрация *M. hominis* снижается значительнее, чем концентрация *U. parvum* и *U. urealyticum*). Элиминация *M. hominis* напрямую зависит от успеха терапии БВ, что подтверждает взаимосвязь *M. hominis* и БВ, а также позволяет рекомендовать изменение тактики ведения пациенток с *M. hominis*. Уреаплазмы в меньшей степени ассоциированы с БВ, однако достоверное снижение частоты их обнаружения и концентрации после терапии БВ также позволяет рекомендовать нормализацию микрофлоры как элемент терапии при обнаружении этих микроорганизмов.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПОЛНОГЕНОМНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ШТАММОВ *MYCOPLASMA HOMINIS,* ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОК С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ОРГАНОВ МАЛОГО ТАЗА

Хайруллина Г.А.[1], Румянцева Т.А.[1], Раковская И.В.[2], Кулешов К.В.[1], Гущин А.Е.[1]

[1]ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия
[2]ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия

Введение. *M. hominis* – условно-патогенный микроорганизм, местом обитания которого является урогенитальный тракт. Эта бактерия главным образом ассоциирована с бактериальным вагинозом, но при этом встречается у части клинически здоровых лиц. В то же время существуют отдельные клинические случаи обнаружения *M. hominis* в абсцессах, сформировавшихся в легких, межпозвоночных дисках, почках, печени, сердце и головном мозге пациентов. При этих редких тяжелых патологиях *M. hominis* выявляется как единственный возможный этиологический агент, с элиминацией которого происходит выздоровление пациента.

Нами были установлены два случая, в которых на основании лабораторных исследований *M.hominis* является

наиболее вероятной причиной возникновения заболевания. У двух пациенток, поступивших в гинекологическое отделение с жалобами на тянущие боли внизу живота, в ходе лапароскопического обследования было установлено наличие тубооварильного абсцесса у одной и пиосальпинкса у другой. Первой пациентке были назначены аднексэктомия и сальпингэктомия, второй - сальпингэктомия, также обеим проведены санация и дренирование брюшной полости. В ходе операции был получен биопсиный материал в котором методом ПЦР в реальном времени было показано наличие *M. hominis* в высоких концентрациях - 10^7-10^8 ГЭ/мл. Из полученного материала были выделены чистые культуры штаммов *M. hominis* (TOA и ISM), последовательности геномов, которых были определены методом полногеномного секвенирования.

Для выявления генетических предпосылок, которые могли дать штаммам *M.hominis* патогенетические особенности, приводящие к абсцессам, последовательности геномов штаммов TOA и ISM сравнили с геномом референсного штамма PG-21, полученного от здорового человека.

Цель. Сравнительный анализ полногеномных последовательностей *M.hominis*, выделенных от пациенток с ВЗОМТ, с референсным геномом.

Материалы и методы. Выделение ДНК из образцов проводили с помощью набора реагентов «ДНК-Сорб-АМ» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора). Количественное определение бактерий и грибов проводили наборами серии «АмплиСенс® ФлороЦеноз» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора). Культуры штаммов *M.hominis* TOA и ISM получали путем обогащения исходного биопсийного материала в жидкой питательной среде и последующей селекции интересующих колоний с использованием полутвердых питательных сред.

Выделение ДНК *M.hominis* из жидкой культуры проводили методом фенол-хлороформной экстракции. ДНК-библиотеки были получены с помощью методики ферментативной фрагментации с использованием набора Nextera (Illumina, США). Полногеномное секвенирование проводилось на приборе MiSeq (Illumina, США). Фильтрацию полученных прочтений относительно качества секвенированных нуклеотидов, идентификацию и удаление последовательностей адаптеров проводили с использованием программного обеспечения CLC genomic Workbench v 5.1. Сборку геномов *de novo* проводили с помощью SPAdes v3.9.1. Аннотацию проводили с использованием системы для аннотации бактериальных геномов *Prokka* [1].

В качестве референс-генома использовали последовательность генома *M.hominis* PG-21 (NC_013511.1).

Результаты. По размеру генома, штамм TOA, как было показано ранее [2], и штамм ISM незначительно больше, чем геном PG-21 (Таблица 1). Количество кодирующих последовательностей в геномах штаммов *M.hominis*, полученных от пациенток также больше, чем в референсном геноме.

При попарном сравнении штаммов TOA и ISM с геномом PG-21, был обнаружен ряд отличий. Для ISM было показано наличие 7 дополнительных регионов протяженностью от 1,7 до 16,6 тыс.п.о., которые отсутствуют в геноме PG-21. Наиболее протяженная последовательность содержит 14 открытых рамок считывания (ОРС), предположительно кодирующие элементы мобильного элемента бактериофага, остальные последовательности содержат ОРС, кодирующие мембранные липопротеины. В свою очередь, для штамма TOA было обнаружено 7 регионов генома, отсутствующих в PG-21. Один из регионов протяженностью 31,5 тыс.п.о., был характерен только для штамма TOA и не встречается в других опубликованных на сегодняшний день геномах *M. hominis*. Из 23 ОРС, содержащихся в этой последовательности, 18 кодируют гипотетические белки, остальные пять предположительно кодируют белки отвечающие за перенос ДНК при конъюгации бактерий и компоненты системы секреции 4-ого типа. Кроме этого геном штамма TOA по сравнению с PG-21 содержит дополнительные гены компонентов системы рестрикции-модификации I типа и мембранных липопротеинов.

Примечательно, что геномы штаммов TOA и ISM характеризовались наличием ряда ОРС (ОРС мобильных элементов бактериофага, вариабельного липопротеина адгезии Vaa, вариабельного мембранного липопротеина vmp и ряда других мембранных липопротеинов), которые отсутствовали в референс-геноме PG-21.

Таблица 1. Характеристика штаммов *M.hominis* TOA, ISM и PG-21

Штамм	Источник	Общая длина генома, тыс.п.о.	Кол-во кодирующих последовательностей
ATCC 23114 (PG21)	Прямая кишка	665,4	541
ISM	Брюшная полость	688,4	562
TOA	Маточная труба	729,8	573

Заключение. Выявленные различия между экспериментальными и рефенсным штаммами могут свидетельствовать о присутствии возможных генетических детерминантах вирулентности\патогенности в штаммах *M.hominis,* выделенных в двух случаях заболевания. Однако эта гипотеза требует дальнейшего изучения. В целом, полученные данные позволяют расширить наши представления о пангеноме *M.hominis*.

Список используемой литературы

1. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics. 2014; 30(14):2068-9

2. А.Е. Гущин, К.В. Кулешов, Т.И. Долгова, И.В. Раковская, Г.А. Хайруллина, А.О. Духин. Выделение штамма Mycoplasma hominis из биопсийного материала от пациентки с тубоовариальным абсцессом и последующее полногеномное секвенирование. Молекулярная диагностика - 2014. VIII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием. Сборник трудов. 2014; Т. 2, с. 301-302

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ГОНОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ МЕТОДАМИ СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ И ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Болотина Е.С., Фомина О.В., Антипин Д.А.

ГБУЗ «Областной кожно-венерологический диспансер № 4», Магнитогорск, Россия

Введение

Лабораторная диагностика гонококковой инфекции в Российской Федерации на сегодняшний день регламентирована следующими приказами: приказ Минздрава СССР №535 от 22.04.1985 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинической лабораторной диагностике лечебно-профилактических учреждений», приказ МЗ СССР №936 от 12.07.1985 «Об унификации лабораторных методов исследования в диагностике гонореи и трихомониаза», приказ Минздрава РФ №64 от 21.02.2000 «Об утверждении Номенклатуры клинических лабораторных исследований», приказ Минздрава РФ №415 от 20.03.2003 «Об утверждении протокола ведения больных гонококковой инфекцией». В настоящее время также действуют клинические рекомендации (КР) Российского общества дерматовенерологов и косметологов «Ведение больных инфекциями, передаваемыми половым путем (ИППП), и урогенитальными инфекциями» от 2012 г.

В перечень лабораторных исследований при подозрении на гонококковую инфекцию включены:

- микроскопическое исследование препарата, окрашенного 1% раствором метиленового синего и по Граму;
- культуральное исследование с использованием селективных питательных сред;
- молекулярно-биологические методы исследования, направленные на обнаружение специфических фрагментов ДНК и/или РНК *N.gonorrhoeae* с использованием тест-систем, разрешенных к применению в России.

КР от 2012 г. впервые ввели в разряд рекомендуемых для диагностики ИППП молекулярно-биологические методы, но не определили порядка проведения и требований к выполнению исследований.

По данным литературы, чувствительность метода световой микроскопии при диагностике гонореи препаратов отделяемого из уретры мужчин при окраске по Граму колеблется от 50 до 75% при бессимптомной инфекции, и до 95% при выраженных проявлениях; у женщин - от 20% для материала из уретры, и до 37-50% для материала из половых путей. Чувствительность культурального метода высока и варьирует в пределах 90-98%. Чувствительность полимеразной цепной реакции (ПЦР) достигает 99%, а специфичность – 95%.

Цель и задачи

Определить порядок проведения и требования к выполнению лабораторных исследований при подозрении на гонококковую инфекцию, учитывая их чувствительность и специфичность, а также оперативность получения результата, оптимально удовлетворяющего интересы клинициста и пациента.

Материалы, методы

Учитывая организационные условия и материальную базу лаборатории, доступную стоимость для пациентов, а также оперативность получения результата (ответ по результатам бактериологического посева выдается только через 5 дней) для диагностики гонококковой инфекции были выбраны методы световой микроскопии и метод полимеразной цепной реакции.

Сбор клинического материала проводился одновременно для обоих методов. Материал для исследования - отделяемое слизистой оболочки урогенитального тракта у женщин и отделяемое уретры у мужчин.

Оборудование: микроскоп медицинский бинокулярный Микмед-5, миницентрифуга-вортекс «Микроспин FV-2400», термостат твердотельный «Термит», центрифуга «Миниспин», термостат программируемый «Терцик», флюоресцентный детектор «Джин». Пробоподготовка выполнялась набором «ПРОБА-РАПИД». Амплификационный комплект «ГОНО-ГЕН» производитель НПФ «ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ». Окраска препаратов для световой микроскопии: метиленовым синим (обзорный препарат позволил выявить признаки воспаления и описать морфотипы бактерий) и по методу Грама, для определения грам-принадлежности диплококков.

Результаты

С 2014 г. по 2016 г. в лаборатории ГБУЗ «ОКВД № 4» было обследовано 484 пациента, из них мужчин – 293, женщин – 191. Пациенты предъявляли жалобы на субъективные симптомы в виде гнойных или слизисто-гнойных выделений из половых путей, либо зуд, жжение при мочеиспускании, либо болезненность во время половых контактов. У мужчин признаки воспаления в препаратах отделяемого слизистой оболочки урогенитального тракта в большей или меньшей степени выявлены у 98 пациентов, отсутствие воспалительного процесса – у 124; у женщин – у 138 и 19 соответственно. В исследуемом материале с признаками воспаления были обнаружены грамотрицательные диплококки, морфологически сходные с гонококками, расположенными внутри- и внеклеточно у 58 (59,2%) мужчин и 20 (14,5%) женщин. Окраска по Граму проводилась выборочно, только препаратов, где были обнаружены диплококки, расположенные внутри- и внеклеточно.

Методом полимеразной цепной реакции в клинических образцах с признаками воспаления нуклеиновую кислоту *N. gonorrhoeae* выявили у 66 (67,3%) мужчин и 24

(17,4%) женщин. Из них, положительные результаты бактериоскопии при выявлении возбудителей гонореи были у 53 мужчин и 10 женщин, отрицательные – у 13 мужчин и 14 женщин. При положительных результатах бактериоскопии исследуемых образцов не выявили ДНК *N. Gonorrhoeae* у 5 мужчин и 10 женщин.

Выводы

1. Чувствительность полимеразной цепной реакции при диагностике гонококковой инфекции выше чувствительности метода световой микроскопии.

2. Ложноположительные результаты при выявлении возбудителей гонореи в препаратах отделяемого слизистой оболочки урогенитального тракта методом бактериоскопии наблюдались в 15 случаях (у мужчин - 8,6%, у женщин – 50%); ложноотрицательные - в 27 случаях (у мужчин – 19,7%, у женщин – 58%). Причинами ошибок на преаналитическом этапе явилось взятие материала для исследования на 1 предметное стекло (окраска по Граму производилась после обесцвечивания препарата); на аналитическом этапе явилось неудовлетворительное качество мазков, связанное с неравномерностью окраски препаратов, наличием толстых участков с непрокрашенными клетками, недо- или переобесцвечиванием.

3. Для диагностики гонококковой инфекции необходимо проведение комплексного лабораторного обследования пациентов, т.к. не существует лабораторных методов со 100% чувствительностью и специфичностью. Сбор клинического материала на лабораторные исследования, предлагаемые действующими приказами, необходимо производить одновременно на все возможные в данной лаборатории методы.

ХАРАКТЕРИСТИКА *M.GENITALIUM* – ИНФЕКЦИИ, ОБУСЛОВЛЕННОЙ МУТАНТНЫМИ ШТАММАМИ ВОЗБУДИТЕЛЯ

Кисина В.И.[1], Жукова О.В.[1], Романова И.В.[1], Хайруллина Г.А.[2], Гущин А.Е.[2]

[1]Московский научно-практический центр дерматовенерологии и косметологии ДЗМ, Москва, Россия
[2]ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение. *Mycoplasma genitalium* впервые была выделена в 1981 году из уретральных образцов мужчин с уретритом, но культивировать данный микроорганизм оказалось очень сложно. К настоящему времени установлено, что 15-30% случаев НГУ у мужчин, в 7% случаев серозно-гнойного цервицита и 16% эндометрита обусловлены *M.genitalium*. Доказано, что *M.genitalium* передается при сексуальных контактах, вызывая у полового партнера развитие признаков воспаления независимо от других возбудителей ИППП. Среди клинически здоровых лиц *M.genitalium* практически не встречается. С 2016 года *M.genitalium* считается новым возбудителем ИППП. Одной из современных ключевых проблем (по данным преимущественно зарубежных научных исследований) является стремительное развитие антибиотикорезистентности M. *genitalium*. Научными исследованиями установлено, что неудачи лечения *M.genitalium*-инфекции обусловлены инфицированием мутантными штаммами и формированием мутаций, определяющих резистентность к антибиотикам, в процессе лечения. Целенаправленные исследования, посвященные оценке распространенности резистентных штаммов *M.genitalium*, в сопоставлении с характером клинических проявлений и изучением эффективности антибактериальных препаратов различных фармакологических групп как в Российской Федерации, так и в Московском регионе не проводились.

Цель. Охарактеризовать M.genitalium-инфекцию, обусловленную мутантными штаммами возбудителя.

Задачи исследования: 1. Установить распространенность штаммов *M.genitalium*, содержащих мутации, и изучить спектр (тип) мутаций, определяющих развитие резистентности к антибиотикам в Московском регионе. 2. Проанализировать характер клинического течения M.genitalium-инфекции у пациентов с мутантными изолятами возбудителя. 3. Изучить спектр назначаемых в клинической практике схем антибактериального лечения *M.genitalium*-инфекции.

Материалы и методы. Проведено исследование 278 штаммов *M.genitalium*, полученных от пациентов, обратившихся за медицинской помощью в филиалы МНПЦДК ДЗМ в период апрель 2015 – февраль 2016 года. Из 278 пациентов в возрасте от 18 до 59 лет мужчин было 231 (83,1%) , женщин - 47 (16,9%). От каждого пациента была получена анкета с анамнестическими данными, было проведено физикальное обследование, а также получен биологический материал для проведения лабораторного исследования. Применялся метод ПЦР с количественной оценкой содержания микроорганизмов, секвенирование домена V23S rRNA *M.genitalium* для определения генетических мутаций, ассоциированных с резистентностью *M.genitalium* к макролидам.

Результаты. Из 278 исследованных клинических изолятов *M.genitalium* мутации были обнаружены в 21 образце (7,6%). Получить клинические данные 1 пациента не представлялось возможным, в связи с чем детальному анализу подверглись амбулаторные карты 20 больных *M.genitalium* - инфекцией, обусловленной мутантными штаммами возбудителя. Возраст пациентов колебался от 19 до 37 лет. Из 20 пациентов с мутантными штаммами *M.genitalium* мужчин было 14 (70%), женщин - 6 (30.0%). Большинство обратившихся в клинику – 14 из 20 (70%) имели субъективные симптомы заболевания, из них 13 мужчин (92,9%) и 1 женщина (7,1%). У 8 из 13 (61,5%) мужчин отмечались уретральные выделения и дизурия, у 5 из 13 (38,5%) - только выделения из мочеиспускательного канала. При физикальном обследовании клинические проявления заболевания имелись у 10 из 20 (50%) пациентов. У 7 из 14 (50%), мужчин отмечалась гиперемия/отечность области наружного отверстия уретры со скудными/умеренными слизистыми/ слизисто-гнойными уретральными

выделениями. У остальных 7 из 14 (50%) мужчин отмечалось асимптомное течение *M.genitalium*-инфекции. Женщины чаще всего обращались для профилактического медицинского обследования: у 5 из 6 (83,3%) субъективные симптомы отсутствовали, 1 из 6 (16,7%) беспокоили скудные слизистые выделения, резь, жжение при мочеиспускании. У 3 из 6 (50%) женщин при обследовании определялась гиперемия слизистой оболочки влагалища и шейки матки, умеренный/обильный влагалищный секрет молочного цвета и мутные выделения из цервикального канала. У остальных 3 из 6 (50%) женщин, как и у 50,0% мужчин, имело место асимптомное течение *M.genitalium* - инфекции. В процессе исследования было выявлено, что у 100% пациентов с *M.genitalium*-инфекцией, обусловленной мутантными штаммами, имеется устойчивость к антибактериальным препаратам из группы макролидов, связанная с нуклеотидными заменами в V домене гена 23S рРНК в позициях A2058, A2059 и A2062.

Для лечения *M.genitalium* – инфекции 13 из 20 (65%) больным назначался Джозамицин 500 мг х 3р/д - 10 дней; Доксициклин 100мг х 2р/д- 10 дней получили 6 из 20 (30%). Один пациент за лечением не обратился (5%). В 2 случаях из 20 (10.0%) после первичной неудачи лечения Джозамицином назначался Левофлоксацин 500мг/сут -10дней. В 1 случае из 20 (5%) назначался Азитромицин 500 мг 1р/д -5 дней, после предварительного лечения Джозамицином и Левофлоксацином. Двое из 20 (10%) пациентов в последние 6-12 месяцев, до выявления мутантных штаммов *M.genitalium*, получали Доксициклин 100 мг х 2р/д – 10 дней и 1 из 20 (5%) Доксициклин 100мг х 2р/д – 10 дней + Левофлоксацином (дозировка неизвестна) по поводу других урогенитальных инфекций.

Особый интерес представляют 3 клинических наблюдения: 1) Пациент Ц. (31 год) обратился с жалобами на резь, жжение при мочеиспускании. При обследовании выявлена *M.genitalium*-инфекция (мутантный штамм, тип мутации A2059G). Назначен Джозамицин 500 мг х 3р/день 10 дней. При обследовании через 1 месяц – вновь выявлена M.*genitalium* (мутантный штамм, тип мутации A2059G). Назначен Доксициклин 100 мг х 2р/день 10 дней + Джозамицин 500 мг х 3р/день 10 дней. При последующем обследовании через 2 месяца *M.genitalium* не обнаружена. 2) Пациент З. (32 года) обратился с жалобами на скудные выделения из уретры. При обследовании выявлена *M.genitalium* (мутантный штамм, тип мутации A2059G). Назначен Джозамицин 500 мг х 3р/день 10 дней. Через 3 месяца после лечения вновь обнаружена M.*genitalium* (мутантный штамм, тип мутации A2059G). 3) Пациент З. 34 лет обратился с жалобами на резь, жжение при мочеиспускании и скудные слизистые выделения из уретры. Выявлена *M.genitalium* (мутантный штамм, тип мутации A2059G). Назначен Джозамицин 500 мг х 3р/день -10 дней. При контрольном обследовании через 2 месяца после лечения вновь подтверждена *M.genitalium*-инфекция (мутантный штамм, тип мутации A2059G). Назначен Доксициклин 100мг 1 таб х 2р/день 10 дней и явка на следующий прием через 14 дней. Как видно из клинических примеров, тактика ведения больных не соответствует современным клиническим рекомендациям.

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о необходимости дальнейшего углубленного изучения распространенности мутантных штаммов *M.genitalium* с оценкой характера клинического течения у пациентов с мутантными изолятами *M.genitalium* и без таковых на большей выборке пациентов. Также следует детально пранализировать спектр назначаемых в рутинной практике схем лечения *M.genitalium*-инфекции и привести их в соответствие с современными рекомендациями.

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ «ФЕМОФЛОР-СКРИН» ДЛЯ ОЦЕНКИ ВАГИНАЛЬНОЙ МИКРОБИОТЫ

Фомина О.В., Болотина Е.С.

ГБУЗ «Областной кожно-венерологический диспансер № 4», Магнитогорск, Россия

Введение

Инфекционно-воспалительные заболевания мочеполового тракта занимают ведущее место в структуре акушерско-гинекологической патологии. Метод полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ) позволяет проводить многофакторный количественный анализ урогенитальной микробиоты. Данная медицинская технология может служить чувствительным инструментом для изучения состояния исследуемого биотопа.

Цель исследования – объективная оценка состава микробной плёнки с поверхности вагинального эпителия.

Материалы и методы

Пробоподготовка - комплект реагентов для экстракции ДНК «ПРОБА-ГС-ПЛЮС» ООО «НПО ДНК-Технология».

Амплификация - комплект реагентов для исследования методом ПЦР-РВ «ФЕМОФЛОР СКРИН» ООО «НПО ДНК-Технология».

Детекция - детектирующий амплификатор «ДТ-лайт» ООО «НПО ДНК-Технология».

Основные результаты

Следует отметить, что из двух тест-систем, предложенных нами клиницистам для оценки вагинальной микробиоты, - «ФЕМОФЛОР СКРИН» и «ФЕМОФЛОР 16» - предпочтение было отдано первой.

С июня 2016 года по январь 2017 года тест-система «ФЕМОФЛОР СКРИН» была использована для обследования 162 пациенток хозрасчётного отделения ГБУЗ «Областной кожно-венерологический диспансер №4» г. Магнитогорска**.**

Параметры оценки вагинальной микробиоты:

- абсолютное и относительное количество нормофлоры (НФ) (*Lactobacillus spp*.) и облигатно-анаэробных

микроорганизмов (ОАМ) (*Gardnerella vaginalis + Prevotella bivia + Porphyromonas spp.)*

- абсолютное количество условно-патогенных микроорганизмов (УПМ): дрожжеподобных грибов (*Candida spp*.) и микоплазм (*Ureaplasma spp., Mycoplasma hominis)*

- выявление патогенных микроорганизмов (*Mycoplasma genitalium, Trichomonas vaginalis, Neisseria gonorrhoeae, Chlamydia trachomatis, HSV-2, CMV, HSV-1*)

Полученные результаты мы классифицировали, опираясь на критерии, рекомендованные авторами данной медицинской технологии («Применение метода полимеразной цепной реакции в реальном времени для оценки микробиоценоза урогенитального тракта у женщин (тест Фемофлор)», Москва, 2011):

- для нормофлоры: > 80% лактобацилл **-** нормоценоз, < 80% лактобацилл **-** дисбиоз

- для облигатно-анаэробных мироорганизмов: 10% - этиологически значимый уровень

- для условно-патогенных микроорганизмов: 10^4 ГЭ/мл - пороговая концентрация.

В таблице представлено общее количество диагностических находок в абсолютных величинах, а также количество случаев выявления условно-патогенных микроорганизмов в концентрации больше 10^4 ГЭ/мл. Для расчёта статистических показателей по выявлению УПМ (см. «Заключение») были использованы именно «высокотитражные» результаты, которые представляются более значимыми в клинической практике.

Состав вагинальной микробиоты (тест-система «ФЕМОФЛОР СКРИН»)

Количество находок (абс.)		НФ > 80%		НФ < 80%	
		ОАМ <10%	ОАМ 10 – 20%	ОАМ <10%	ОАМ >10%
		Группа 1 (90 случаев)	Группа 2 (6 случаев)	Группа 3 (19 случаев)	Группа 4 (47 случаев)
УПМ всего / $>10^4$	*Candida spp.*	42 / 8	3 / 0	11 / 4	20 / 2
	Ureaplasma spp.	55 / 28	5 / 4	12 / 7	40 / 31
	M. hominis	17 / 2	2 / 1	6 / 2	18 / 14
Патогенные микроорганизмы	*M. genitalium*	-	1	1	2
	T. vaginalis	-	2	2	5
	N. gonorrhoeae	-	-	-	-
	C. trachomatis	-	1	1	3
	HSV-2	2	-	-	3
	CMV	2	-	-	3
	HSV-1	1	1	1	1

Заключение

Распределение результатов по группам (см. таблицу) наглядно демонстрирует ряд закономерностей (что, в том числе, подтверждает корректность выбранных для интерпретации критериев):

- Дефицит нормофлоры в биоценозе вагины значительно повышает риск контаминации патогенными микроорганизмами. Так, *M. genitalium* на фоне дисбиоза была выявлена в 4,5% случаев против 1,0% на фоне нормоценоза; *T. vaginalis* - 10,6% против 2,1%; *C. trachomatis* – 6,0% против 1,0%. Выявляемость патогенов вирусной природы меньше зависит от бактериального профиля биотопа: *HSV-2* и *CMV* были обнаружены в 4,5% случаев при дисбиозе и в 2,1% - при нормоценозе; *HSV-1* - 3,0% и 2,1% соответственно.
- Содержание лактобацилл по-разному отражается на росте условно-патогенных микроорганизмов. Например, Ureaplasma spp. в высоком титре были обнаружены в 57,6% случаев в условиях дисбиоза, при нормоценозе - в 33,3%. Ещё заметнее градиент в случае с *M. hominis* - 24,2% против 3,1%. А вот количество дрожжеподобных грибов не зависело от количества лактобацилл: дисбиоз - 9,0%, нормоценоз - 8,3%.
- Облигатно-анаэробные микроорганизмы оказывают существенное влияние на состав микробиоты. Они благоприятствуют размножению микоплазм и, напротив, ингибируют рост дрожжеподобных грибов. Частота выявления в высоком титре по группам равнялась для Ureaplasma spp. - 31,1%; 66,7%; 36,8%; 66,0%; для M. hominis – 2,2%; 16,7%; 10,5%; 29,8%; для Candida spp. **-** 8,9%; 0%; 21,0% и 4,3% соответственно. Сопоставление результатов в группах 1 и 2 свидетельствует о том, что высокий уровень ОАМ готовит почву для контаминации патогенными микроорганизмами даже при достаточном количестве лактобацилл.

Таким образом, оба базовых компонента биоценоза - лактобациллы и облигатно-анаэробные микроорганизмы – каждый в своём аспекте, оказывают регулирующее влияние и обеспечивают чистоту и стабильность биотопа вагины.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ (ПЦР) ДЛЯ УТОЧНЕНИЯ ЭТИОЛОГИИ ЭРОЗИВНО-ЯЗВЕННЫХ ВЫСЫПАНИЙ В ОБЛАСТИ ГЕНИТАЛИЙ

Фомина О.В., Болотина Е.С., Дюкина Т.В.

ГБУЗ «Областной кожно-венерологический диспансер № 4», Магнитогорск, Россия

Введение

Согласно протоколу ведения больных с эрозивными и/или язвенными высыпаниями в области гениталий, следует уточнять этиологию поражения кожи и слизистых и, в первую очередь, исключать сифилис и герпес («Клинические рекомендации по ведению больных генитальным герпесом», Российское общество дерматовенерологов, 2010).

Цель исследования - выявление генетического материала возбудителей сифилиса и герпеса методом ПЦР в соскобах с очагов поражения кожи и слизистых.

Материалы и методы

Для пробоподготовки был использован комплект реагентов для экстракции ДНК экспресс-методом «ЭДЭМ» ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора.

Для амплификации применялся набор реагентов для одновременного выявления ДНК вируса простого герпеса II типа (*HSV II*), вируса простого герпеса I типа (*HSV I*) и *Treponema pallidum* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс *HSVII/HSV I/T. pallidum*-МУЛЬТИПРАЙМ-FL» ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора.

Постановка реакции и учёт результатов были выполнены на детектирующем амплификаторе «ДТ-лайт» ООО «НПО ДНК-Технология».

Основные результаты исследования

С июня 2013 года по июнь 2016 года нами было обследовано 336 пациентов с эрозивно-язвенными высыпаниями на гениталиях.

В результате скрининга регламентированным методом темнопольной микроскопии (ТПМ) у 71 (21,1%) пациента был обнаружен возбудитель сифилиса - *T. pallidum*.

Для 265 пациентов с отрицательными результатами ТПМ в качестве дополнительного метода обследования был использован метод ПЦР.

С помощью мультиплексной тест-системы «АмплиСенс *HSVII/HSV I/T. pallidum*-МУЛЬТИПРАЙМ-FL» в 21 образце (7,9%) обнаружена ДНК *T. pallidum,* в 93 образцах (35,1%) - ДНК *HSV II*, в 11 образцах (4,2%) - ДНК *HSV I*.

В ряде случаев наблюдалась микст-инфекция:

- у 2 пациентов выявлено сочетание вирусов простого герпеса 1 и 2 типов
- в 8 образцах обнаружены возбудители сифилиса и герпеса.

Таким образом, из 265 пациентов, обследованных методом ПЦР, у 13 был диагностирован сифилис, у 94 – герпес, у 8 – обе эти инфекции.

Заключение

Метод полимеразной цепной реакции с применением тест-системы «АмплиСенс *HSVII/HSV I/T. pallidum*-МУЛЬТИПРАЙМ-FL» позволил уточнить этиологию эрозивно-язвенных высыпаний в области гениталий у 115 пациентов, что составило 43,4% от числа обследованных этим методом и 34,2% от общего числа пациентов:

- количество случаев выявления *T. pallidum* увеличилось на 21, т.е. на 7,9% от числа пациентов, обследованных методом ПЦР, и на 6,3% от всех пациентов
- лабораторное подтверждение наличия герпетической инфекции было получено в 102 случаях (38,5% и 30,4% соответственно).

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ И ПЦР-РВ «АМПЛИПРАЙМ ФЛОРОЦЕНОЗ-БАКТЕРИАЛЬНЫЙ ВАГИНОЗ-FL» ТЕСТА В ДИАГНОСТИКЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ВАГИНОЗА У ЖЕНЩИН РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА

Филиппова Ю.Н., Есютина Е.И., Амзаева Е.Ю., Новикова Е.Н., Саблина В.Н., Копейкина Н.И., Краснова И.А., Куралех Н.С.

Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

Развитие современных молекулярно-генетических технологий привело к новому этапу в понимании роли микроорганизмов в формировании урогенитального биотопа. Нормальная микробиота влагалища, в состав которой входит до 300 различных микроорганизмов, постоянно находится в динамическом равновесии, которое контролируется доминирующей резидентной микрофлорой, представленной несколькими видами лактобактерий. Постоянные мини сдвиги характеризуются количественными колебаниями микроорганизмов в пределах нормобиоты и зависят от естественных физиологических процессов. Более серьезные сдвиги, связанные с изменением видового состава и численности, возникают под влиянием различных экзогенных и эндогенных факторов. В результате такого сдвига развиваются инфекционные урогенитальные заболевания, ассоциированные с патогенными микроорганизмами, или условно-патогенной микрофлорой из числа вагинальной микробиоты. Бактериальный вагиноз (БВ), обусловленный количественным снижением или полным исчезновением лактобактерий и резким увеличением облигатно- и факультативно анаэробных условно-патогенных микроорганизмов, занимает одно из ведущих мест в структуре инфекционных заболеваний органов репродукции. Совокупность клинических

данных и результатов рутинного микроскопического исследования обладает низкой информативностью для установления диагноза и назначения соответствующей этиотропной терапии. Это доказывает необходимость внедрения в акушерско-гинекологическую практику новых диагностических подходов с высокой диагностической чувствительностью и специфичностью.

Цель исследования. Оценить частоту бактериального вагиноза среди женщин репродуктивного возраста, диагностированного с помощью теста «АмплиПрайм Флороценоз-Бактериальный вагиноз - FL » (ЦНИИ эпидемиологии, Москва), разработанного на основе ПЦР в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ), и микроскопического исследования.

Материалы и методы. В исследование были включены 257 женщин в возрасте от 22 до 45 лет, обратившихся в лечебное учреждение ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России за консультативной помощью к акушеру-гинекологу. По результатам физикального осмотра материал (отделяемое влагалища) был отправлен на рутинное микроскопическое исследование и диагностику бактериального вагиноза методом ПЦР-РВ («АмплиПрайм Флороценоз-Бактериальный вагиноз - FL» ЦНИИ эпидемиологии, Москва).

Результаты. По данным объективного осмотра из 257 женщин 166 имели жалобы и клинические признаки инфекционно-воспалительного процесса урогенитальной системы и 91 – без признаков инфекционной патологии. Предварительный диагноз «бактериальный вагиноз» был поставлен 44 пациенткам из 166.

По данным микроскопии ключевые клетки в вагинальных мазках, являющиеся маркером бактериального вагиноза по критериям Амселя, были обнаружены в 13 из 257 образцов (5,0%), при этом все они из группы пациенток с объективными признаками воспалительного процесса. Микрофлора, представленная различными морфотипами, включая элементы грибов, отмечалась в 47,1% (121 /257) случаев. Нормальная микрофлора диагностирована в 47,9% (123/257) мазков.

При исследовании вагинальных мазков методом ПЦР-РВ диагноз бактериальный вагиноз был установлен на основании соотношений концентраций ДНК общей бактериальной массы, *Lactobacillus spp*. и анаэробных микроорганизмов *Gardnerella vaginalis, Atopobium vaginae* в 55 из 257 проанализированных образцов (21,4%). В том числе в разных группах с инфекционной патологией и без: 24,7% (41/166) и 15,4% (14/91) случаев соответственно. Промежуточное состояние микрофлоры диагностировано у 3,1% пациенток (8/257), тогда как у 8,6% (22/257) женщин не удалось выявить ведущего этиологического агента – «дисбиоз неуточненной этиологии». Снижение степени бактериальной обсемененности отмечалась в 4,7% (12/257) образцов.

При сравнительной оценке двух методик микроскопии и ПЦР-РВ тест «Флороценоз-Бактериальный вагиноз - FL» совпадение результатов отмечалось только в 12 случаях. 1 наблюдение соответствовало заключению «дисбиоз неуточненной этиологии». По совокупности клинических данных, микроскопии и ПЦР-РВ диагноз БВ был установлен в 10 из 44 наблюдений (22,7%). Учитывая результаты только физикального осмотра и ПЦР-РВ, этот показатель составил 40,9% (18/44). Наличие бессимптомных форм БВ отмечено в 15,4% случаев.

Выводы. Определение концентраций ДНК ключевых маркеров БВ, нормофлоры, общей бактериальной массы и их соотношений позволяет использовать данный подход для диагностики бактериального вагиноза и дифференциации этого заболевания от других инфекционных состояний микробиоты влагалища. Полученные результаты сравнительного анализа двух методик демонстрируют целесообразность широкого использования теста «АмплиПрайм Флороценоз-Бактериальный вагиноз» (ЦНИИ Эпидемиологии, Москва) в акушерско-гинекологической практике.

РОЛЬ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ ОСТРЫХ ИНФЕКЦИОННО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ НИЖНИХ ОТДЕЛОВ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА У МУЖЧИН

Липова Е.В., Чекмарев А.С., Глазко И.И.

Кафедра дерматовенерологии и косметологии с курсом клинической лабораторной диагностики. Институт последипломного профессионального образования ФГБУ ГНЦ «ФМБЦ им. А.И. Бурназяна» ФМБА России

Введение. Учитывая современные особенности клинического течения инфекционного процесса в мочеполовом тракте у мужчин – отсутствие патогномоничных симптомов, преобладание стертого или бессимптомного течения, а также признание роли условно-патогенных микроорганизмов (УПМ), наряду с возбудителями ИППП, в развитии воспалительного процесса, становится все более актуальным использование современных методов лабораторной диагностики.

Цель и задачи. Выявить особенности состава микрофлоры урогенитального тракта при острых воспалительных заболеваниях у мужчин методом ПЦР в реальном времени с целью обеспечения возможности направленной этиологически обоснованной лекарственной терапии.

Материалы и методы. Проведено комплексное клинико-лабораторное обследование 173 (100%) мужчин, с признаками острого воспаления нижних отделов мочеполового тракта.

Комплекс обследования включал: сбор анамнеза, объективный клинический осмотр, микроскопию мазков, окрашенных метиленовым синим и по Граму, исследование состава микрофлоры урогенитального тракта методом ПЦР в реальном времени тест-системой Андро-

флор® («ДНК-Технология», Россия) на детектирующем амплификаторе «ДТпрайм» («ДНК-Технология», Россия). Биологический материал для исследования получали из уретры, с головки полового члена или крайней плоти в зависимости от характера жалоб и клинической симптоматике выявленной при осмотре пациента. Выделение ДНК проводили с использованием набора для выделения ДНК ПРОБА-ГС-ПЛЮС («ДНК-Технология», Россия). Для описания клинических групп оценивали медиану (Me) количества микроорганизмов/групп микроорганизмов по отношению к общей бактериальной массе (ОБМ) в виде разницы Log10 геном-эквивалентов. Мерой дисперсии служил нижний (Q1) и верхний квартили (Q3). Для определения статистических различий между группами использовали непараметрический тест Манна-Уитни. Статистическую обработку результатов проводили с помощью статистического пакета программ SPSS (SPSS Inc., Chicago, USA).

Основные результаты. Средний возраст пациентов составил 30,5±8,7 лет. Половина мужчин при обследовании 48,6% (n=173;100%) предъявляли жалобы на чувство зуда/жжения/рези во время мочеиспускания, 39,9% на выделения из уретры, 26% на высыпания на головке полового члена (ГПЧ) и крайней плоти (КП), 13,9% на наличие неприятного запаха, 11% на боль при мочеиспускании и 10,4% на покраснение ГПЧ и КП. Согласно результатам клинического осмотра, самыми частыми симптомами были выделения из уретры (78%), высыпания на ГПЧ и КП у 48%, наличие гиперемии установлено у 45,1%, выраженного налета и/или отделяемого только на ГПЧ у 22%.

Результаты исследования с помощью тест-системы Андрофлор®, позволили разделить пациентов на 2 группы. Первую составили мужчины с острым воспалением, вызванным облигатными патогенами (инфекция, передаваемая половым путем (ИППП, n=42, вторую - пациенты, с острым воспалением, вызванным УПМ при отсутствии в результатах анализов ИППП (n=131). Различные группы УПМ были выявлены у мужчин и первой и второй групп.

В структуре выявленных ИППП ведущая роль принадлежала Chlamidia trachomatis 12%, реже Mycoplasma genitalium - 6%, Neisseria gonorrhoeae - 2%, Trichomonas vaginalis – 1%. В 3% выявлена микст-инфекция различных ИППП. Соответственно, острый инфекционно-воспалительный процесс, ассоциированный с ИППП, был верифицирован у 24% (n=42) мужчин, вызванный УПМ в 76% случаях.

Дальнейший анализ анкетных данных и результатов объективного клинического осмотра продемонстрировал различия в группах: у пациентов с УПМ по сравнению с мужчинами с ИППП чаще наблюдались высыпания на ГПЧ и/или КП (29% против 4,8%, p<0,01), выраженный налет (14,5% против 0, p<0,01), для пациентов с ИППП были более характерны мутноватые выделения (31% против 7,6% p<0,01), а по количеству выделений – обильные (16,7% против 3,8%, p<0,01) или умеренные (26,2% против 8,4%, p<0,01). Для пациентов с УПМ более характерны были прозрачные выделения (36,6% против 14,3%, p<0,01), незначительные по количеству (25,2% против 7,1%, p<0,01). Также были установлены различия в составе УПМ урогенитального тракта между группами. У мужчин с ИППП наблюдалось более выраженное снижение показателей нормоценоза по сравнению с мужчинами второй группы: разница суммы нормобиоты *(Staphylococcus spp., Streptococcus spp., Corynebacterium spp.)* по отношению к ОБМ (Lg10) у мужчин с ИППП составила Me=-1,8(Q1=-2,1, Q3=-1,1), у мужчин с УПМ Me=-0,9(Q1=-1,5,Q3=-0,4), p=,000.

Во второй группе мужчин относительные значения УПМ значительно превышали аналогичные показатели в группе мужчин с ИППП. Разница суммы баквагиноз (БВ)-ассоциированных бактерий с ОБМ у мужчин без ИППП составила Me=-0,9 (Q1=-1,6,Q3=-0,3), с ИППП Me=-2,2 (Q1=-2,6,Q3=-1,3); p=,000. По отдельным группам БВ-ассоциированных бактерий достоверные различия между мужчинами без ИППП и мужчинами с ИППП были установлены для следующих микроорганизмов: *Gardnerella vaginalis* Me=-3,1(Q1=-3,1,Q3=-0,9), против Me=-3,1(Q1=-3,1,Q3=-3,1), p=,000; *Atopobium cl.* Me=-2,8(Q1=-3,1,Q3=-2,3) против Me=-3,1(Q1=-3,1,Q3=-3,0), p=,000; *Sneathia spp./Leptotrihia spp./Fusobacterium spp* Me=-3,1(Q1=-3,1, Q3=-2,8), против Me=-3,1(Q1=-3,1, Q3=-3,1), p=,005; *Megasphaera spp./Veilonella spp./Dialister spp* Me=-1,5(Q1=-2,6, Q3=-1,0), против Me=-3,1(Q1=-3,1,Q3=-1,7), p=,000. Разница суммы анаэробных бактерий с ОБМ у мужчин второй группы составила Me=-0,4(Q1=-0,8,Q3=-0,1), против Me=-1,1(Q1=-2,5,Q3=-0,1), p=,007. По отдельным группам анаэробов достоверные различия были установлены для BPP Me=-1,1(Q1=-2,1,Q3=-0,6), против Me=-2,4(Q1=-3,1,Q3=-1,1), p=,001; *Eubacterium spp* Me=-0,9(Q1=-1,4,Q3=-0,6), против Me=-1,5(Q1=-3,1,Q3=-0,7), p=,002. Также у мужчин второй группы по сравнению с мужчинами первой группы, было выявлено более высокое количество *Enterobacteriaceae /Enterococcus spp.,* по отношению к ОБМ. У мужчин где воспалительный процесс вызван УПМ Me=-3,1(Q1=-3,1,Q3=-1,7), у мужчин с ИППП Me=-3,1(Q1=-3,1,Q3=-2,8); p=,001.

Заключение/выводы. Согласно полученным результатам исследования в структуре острых инфекционно-воспалительных процессов нижних отделов урогенитального тракта ведущая роль принадлежит УПМ (86%), ИППП только в 24%. Значительно более частой причиной воспаления являются разные группы УПМ: БВ-ассоциированные бактерии, анаэробы, энтеробактерии. При наличии воспаления вызванного облигатным патогеном наблюдается значительное угнетение микроорганизмов характерных для состояния нормоценоза. Клинически для ИППП характерно более выраженное воспаление с более яркой симптоматикой, тем не менее постулат об отсутствии патогномоничных симптомов инфекционно-воспалительного процесса в урогенитальном тракте остается актуальным. Таким образом существует объективная необходимость комплексного обследования мужчин с симптомами воспаления нижних отделов УГТ на ИППП и УПМ, что позволит назначить обоснованную этиотропную терапию, избежать полипрагмазии, ятрогении и осложнений репродуктивной функции.

ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ МИКОПЛАЗМ В УРОГЕНИТАЛЬНОМ ТРАКТЕ У БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ (ПЦР-РВ)

Пандырева О.Н.

КГБУЗ «Краевой кожно-венерологический диспансер» МЗ ХК, Хабаровск, Россия

Введение

Инфекции урогенитального тракта относятся к наиболее распространенным инфекционным заболеваниям и нередко осложняют течение беременности, родов, послеродового периода, а также влияют на состояние плода и здоровье новорожденного. В настоящее время одним из наиболее дискутабельных вопросов в акушерстве является выяснение истинной этиологической роли генитальных микоплазм и их значение в развитии патологических процессов у матери и плода.

Цель исследования

Анализ частоты выявления облигатного патогена *Mycoplasma genitalium* и условно-патогенных микроорганизмов *Ureaplasma spp*, *Ureaplasma urealyticum* и *Ureaplasma parvum* у беременных женщин, проживающих в Хабаровском крае; изучение распространенности ассоциаций между данными микробными агентами.

Материалы и методы

Исследования проводились на базе ПЦР подразделения клинико-диагностической лаборатории КГБУЗ «Краевой кожно-венерологический диспансер» г.Хабаровска. Проведено первичное обследование у 6373 беременных женщин на *Ureaplasma spp* и *Mycoplasma genitalium* методом ПЦР-РВ в качественном варианте. Возраст пациенток 17 – 41 год, на разных сроках беременности. У 724 пациенток этой выборки проведена видовая идентификация уреаплазм.

Проведено исследование соскобов эпителиальных клеток из уретры, влагалища и цервикального канала шейки матки. Забор биологических образцов, их транспортировка и выделение ДНК проводились комплектом реагентов «ЭДЭМ». Для выявления специфического участка нуклеиновой кислоты искомого инфекционного агента использовались ПЦР-тест-системы: «АмплиСенс® *Mycoplasma genitalium*», «АмплиСенс® *Ureaplasma spp*.», «АмплиСенс® *U.parvum/U.urealyticum*». Все наборы реагентов от одного производителя – ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, применялись согласно прилагаемым инструкциям. ПЦР–РВ проводилась на аппарате CFX96 Touch™ (Bio-Rad, США).

Результаты и обсуждение

В обследованных соскобах из нижних отделов урогенитального тракта, полученных от 6373 беременных женщин, генитальные микоплазмы выявлены у 4380 пациенток. *Ureaplasma species* была выявлена в 68,3% случаев (4353 положительных образцов), а *Mycoplasma genitalium* в 3,6% случаев (229 положительных образцов). Полученные результаты показывают высокую частоту распространенности генитальных микоплазм у беременных женщин в Хабаровском крае. Причем условно-патогенный микроорганизм *Ureaplasma spp.* обнаруживается в 19 раз чаще, чем абсолютный патоген *Mycoplasma genitalium*.

Определенный интерес представляет анализ полученных положительных проб на mono- и mixt- инфицирование в данной категории обследуемых. В структуре выделенной микрофлоры (n=4380) основная доля положительных проб приходится на уреаплазмы в виде монокультуры 94,8% (n=4151), выявление же *M.genitalium* в mono-инфекции незначительна и составляет 0,6% (n=27). При этом облигатный патоген – *Mycoplasma genitalium* выделяется в 7,6 раза чаще в виде ассоцианта с условно-патогенной биотой – *Ureaplasma spp.* – 4,6% (n=202).

Для определения частоты обнаружения различных видов уреаплазм в популяции беременных женщин, 724 пациенткам было проведено комплексное обследование на видовую идентификацию этих микроорганизмов. Параллельно эти же пробы исследовались на *Mycoplasma genitalium*. Структура распространения выявляемых генитальных микоплазм представлена в таблице.

Количество обследованных беременных женщин (n=724)			
Выявленные инфекции и их комбинации		«+» пробы	%
Ureaplasma	Всего ***Ureaplasma spp.***	479	66,2%
	U.parvum	387	53,5%
	U.urealyticum	44	6,1%
	U.parvum + *U.urealyticum*	48	6,6%
M.genitalium	Всего ***M.genitalium***	25	3,4%
	M.genitalium	5	0,7%
	M.genitalium + *U.parvum*	10	1,4%
	M.genitalium + *U.urealyticum*	1	0,1%
	M.genitalium + *U.parvum* + *U.urealyticum*	9	1,2%

Вид *U.parvum* был выделен у 387 беременных женщин, что составило 53,5%, вид *U.urealyticum* определялся в 6,1% (n=44) случаев, и у 6,6% (n=48) присутствовали оба вида одновременно. Частота обнаружения *U.parvum* в 8,8 раз выше, чем ее родственного вида - *U.urealyticum*. Абсолютный патоген *Mycoplasma genitalium* обнаружен у 25 (3,4%) беременных женщин данной подгруппы, причем в варианте mono- инфицирования в 0,7% (n=5) случаев, а на варианты mixt-инфицирования приходится 2,7% (n=20) случаев. Ассоциация *M.genitalium* с одним видом уреаплазмы (*U.parvum*) и ассоциация *M.genitalium* с двумя видами уреаплазм (*U.parvum* + *U.urealyticum*) встречаются практически с одинаковой частотой – 1,4% (n=10) и 1,2% (n=9) соответственно. Доля сочетания *M.genitalium* с *U.urealyticum* мала и составляет 0,1% (n=1). Удельный вес выявления *M.genitalium* в комбинациях с различными видами уреаплазм выше в 3,8 раз, чем выявление одного микроорганизма.

Выводы

- Широкое распространение генитальных микоплазм среди беременных женщин, позволяет повсеместно интегрировать метод ПЦР-РВ в алгоритм обследования с профилактической и диагностической целью для данной категории пациенток.
- Прямое обнаружение возбудителя является бесспорным доказательством инфекционного процесса и основанием для постановки этиологического диагноза и своевременного назначения адекватной терапии, что будет способствовать благополучному вынашиванию беременностей и рождению здорового потомства.

ПРОГРАММА RU-GASP (RUSSIAN GONOCOCCAL ANTIMICROBIAL SURVEILLANCE PROGRAMME): МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ. ИТОГИ 2005-2016 ГГ.

Кубанова А.А., Соломка В.С., Дерябин Д.Г.

ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» Минздрава России, Москва, Россия

Введение. Использование антимикробных препаратов (АМП) для лечения заболеваний, вызываемых *Neisseria gonorrhoeae*, насчитывает уже более 70 лет. На протяжении этого периода для терапии гонококковой инфекции применялись бета-лактамы, тетрациклины, аминогликозиды, макролиды и фторхинолоны. Однако, по истечении 10-25 лет с начала их клинического использования *N.gonorrhoeae* формировали состояние резистентности к большинству названных АМП. Указанное обстоятельство определило необходимость создания системы слежения за устойчивостью *N.gonorrhoeae* к антимикробным препаратам, получившей поддержку Всемирной организации здравоохранения на глобальном уровне под названием GASP (Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme). Реализация российской версии данной программы (RU-GASP) была начата в 2005 году, после чего ее промежуточные результаты регулярно представлялись в международной научной печати [1, 2, 3]. При этом важной особенностью программы RU-GASP явилось широкое использование молекулярно-генетических методов, ориентированных на оценку основных генетических детерминант антибиотикорезистентности *N.gonorrhoeae*.

Цель работы – обобщение результатов реализации программы RU-GASP в период 2005-2016 гг. с определением основных тенденций изменения антибиотикорезистентности *N.gonorrhoeae*.

Материалы и методы. В работе использованы 5213 штаммов *N.gonorrhoeae*, поступивших из 40 субъектов Российской Федерации. Их видовая идентификация проводилась по совокупности биохимических активностей с использованием NH карт на анализаторе VITEK 2 Compact (bioMérieux, Франция). В отношении культур, оцененных как *N.gonorrhoeae* с менее чем 99% вероятностью, выполнялось дополнительное масс-спектрометрическое исследование на времяпролетном масс-спектрометре с ионизацией MALDI Microflex (Bruker Daltonics GmbH, Германия). Определение чувствительности *N.gonorrhoeae* к пенициллину, цефтриаксону, тетрациклину, спектиномицину, азитромицину и ципрофлоксацину проводилось методом серийных разведений в агаре в соответствии с МУК 4.2.1890-04 с последующей оценкой по международным критериям CLSI и EUCAST с использованием программы WHONET (версия 5.4). Идентификация генетических детерминант резистентности *N.gonorrhoeae* к пенициллинам *(penA, ponA, blaTEM*), тетрациклинам (*rpsJ, tetM*), аминогликозидам (*rrs*), макролидам (*rrl*) и фторхинолонам *(gyrA, parC*), а также оценка системы контроля эффлюкса антибиотиков *(mtrR pro*) *в* первые годы реализации программы RU-GASP осуществлялась путем таргетного секвенирования соответствующих генов, а начиная с 2015 года – с использованием оригинального ДНК-чипа [4].

Основные результаты. Исследование российской популяции *N.gonorrhoeae* свидетельствовало об исходно высокой устойчивости к пенициллинам, тетрациклинам и фторхинолонам: в 2005 году доля штаммов, нечувствительных к данным АМП, составила 78,4%, 65,2% и 49,4% и в первые годы реализации программы RU-GASP продолжала возрастать с достижением максимумов в 2007-2008 гг. Причиной подобной ситуации являлась высокая частота распространения хромосомных детерминант резистентности, связанных с мутациями в генах-мишенях для АМП: $penA_{insD345}$ – 84,9%; $ponA_{L421P}$ – 67,9%; $rpsJ_{V57M}$ – 75,5%; $gyrA_{S83F}$ и/или $gyrA_{D87G}$ – 45,5%; $parC_{S80R}$ и/или $parC_{E84G}$ – 38,9%. Достаточно часто мутационный процесс затрагивал и системы эффлюкса антибиотиков (в частности, $mtrR_{-35delA}$ – 35,7%), в то время как гены резистентности с плазмидной локализацией обнаруживались спорадически: *blaTEM* – 5,0%; *tetM* – 1,4%. На основании полученных данных пенициллины, тетрациклины и фторхинолоны были исключены из рекомендаций по терапии гонококковой инфекции, следствием чего стало постепенное

восстановление чувствительности к ним в российской популяции *N.gonorrhoeae.* В настоящее время мы регистрируем 2,12-кратное снижение доли штаммов, нечувствительных к пенициллинам, 1,39-кратное к тетрациклинам и 1,57-кратное к фторхинолонам, что сопровождается пропорциональным изменением частоты распространения хромосомных детерминант резистентности к названным АМП: в гене *ponA* – в 2,06 раза; *rpsJ* – в 1,83 раза, генах *gyrA* и *parC* – в 1,35 и 1,20 раза, соответственно. Сохранение подобной тенденции позволяет прогнозировать восстановление чувствительности *N. gonorrhoeae* к пенициллинам, тетрациклинам и фторхинолонам до порогового значения 95%, рекомендуемого ВОЗ в качестве критерия возможности использования антимикробного препарата для терапии гонококковой инфекции, на горизонте 2026-2037 гг.

Доля штаммов, нечувствительных к спектиномицину и азитромицину (анализируется с 2007 г.) в начале реализации программы RU-GASP характеризовалась значениями 1,4% и 1,3%, что корреспондировалось с низкой частотой мутаций в генах *rrs* (0,46%) и *rrl* (0,68%). К 2011 году устойчивость к названным АМП возросла до 18,8% и 25,3%, однако, на настоящий момент доля штаммов *N.gonorrhoeae*, нечувствительных к спектиномицину и азитромицину, снизилась до 0,8% и 9,4%, что явилось основанием для включения первого из этих препаратов в клинические рекомендации в качестве альтернативного средства терапии гонококковой инфекции.

*Н*а протяжении всего периода реализации программы RU-GASP чувствительность *N.gonorrhoeae* к цефалоспоринам III-го поколения характеризовалась значением 100% без признаков формирования устойчивости к данной группе антибиотиков, что определило значение цефтриаксона и цефиксима в качестве препаратов выбора для терапии гонококковой инфекции в Российской Федерации.

Заключение. Реализация программы RU-GASP позволила эффективно контролировать устойчивость *N.gonorrhoeae* к АМП, своевременно актуализировать клинические рекомендации и, как следствие, достичь почти четырехкратного снижения заболеваемости гонококковой инфекцией в Российской Федерации: с 71,7 случаев на 100 тыс. населения в 2005 г. до 18,5 случаев на 100 тыс. населения в 2015 г.

Список используемой литературы:

1. Kubanova A., Frigo N., Kubanov A., Sidorenko S., Priputnevich T., Vachnina T., et al. National surveillance of antimicrobial susceptibility in Neisseria gonorrhoeae in 2005-2006 and recommendations of first-line antimicrobial drugs for gonorrhoea treatment in Russia. Sex Transm. Infect. 2008; 84: 285–289.

2. Kubanova A., Frigo N., Kubanov A., Sidorenko S., Lesnaya I., Polevshikova S., et al. The Russian gonococcal antimicrobial susceptibility programme (RU-GASP)--national resistance prevalence in 2007 and 2008, and trends during 2005-2008. Eurosurveillance. 2010;15: 19533.

3. Kubanova A., Kubanov A., Frigo N., Solomka V., Semina V., Vorobyev D., et al. Russian gonococcal antimicrobial susceptibility programme (RU-GASP) - resistance in *Neisseria gonorrhoeae* during 2009-2012 and NG-MAST genotypes in 2011 and 2012. BMC Infect. Dis. 2014; 14: 342.

4. Kubanov A., Vorobyev D., Chestkov A., Leinsoo A., Shaskolskiy B., Dementieva E., Solomka V., Plakhova X., Gryadunov D., Deryabin D. Molecular epidemiology of drug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in Russia (Current Status, 2015). BMC Infect. Dis. 2016; 16: 389.

АМБУЛАТОРНЫЙ СКРИНИНГ БЕРЕМЕННЫХ НА ИНФЕКЦИИ В Г. МОСКВЕ

Науменко Н.С., Белова А.В., Асцатурова О.Р., Никонов А.П.

ФГБОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России

Актуальность

Внутриутробная инфекция играет важную роль в перинатальной заболеваемости и смертности. Проведение скринингового обследования беременных на инфекции является основополагающим мероприятием на пути ее снижения. В свою очередь, анализ получаемых эпидемиологических данных в каждом конкретном регионе позволяет контролировать обоснованность и эффективность проводимого скрининга и при необходимости корректировать его.

Цель

Уточнение распространенности инфекций у беременных, определяемых при первичном обращении пациентки на амбулаторном этапе.

Материалы и методы

В исследование были включены данные 420 медицинских карт беременных женщин, полученные при первой явке к врачу акушеру-гинекологу клиники ООО «ЛМС», женских консультаций №3 и №8 г. Москвы. Были проанализированы результаты проведенных серологических исследованиий крови *(ВИЧ, сифилис, гепатиты В и С, краснуха, токсоплазмоз, вирус простого герпеса 1,2 типов, цитомегаловирусная инфекция)* и ПЦР-диагностики отделяемого цервикального канала (*C. trachomatis, M. genitalium, M. hominis, U. parvum, U. urealyticum, G. vaginalis, N. gonorrhoreae, T. vaginalis*).

Результаты

Средний возраст обследованных составил 30 лет (18-42 года). Большинство (81%) имели высшее или неоконченное высшее образование. 74,3% женщин замужем.

ВИЧ-инфекция была диагностирована у одной пациентки (0,2%), гепатит В – 1 случай (0,2%), гепатит С выявлен у 10 (2,4%), причем один случай являлся впервые выявленной инфекцией. Сифилис не был диагностирован ни у одной пациентки. Серопозитивными к *токсоплазме и вирусу краснухи* были 110 (28,1%) и 352 (89,8%) пациентки соответственно, IgM обнаружены не были. IgG к *цитомегаловирусу* имелись у 303 (77,5%) беременных. Были выявлены 6 (1,5%) случаев концентрации IgM, соответствующей серой зоне, из которых 1 при дальнейшем

обследовании подтвердился как реактивация латентной инфекции, остальные же результаты оказались ложноположительными. IgG к *вирусу простого герпеса 1 и 2 типов* обнаружены у 83,7% и 20,1% пациенток соответственно.

Хламидиоз был диагностирован у одной беременной из 176 (0,6%). *M. genitalium, N. gonorrhoreae, T. vaginalis* не были выявлены ни в одном из случаев. *M. hominis* была обнаружена у одной пациентки из 137 (0,7%), *U. parvum* у 7 из 44 (15,9%), *U. urealyticum* у 7 из 155 (4,5%), *G. vaginalis* у 8 из 44 (18,2%).

Данные по количеству обследованных женщин и распространенности инфекций приведены в таблице.

Заключение

По результатам ПЦР-исследования отделяемого цервикального канала обращает на себя внимание отсутствие таких абсолютных патогенов как *M. genitalium, N. gonorrhoreae u T. vaginalis*. Частота обнаружения условно патогенных микроорганизмов *U. urealyticum* (4,5%), *M. hominis* (0,7%) также значительно ниже общепопуляционных. Более высокие показатели распространенности были установлены в отношении *U. parvum* (15,9%) и *G. vaginalis* (18,2%). Распространенность гепатита С (2,4%) и В (0,2%) соответствует показателям развитых стран.[2,5] Результаты, полученные нами в отношении ВИЧ-инфекции (0,2%), ниже официальных данных по стране, это может быть связано с небольшой выборкой пациенток, а также с тем, что Московский регион является одним из относительно благополучных в России по распространенности ВИЧ.[7] Полученные низкие показатели заболеваемости токсоплазмозом коррелируют с таковыми в США и странах Северной Европы, в связи с чем возникает вопрос о целесообразности рутинного скрининга.[3] IgG к *вирусу краснухи* были обнаружены в 89,8% случаев, что, скорее всего, связано с возрастом пациенток (обязательная вакцинация введена в РФ только в 1996 г.). Распространенность цитомегаловирусной инфекции высока и является пограничным значением между показателями развитых и развивающихся стран.[1] Показатели распространенности *вируса герпеса 1 и 2 типа* несколько выше таковых в США и Европе.[4,6]

Серологическое исследование крови					
Инфекция	Кол-во обследованных	Отрицательно		Положительно	
ВИЧ	412	411 (99,8%)		1 (0,2%)	
Сифилис	412	412 (100%)		0	
Гепатит В	412	411 (99,8%)		1 (0,2%)	
Гепатит С	412	402 (97,6%)		10 (2,4%)	
IgG-IgM-			IgG-IgM+	IgG+IgM-	IgG+IgM+
Краснуха	392	40 (10,2%)	0	352 (89,8%)	0
Токсоплазмоз	391	281 (71,9%)	0	110 (28,1%)	0
Вирус простого герпеса-1	283	46 (16,3%)	0	234 (82,7%)	3 (1%)
Вирус простого герпеса-2	184	147 (79,9%)	0	35 (19%)	2 (0,2%)
Цитомегаловирус	391	83 (21,3%)	0	302 (77,2%)	6 (1,5%)
ПЦР-диагностика отделяемого цервикального канала					
Отрицательно				Положительно	
C. trachomatis	176	175 (99,4%)		1 (0,6%)	
N. gonorrhoreae	103	103 (100%)		0	
T. vaginalis	118	118 (100%)		0	
M. genitalium	162	162 (100%)		0	
M. hominis	137	136 (99,3%)		1 (0,7%)	
U. parvum	44	37 (84,1%)		7 (15,9%)	
U. urealyticum	155	148 (95,5%)		7 (4,5%)	
G. vaginalis	44	36 (81,8%)		8 (18,2%)	

Список литературы:

1. Daisuke Shigemi, Satoru Yamaguchi, Toshiaki Otsuka, Seiryu Kamoi, Toshiyuki Takeshita. Seroprevalence of cytomegalovirus IgG antibodies among pregnant women in Japan from 2009-2014 American Journal of Infection Control, Volume 43 , Issue 11 , 1218 – 1221

2. Dunkelberg J, Berkley E, Thiel K, Leslie K. Hepatitis B and C in pregnancy: a review and recommendations for care. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association*. 2014;34(12):882-891. doi:10.1038/jp.2014.167.

3. Flegr J, Prandota J, Sovičková M, Israili ZH. Toxoplasmosis – A Global Threat. Correlation of Latent Toxoplasmosis with Specific Disease Burden in a Set of 88 Countries. Fernandez-Reyes D, ed. *PLoS ONE*. 2014;9(3):e90203. doi:10.1371/journal.pone.0090203.

4. James SH, Sheffield JS, Kimberlin DW. Mother-to-Child Transmission of Herpes Simplex Virus. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*. 2014;3(Suppl 1):S19-S23. doi:10.1093/jpids/piu050.

5. Prasad MR, Honegger JR. Hepatitis C Virus in Pregnancy. *American journal of perinatology*. 2013;30(2):10.1055/s-0033-1334459. doi:10.1055/s-0033-1334459.

6. Sauerbrei A. Optimal management of genital herpes: current perspectives. *Infection and Drug Resistance*. 2016;9:129-141. doi:10.2147/IDR.S96164.

7. В.В. Покровский, Н.Н. Ладная, О.И. Тушина, Е.В. Буравцова. ВИЧ-инфекция. Информационный бюллетень №40. Москва, 2015. http://www.hivrussia.ru/files/bul_40.pdf

ГЕНОДИАГНОСТИКА ГЕРПЕТИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ У ЖЕНЩИН ПРИ НАРУШЕНИИ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ

Орлова К.А., Бруснигина Н.Ф., Махова М.А., Черневская О.М., Барышева Н.Н., Скобло Л.Е.

ФБУН «ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия

Введение. Одним из факторов, вызывающих нарушения репродуктивной функции, является инфицирование *вирусом простого герпеса 1 и 2 типа (ВПГ 1,2)*. Генитальный герпес - одна из самых распространенных форм герпетической инфекции и, по данным ВОЗ, занимает 3-е место среди ИППП, уступая по частоте гонорее и негонококковым уретритам. Зачастую герпетическая инфекция, обусловленная *ВПГ 1,2,* имеет тенденцию к латентному или рецидивирующему течению. Это объясняется тем, что *ВПГ 1,2* находится в чувствительных ганглиях пояснично го или крестцового отделов симпатической нервной системы и при неблагоприятных условиях происходит его активация. Помимо клинически манифестных форм герпетической инфекции, известны ее бессимптомные и скрытые формы. По литературным данным, пузырьковые поражения кожи встречаются только у 1/3 больных генитальным герпесом, и в этом случае повышается риск инфицирования плода в родах на 40-60%. Основным резервуаром инфекции у мужчин является мочеполовой тракт, а у женщин канал шейки матки. Источником инфекции могут быть не только больные с клинически выраженными симптомами заболевания, но и бессимптомные носители *ВПГ 1,2*. Специалисты считают, что инфицированность в*ирусами простого герпеса 1,2* может служить причиной неразвивающейся беременности в 20%, вторичного бесплодия – в 60%, невынашивания беременности – в 20%, внутриутробного инфицирования – в 20% случаев. Показано неблагоприятное, а порой и фатальное влияние *герпесвирусов* на течение беременности и родов, патологию плода и новорожденных. При беременности в связи с подавлением клеточного иммунитета возможно возникновение дессиминации вируса с поражением последа и инфицированием плода. Она может происходить как восходящим, так и гематогенным путем. При инфицировании *ВПГ 1,2* развиваются иммунодефицитные состояния, обусловленные недостаточностью различных звеньев иммунной системы и ее неспособностью элиминировать вирус из организма. По данным литературы, генитальный герпес может иметь типичное, атипичное и бессимптомное течение. Современной особенностью заболевания является тот факт, что на долю типичной формы приходится лишь 20%, атипичной – 60%, бессимптомной - 20% случаев. В нашей стране нет обязательной регистрации заболеваемости герпесвирусной инфекцией (ГВИ). Распространенность ГВИ среди женщин репродуктивного возраста вызывает большой интерес у практикующих врачей, особенно у гинекологов, акушеров и педиатров. Особенно актуальна проблема инфицированности *ВПГ 1,2* населения большого промышленного центра, в котором иммунитет человека постоянно подвергается воздействию многочисленных неблагоприятных экологических факторов среды.

Целью данной работы являлась оценка распространенности *вируса простого герпеса 1,2 типа* среди женщин с отягощенным акушерско-гинекологическим анамнезом.

Материалы и методы

В период с 2008 года по 2015 год обследовано 405 женщин, проживающих в Нижнем Новгороде и обратившихся в женские консультации с проблемами репродукции. Материалом для исследования служили 353 пробы соскобов эпителия слизистой цервикального канала и 52 пробы соскобов с пораженных участков кожи и слизистой, которые собирались в одноразовые пробирки «Эппендорф» согласно МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории».

Исследования проводились методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием коммерческих тест-систем, разработанных ЦНИИЭ (Москва). Обработка проб и выделение ДНК проводилось сорбционным методом коммерческим набором «ДНК-сорб А» и «ДНК-сорб В» разработки ЦНИИЭ (Москва). Реакция амплификации проводилась на термоциклере «Терцик-2М» («ДНК-технология», Москва). Визуализацию результатов

ПЦР осуществляли методом электрофореза в 2% агарозном геле с последующей регистрацией при помощи видеосистемы «Geldoc EZ» и программы «Image Lab» (Bio-Rad). Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica6,0. Достоверность определяли методом расчета ошибки среднего (m).

Результаты и их обсуждение

Результаты исследования показали, что в образцах соскобов эпителия цервикального канала *ВПГ1,2* выявлялся в 29,7% случаев. В пробах, содержащих материал с пораженных участков кожи (везикулы, язвочки) *вирус простого герпеса 1,2* выявлялся в 65,4 % (таблица 1).

Таблица 1. Частота выявления ВПГ 1,2 в различных биологических субстратах

Субстрат	Количество проб (n)	Частота выявления *ВПГ 1,2*	
		Абс.ч. (n)	%
Соскоб цервикального канала	353	105	29,7±2,4
Соскобы с пораженных участков кожи и слизистой	52	34	65,4± 6.6

Заключение.

Установлена высокая распространенность *вируса простого герпеса 1,2 типа* (29,7%) у женщин с отягощенным акушерско-гинекологическим анамнезом, проживающих в Нижнем Новгороде.

Наиболее информативным при генитальном герпесе является исследование биологического материала, забранного с пораженного участка кожи или слизистой. Высокая частота выявления *ВПГ1,2* в этих пробах (65,4%) свидетельствует о необходимости своевременного и обязательного обследования женщин с подозрением на герпетическую инфекцию для назначения специфической этиотропной терапии.

Результаты исследования свидетельствуют о целесообразности диспансеризации женщин, у которых выявлялись герпесвирусы, что имеет особое значение для женщин, планирующих беременность. Подобная тактика поможет избежать осложнений во время беременности и родов и предупредить инфицирование плода.

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА В СКРИНИНГЕ БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН НА ИНФЕКЦИИ, ПЕРЕДАЮЩИЕСЯ ПОЛОВЫМ ПУТЕМ

Руднева Н.С.

ГУЗ «Тульский областной клинический кожно-венерологический диспансер» Министерства здравоохранения Тульской области, г. Тула, Россия

Введение. Одной из приоритетных задач здравоохранения является улучшение демографической ситуации. С 2012-2016 гг. в Тульской области действовала государственная программа, направленная на «УЛУЧШЕНИЕ ДЕМОГРАФИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ И ПОДДЕРЖКУ СЕМЕЙ, ВОСПИТЫВАЮЩИХ ДЕТЕЙ, В ТУЛЬСКОЙ ОБЛАСТИ», одной из целей данной программы было снижение репродуктивных потерь населения. В 2013 г. в регионе было принято решение об организации скрининга беременных женщин на инфекции, передающиеся половым путем, которые оказывают негативное влияние на женщину и будущего ребенка, способствуя невынашиванию, преждевременным родам, инфицированию плода и развитию внутриутробной патологии (Павлов О.Г., 2010 Rumyantseva T. 2015), приводящей к антенатальной и перинатальной гибели (WHO 2015. Draft global health sector strategy on sexually transmitted infections, 2016–2021, Holt M. 2016)

Цель: анализ данных скрининга беременных женщин на инфекции, передающиеся половым путем (ИППП).

Материалы и методы: с 2013 г. в Тульской области дерматовенерологической службой осуществляется скрининг беременных женщин на инфекции, передающиеся половым путем. В период 2013-2016 гг. 40768 пациенток было обследовано для исключения гонореи, трихомониаза, на хламидийную микоплазменную инфекции исследования проведены у 42466 беременных женщин. В начале скрининга исследование на ИППП выполнялись беременным женщинам группы риска с отягощенным акушерским анамнезом (невынашивание, выкидыши, преждевременные роды, мертворождение, рождение детей с низкой массой тела, ранее перенесенные ИППП). Диагностика гонореи и трихомониаза проводилась путем микроскопии, рекомендованной приказом МЗ РФ от 01.11.2012 г. 572н, поэтому число обследованных в период с мая 2013 г. (начало скрининга) до 01.09.2014 г. , когда был внедрен молекулярно-биологический метод с применением мультиплексного теста, позволяющего определить одномоментно в одном материале *N.gonorehoae, C.trachomatis, M.genitalium, T.vaginalis* на 22% меньше чем количество обследованных беременных женщин на хламидийную и микоплазменную инфекции, возбудители которых выделялись с помощью амплификации нуклеиновых кислот. С сентября 2014 г. для диагностики ИППП используются наборы реагентов для проведения мультиплексной ПЦР в реальном времени «АмплиСенс® *N.gonorehoae/C.trachomatis/M.genitalium/T. vaginalis* - МУЛЬТИПРАЙМ-FL». В 2015-2016 гг. скрининг на ИППП выполнялся большинству беременных женщин без учета отягощенного акушерского анамнеза.

Результаты. В 2013-2014 гг. 67% женщин, взятых на учет акушером-гинекологом по поводу беременности были обследованы на ИППП, 82% группы риска. В 2015 г. обследовано 91,1% беременных, 100% группы риска, в 2016 г. – 94,1% вставших на учет по поводу беременности, 100% женщин с отягощенным акушерским анамнезом.

Число инфицированных беременных женщин составило в 2013 г. 7,5%, увеличившись с началом использования «МУЛЬТИПРАЙМ-FL» до 9,2% в 2014-2016 гг. Частота гонорейной и трихомонадной инфекций у беременных женщин в период 2013-2014 гг. диагностируемых с использованием микроскопии отмечалась на уровне 0,02% и 0,5% соответственно. Хламидиоз выявлялся у 4,5-5% беременных женщин, микоплазмоз – колебался от 2,1-3,2%. В первые месяцы внедрения мультиплексного теста ПЦР в реальном времени уровень выявления гонореи вырос в 15 раз и составил 0,3%, а трихомонадной инфекции в 6 раз до 3,2%. В 2015-2016 гг. в структуре заболеваемости на первом месте отмечалась хламидийная инфекция – 4,2%, на втором месте по частоте встречаемости – трихомонадная инфекция – 2,65%, микоплазмоз выявлялся в 2,3% случаев, уровень гонококковой инфекции оставался стабильным, достигая 0,3%. Микроскопически *N.gonorehoae* в 2015-2016 гг. выявлялась в 0,01% случаев, *T.vaginalis* - 0,2%.

Таблица 1

Сравнительная характеристика методов лабораторной диагностики ИППП у беременных женщин

Периоды	Микроскопический метод		ПЦР-метод в реальном времени	
	N.gonorehoae	T.vaginalis	N.gonorehoae	T.vaginalis
2013-2014 гг.	0,02%	0,5%	0,3%	3,2%
2015-2016 гг.	0,01%	0,2%	0,3%	2,65%

Используя мультиплексную тест-систему, стало возможно одномоментно выявлять микст- инфекции. За время наблюдения сочетанные ИППП были обнаружены у 9% беременных женщин. Микроскопически микст-инфекции не определялись.

Клиническая картина ИППП у беременных женщин характеризовалась незначительными проявлениями. Жалобы предъявляли только 24% пациенток, в большинстве случаев на выделения, которые клинически не имели специфических особенностей для различных инфекций. Ведущим симптомом при осмотре также являлись выделения из влагалища и цервикального канала, частота встречаемости - 55%.

Выводы. Применение мультиплексного теста амплификации дает возможность охватить скринингом максимальное число беременных женщин. Использование молекулярно-биологического метода диагностики ИППП в реальном времени у беременных женщин позволяет значительно улучшить выявляемость гонорейной и трихомонадной инфекций. Несмотря на высокую специфичность, чувствительность микроскопии многократно ниже ПЦР-метода.

Список используемой литературы

1. Павлов О. Г. Системный подход к анализу причин развития инфекций у новорожденных в раннем неонатальном периоде //Вестник новых медицинских технологий. – 2010. – Т. 17. – №. 3.

2. Rumyantseva T. et al. Evaluation of the new AmpliSens multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of Neisseria gonorrhoeae, Chlamydia trachomatis, Mycoplasma genitalium, and Trichomonas vaginalis //Apmis. – 2015. – Т. 123. – №. 10. – С. 879-886.

3. World Health Organization et al. A tool for strengthening STI surveillance at the country level //Geneva, Switzerland: WHO Document Production Services. – 2015.

4. Holt M. Sexually Transmitted Infections //The Wiley Blackwell Encyclopedia of Gender and Sexuality Studies. – 2016.

5. World Health Organization et al. Draft global health sector strategy on sexually transmitted infections, 2016–2021. – 2015.

ВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ЛАКТОБАКТЕРИЙ В ВАГИНАЛЬНЫХ МАЗКАХ БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН Г. МОСКВЫ

Кошечкин С.И.[1], Иванова Н.В.[2], Духанина Н.С.[2], Заруцкая Г.Н.[3], Багдалова Ф.А.[3], Медетханова Ф.Г.[3], Навбатникова Е.В.[3], Демкин В.В.[1]

[1]ФГБУН «Институт молекулярной генетики» Российской академии наук, Москва, Россия

[2]ГБУЗ «Центр планирования семьи и репродукции» Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

[3]ГБУЗ МО «Королёвская городская больница», филиал Костинский, женская консультация, г. Королев, Московская область, Россия

Влияние микробиоценоза влагалища на течение беременности и ее исход вызывает большой интерес. Лактобактерии являются одним из основных компонентов влагалищной микрофлоры. Считается, что именно эти бактерии играют ключевую роль в поддержании здоровья и нормального функционирования женской репродуктивной системы. Большинство исследований по изучению микробиоценоза влагалища во время беременности сосредоточено на определении бактериальной нагрузки и доли лактобактерий в общей совокупности микробиоты,

тогда как видовому составу лактобактерий в таких исследованиях уделяется недостаточно внимания.

Целью настоящей работы являлась оценка видового разнообразия и распространенности различных видов лактобактерий в вагинальных образцах беременных женщин, наблюдавшихся в Центре планирования семьи и репродукции Департамента здравоохранения города Москвы и Женской консультации Королёвской городской больницы г. Королева Московской области.

Видовую идентификацию лактобактерий и их количество в вагинальных мазках проводили методом ПЦР в реальном времени с использованием тест-систем ООО «НаноДиагностика» для научного применения. Использованные тест-системы обеспечивали определение общего количества бактериальной ДНК, общего количества ДНК лактобактерий, идентификацию и количественную детекцию индивидуальных видов лактобактерий *L.iners, L.crispatus, L.jensenii, L.gasseri, L.acidophilus, L.helveticus*. Оценку показателей количества лактобактерий нормировали по отношению к общей бактериальной массе. Всего были исследованы 2 группы женщин: группу беременных составили 98 женщин в возрасте 22 - 47 лет, в группу небеременных вошли 43 женщины в возрасте 19 - 43 года. Все обследованные женщины не имели воспалительных и инфекционных заболеваний половых органов.

В группе небеременных женщин содержание лактобактерий в вагинальной микробиоте обычно составляло более 20% с медианой 46,8%. У 2-х небеременных женщин наличие лактобактерий не определялось, а еще у 2-х женщин содержание лактобактерий в микробиоценозе составляло менее 5% от общей бактериальной массы. Частоты выявления отдельных видов составляли: *L.iners* – 48,8%, *L.crispatus* – 41,9%, *L. jensenii* – 16,3%, *L. johnsonii /L.gasseri* – 2,3%. В одном образце была выявлена *L.acidophilus*. Часть образцов (18,6%) содержали 2 или 3 вида лактобактерий. В группе беременных женщин среднее содержание лактобактерий было заметно больше (55,4%), чем в группе небеременных женщин. У 5 пациенток лактобактерии не определялись или их содержание составляло менее 1% в составе микробиоты. Частоты выявления отдельных видов лактобактерий в группе беременных женщин составляли: *L.iners* – 34,7%, *L.crispatus* – 48,0%, *L.jensenii* – 22,4%, *L. johnsonii /L.gasseri* – 11,2%. Следует отметить увеличенную пропорцию доминирования *L.crispatus* и *L.johnsonii/L.gasseri* у беременных женщин по сравнению с группой небеременных женщин. Число образцов с 2 и 3 видами лактобактерий было на том же уровне – 18,4%.

Детализация видового разнообразия выявленных лактобактерий в группе беременных женщин на разных сроках беременности представлена в таблице 1.

Таблица 1. Частота выявления доминирующих видов лактобактерий в вагинальных мазках беременных женщин на разных сроках беременности

		Всего проб	*L.iners*	*L.jensenii*	*L.gasseri L.johnsonii*	*L.crispatus*	2-3 вида
Все беременные	Кол-во проб	98	34	22	11	47	18
	%		34,7	22,4	11,2	48,0	18,4
1 триместр	Кол-во проб	13	1	0	2	7	0
	%		7,7	0,0	15,4	53,8	0,0
2 триместр	Кол-во проб	59	22	16	7	27	14
	%		37,3	27,1	11,9	45,8	23,7
3 триместр	Кол-во проб	4	2	2	0	1	1
	%		50,0	50,0	0,0	25,0	25,0

Обращает на себя внимание преобладание *L.crispatus* на ранних сроках беременности и постепенное распространение, переходящее в доминирование, *L.iners* и *L.jensenii* начиная со средних сроков беременности.

Таким образом, видовое разнообразие лактобактерий в вагинальных микробиотах как беременных, так и небеременных женщин исчерпывалось практически 4 видами лактобктерий. Количественное доминирование лактобактерий в микробиотах немного различается у беременных и небеременных женщин, но, по нашему мнению, носит вторичный характер и не связано напрямую с беременностью. Различия в доминировании отдельных видов лактобактерий у беременных женщин, носит сложный и, по-видимому, не случайный характер. Выяснение причин и закономерностей отмеченных вариаций требует дальнейших исследований.

ИППП У ПАЦИЕНТОК С ДИСТРОФИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ВУЛЬВЫ

Халидова Х.Р., Порсохонова Д.Ф., Ибрагимова Г.Р.

Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр дерматологии и венерологии МЗ РУз, Ташкент, Узбекистан

Введение. Причины возникновения, патогенетические аспекты, лечение и профилактика дистрофических заболеваний вульвы (ДЗВ), несмотря на большое количество исследований, остаются дискутабельными.

Некоторые исследователи возникновение дистрофических заболеваний гениталий связывают с инфекциями, передающимися половым путем. Этиологическая санация от некоторых ИППП при ДЗВ дает стойкий клинико-микробиологический эффект и уменьшение/исчезновение основного симптома – зуда. На основании собственных исследований мы придерживаемся мнения, что в преобладающем большинстве случаев в основе стойкого мучительного зуда и последующей дистрофии лежит инфекционный фактор, где существенную роль играют вирусы [1,2,3].

ДЗВ считаются одними из трудноизлечимых заболеваний, причиняющим женщинам моральные страдания и дискомфорт. Высокая частота озлокачествления (9-50%) делает эту проблему особо значимой и диктует необходимость изучения механизмов этиопатогенеза и лечения [1,4].

Цель исследования: изучить спектр ИППП (различные виды вирусной и урогенитальной инфекции) у пациенток с ДЗВ и оценить их возможную роль в развитии дистрофии в процессе антимикробной терапии

Материал и методы исследования. Под клиническим наблюдением находились 30 пациенток с ДЗВ в возрасте от 18 до 65 лет, среди которых встречались склероатрофический лихен, гиперпластическая дистрофия, лейкоплакия. В работе использованы данные полученные в ПЦР лаборатории Республиканского специализированного научно-практического медицинского центра дерматологии и венерологии МЗ РУз. Спектр определяемых с помощью ПЦР возбудителей включал: *Chlamidia trachomatis, Mycoplasma hominis Mycoplasma genitalium, Trichomonas vaginalis, Ureaplasma spp. (Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum), Gardnerella vaginalis, Neisseria gonorrhoeae, Candida spp., папилломавирусы, вирусы герпеса 1 и 2 типов, цитомегаловирус*. При диагностике всех инфекций использовался амплификатор «Rotor-Gene 6000» «Corbett Research» с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени». Использовались комплекты реагентов для выделения, амплификации производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

Результаты. При клинико-анамнестическом обследовании выяснилось, что основная часть пациенток предпочитает скрывать данное заболевание из чувства стеснения и убежденности в неизлечимом исходе. По этой же причине ряд пациенток годами не обращались за медицинской помощью, либо использовали топические стероиды средней и слабой силы 5-го и 7-го класса. Жалобы пациенток характеризовались болезненностью, зудом, диспареунией, дизурией, приведших 23 (65,7%) пациенток к неврозу, вегето-сосудистой дистонии, депрессии. Основным беспокойством пациенток был зуд вульвы различной интенсивности, периодичности и длительности, который при оценке колебался от 3 до 5 баллов.

В процессе проведенных исследований из группы ИППП в виде моноинфекции или в сочетании были выявлены следующие патогены: у 26,7% больных – *Ureaplasma spp*., у 10% больных *Chl.trachomatis*, у 43,3% - *Gardnerella vaginalis, Mycoplasma genitalium* – у 3,3%, грибы рода *Candida* – у 56,7% больных, *CMV* – у 13,3%, *HSV I/II* – у 13,3%, *HPV 16/18* -у 46,7%.

Как показали результаты исследования наблюдается высокая частота встречаемости ИППП у пациенток с ДЗВ, в особенности *Ureaplasma spp* (26,7%), *HPV 16/18* (46,7%) и сопутствующих инфекций *Gardnerella vaginalis* (43,3%), грибов рода *Candida* (56,7%). Нами проведена комплексная терапия, включавшая антибактериальные препараты с учетом микробной чувствительности, противовирусное лечение, иммуностимуляторы и фотодинамическая терапия с фотосенсом метиленовая синь от 8 до 10 сеансов. В результате проведенного лечения зуд купировался у 86,7% пациенток.

Выводы. Таким образом, инфицирование половых путей *уреаплазмами, ВПЧ, грибами, гарднереллами* повышает риск возникновения дистрофических и пролиферативных изменений. Длительная персистенция данных видов инфекций может влиять на течение и исход заболевания в исследуемой группе пациентов. Кроме того, полученные результаты позволяют предположить, что ключевую роль в происхождении зуда вульвы у наблюдаемых пациенток играют эти же возбудители. Происхождение зуда может реализоваться за счет богатой антигенной структуры перечисленных возбудителей и активации кинин-простагландиновой системы, которую запускает ферментативная активность некоторых инфекций.

Список используемой литературы.

1. Ашрафян Л.А., Харченко Н.В., Киселев В.И. Рак вульвы: этиопатогенетическая концепция. М. 2006. 192 с.

2. Реуцкая М.А., Кулинич С.И. Роль инфекций в генезе заболеваний вульвы // Сибирский медицинский журнал. 2010. № 6. С. 239–242.

3. Шарапова Л.Е. К вопросу об этиологии и патогенезе хронических дистрофических заболеваний вульвы // Российский вестник акушерства и гинекологии. 2010. № 1. С.29–34.

4. Юдина М.М., Тропинина Г.Г., Львов А.Н., Иванов О.Л. Нейроанатомические и нейрофизиологические аспекты зуда // Российский журнал кожных и венерических болезней. 2009. №3. С.28–33.

МИКРОБИОЦЕНОЗ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА У ПАЦИЕНТОВ С ДИСТРОФИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ВУЛЬВЫ

Халидова Х.Р., Ибрагимова Г.Р., Порсохонова Д.Ф.

Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр дерматологии и венерологии МЗ РУз, Ташкент, Узбекистан

Введение

Среди причин, возможно вызывающих дистрофические изменения вульвы (ДЗВ), до сих пор нет единого мнения. В этиопатогенезе данной патологии наряду с такими многочисленными теориями как гормональная, генетическая, нейрогенная, аутоиммунная, объясняющие происхождение этих процессов, имеется вирусно-инфекционная, которая связывает эти процессы с *ВПЧ (HPV), вирусом простого герпеса I и II типа (HSV I / II), цитомегаловирусом (CMV)* [1,4]. А в инфекционной составляющей не исключается влияние условно-патогенных микроорганизмов (аэробно-анаэробно-бактериально-грибковых ассоциаций). Многие условно-патогенные микроорганизмы (УПМ) входят в состав нормальной микрофлоры или являются облигатными патогенами человека. Среди таких возбудителей грамотрицательные, грамположительные микроорганизмы, аэробные и анаэробные бактерии. Считается, что, с одной стороны, данные микроорганизмы являются представителями нормальной микрофлоры репродуктивной системы и, препятствуя заселению патогенов, обеспечивают колонизационную резистентность экологической ниши. С другой стороны, при определенных условиях, приобретая агрессивные потенции, могут явиться этиологическим фактором воспалительного процесса [2,3,4].

Цель исследования – определить частоту встречаемости различных микроорганизмов ассоциированных с условно-патогенной микрофлорой у пациентов с дистрофическими заболеваниями вульвы.

Материал и методы

Под нашим наблюдением находилиось 30 пациенток с ДЗВ, среди которых были диагностированы склероатрофический лихен, гиперпластическая дистрофия, лейкоплакия. Возрастные колебания наблюдаемых пациенток находились в пределах от 18 до 65 лет. У всех пациенток было проведено молекулярно-генетическое и микробиологическое исследование отделяемого мочеполовых путей с определением чувствительности сопутствующей микрофлоры к антибиотикам. В работе использованы результаты, полученные в бактериологической и ПЦР лаборатории Республиканского специализированного научно-практического медицинского центра дерматологии и венерологии МЗ РУз. Для детекции *Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealyticum, Gardnerella vaginalis, Candida spp.* использовались тест-системы производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

Основные результаты

В процессе проведенных исследований наиболее часто из представителей условно-патогенной микрофлоры встречались St. epidermidis, Enterobacter, St. saprophyticus. Сопутствующая микробная флора у больных представлена следующими микроорганизмами: *Gardnerella vaginalis* выявлена у 13 (43,3%), *Staphylococcus aureus* - у 6 (20%), *St. epidermidis* – у 8 (26,7%), *St. Saprophyticus* – 10 (33,3%), *Enterobacter* – 8 (26,7%), *St. Haemolyticus* - 5 (16,7%), грибы рода *Candida* – у 17 (56,7%), *Enterococceae spp*. - 1 (3,3%). *Ureaplasma urealyticum* встречалась у 18,7% больных, *Mycoplasma hominis* не была обнаружена ни в одной из групп нозологий.

52,4% микроорганизмов, ассоциированных с условно-патогенной микрофлорой выявлены в группе женщин со склероатрофическим лихеном, в группе с гиперпластической дистрофией они составили 20,6%. Грибы рода *Candida* в основном выявлены у пациенток с лейкоплакией – у 7 пациенток (23,3%).

Среди сочетанного микст-инфицирования были выявлены многокомпонентные сочетания, приводящие к более выраженным инфекционно-воспалительным и дисбиотическим нарушениям: *Ureaplasma urealyticum + Gardnerella vaginalis + St. haemolyticus*; *Gardnerella vaginalis + St. haemolyticus + Enterobacter*; *Gardnerella vaginalis + Candida*; *Candida + Enterobacter*; *Candida + St. Haemolyticus, Ureaplasma urealyticum + Candida*.

Заключение

Таким образом, результаты ПЦР и микробиологического исследования отделяемого урогенитального тракта показали, что наиболее часто выявляемыми микроорганизмами являются *Gardnerella vaginalis,* грибы рода *Candida, St. epidermidis, Enterobacter, St. Saprophyticus*. Выявлена значительная распространенность микроорганизмов, ассоциированных с условно-патогенной флорой, в виде моно- и микст-инфекции. Многообразие видового состава представителей УПМ диктует своевременность и полноценность обследования.

Список используемой литературы

1. Ашрафян Л.А., Харченко Н.В., Киселев В.И. Рак вульвы: этиопатогенетическая концепция. М. 2006. 192 с.

2. Галиханова Э.Э. Особенности клинического течения и лечения кандидозных инфекций у женщин с дистрофическими заболеваниями вульвы и влагалища. Автореф…канд. мед.наук. М.2012.

3. Реуцкая М.А., Кулинич С.И. Роль инфекций в генезе заболеваний вульвы // Сибирский медицинский журнал. 2010. № 6. С. 239–242.

4. Шарапова Л.Е. К вопросу об этиологии и патогенезе хронических дистрофических заболеваний вульвы // Российский вестник акушерства и гинекологии. 2010. № 1. С.29–34.

AEROBIC VAGINITIS: NO LONGER A STRANGER

Gilbert GG Donders[1,2], Gert Bellen[1], Svitrigaile Grinceviciene[1,3], Kateryna Ruban[1], Pedro Vieira-Baptista[4]

[1] Femicare vzw, Tienen, Belgium
[2] Department of Obstetrics & Gynaecology Antwerp University, Antwerp, Belgium
[3] Vilnius University Institute of Biotechnology Department of Biothermodynamics and Drug Design, Vilnius, Lithuania
[4] Department of Gynaecology and Obstetrics, Centro Hospitalar de São João, Porto, Portugal

Aerobic vaginitis (AV) is the name given in 2002 to a vaginal infectious entity, which was not recognized as such before. It is characterized by a dysbiotic vaginal microflora containing aerobic, enteric bacteria, variable levels of vaginal inflammation and deficient epithelial maturation. Although AV and bacterial vaginosis (BV) share some characteristics, such as a diminished number or absence of lactobacilli, an increased discharge (fishy smelling in BV while in severe forms of AV, a foul, rather rotten smell may be present) and increased pH (often more pronounced in AV), there are also striking differences between both. There is no inflammation in women with BV, whereas the vagina of women with AV often appears red, edematous and may even display small erosions or ulcerations. The color of the discharge in BV is usually whitish, or grey, and of a watery consistency whereas in AV it is yellow to green and rather thick and mucoid. Women with BV do not have dyspareunia, while some women with AV do. Finally, the microscopic appearance differs in various aspects, such as the presence of leukocytes and parabasal cells in AV and the absence of granular flora, typical of BV. Despite all these differences, the distinction between AV and BV was not recognized in many former studies, leading to incomplete and imprecise diagnostic workouts and erroneous management of patients, in both clinical and research settings.

The prevalence of AV ranges between 7-12% and is, therefore, less prevalent than BV. Although still largely undiagnosed, many researchers and clinicians increasingly take it into account as a cause of symptomatic vaginitis. AV can co-occur with other entities, such as BV and candidiasis. It can be associated with dyspareunia, sexually transmitted infections (such as human papilloma virus, human immunodeficiency virus, *Trichomonas vaginalis* and *Chlamydia trachomatis*), chorioamnionitis, fetal infection, preterm birth, and cervical dysplasia. Many other possible pathological associations are currently under investigation.

The diagnosis of AV is made using wet mount microscopy, ideally using phase contrast. An AV score is calculated, according to: lactobacillary grade, presence of inflammation, proportion of toxic leukocytes, characteristics of the background flora and presence of immature epithelial cells. To circumvent the hurdle of microscopic investigation some groups started to develop nucleic acid based and enzymatic diagnostic tests, but the detailed information obtained with phase contrast microscopy is irreplaceable.

The best treatment is not yet fully determined, but it must be tailored according to the microscopic findings and the patient's needs. There is a role for local estrogen therapy, corticosteroids, antimicrobials and probiotics. More research will reveal more precise data on diagnosis, pathogenesis, management, and prevention.

ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ПРОСТАТИТОМ

Казакова Л.А.[1], Короткова А.Ф.[2], Туркина И.А.[1], Жук А.А.[2], Денисова Е.В.[1], Устюжанина А.В.[1]

[1] ООО «Кабинет лабораторных исследований «ОВУМ», Кемерово, Россия
[2] ЧУЗ «Поликлиника «ОВУМ», Кемерово, Россия
Директор ООО «Кабинет лабораторных исследований «ОВУМ» – к.м.н. Тимощук Г.И.

Хронический простатит является наиболее распространенным среди мужских урологических заболеваний. Его рассматривают как воспалительное заболевание инфекционного генеза с возможным присоединением аутоиммунных нарушений, он поражает мужчин разного возраста, вызывая расстройство копулятивной и генеративной функций. Часто воспалительные заболевания предстательной железы протекают бессимптомно и вызываются полимикробными сообществами, состоящими как из безусловных патогенов, так и из условно-патогенных бактерий.

Лучшим для диагностики инфекций урогенитального тракта является прямой метод обнаружения возбудителей - ПЦР Real-time, который характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью, высокой скоростью получения результата, возможностью количественного анализа и возможностью диагностики некультивируемых микроорганизмов.

Оптимальным для этиологической диагностики урогенитальных инфекций у мужчин является использование комплексного количественного ПЦР-теста «Андрофлор», в состав которого входит определение общей бактериальной массы, нормофлоры, наиболее часто встречающихся безусловных патогенов и условно-патогенных инфекций.

Цель исследования. Оценка качественного и количественного состояния микрофлоры эякулята у пациентов с хроническим простатитом.

Материалы и методы. Было обследовано 96 мужчин с диагнозом хронический простатит. Возраст обследованных от 27 до 45 лет (средний возраст 36 лет).

Исследуемый материал - эякулят. Исследование проводилось методом ПЦР Real-time с помощью наборов «Андрофлор» фирмы ООО «ДНК-Технология», Москва, Россия на амплификаторе «ДТ-96», производитель ООО «ДНК- Технология», Москва, Россия.

Результаты исследования. Нормоценоз регистрировался в 26% (25), все пациенты с нормоценозом были обследованы в период ремиссии заболевания.

Дисбиоз определялся в 74% (71). По уровню снижения нормофлоры дисбиоз подразделялся на: незначительный в 22% (21), умеренный в 23% (22), выраженный в 29% (28). Среди пациентов с дисбиозами 87,3% (62) были в периоде обострения заболевания, а 12,7% (9) в периоде ремиссии.

Показатель общей бактериальной массы у обследуемых пациентов колебался в пределах $10^{3,7}$-$10^{8,1}$. Во всех пробах с высоким показателем ОБМ (более 10^4) выявлялся дисбиоз.

Среди пациентов с дисбиозами наиболее часто, в 50,7% (36), выявлялись повышенные концентрации одной или нескольких групп условно-патогенных анаэробных микроорганизмов (*Bacteroides spp./Porphyromonas spp./ Prevotella spp., Anaerococcus spp., Peptostreptococcus spp./ Parvimonas spp., Eubacterium spp.*), что позволило диагностировать анаэробный дисбиоз.

Аэробный дисбиоз, вызванный такими группами микроорганизмов, как *Pseudomonas aeruginosa/Ralstonia spp./Burkholderia spp., Heamophilus spp., Enterobacteriaceae/ Enterococcus spp.*, регистрировался в 26,8% (19), смешанный дисбиоз определялся в 22,5% (16).

У 43,8% (42) обследованных выявлялась повышенная концентрация транзиторной микрофлоры, ассоциированной с бактериальным вагинозом: *Gardnerella vaginalis, Atopobium cluster, Megasphaera spp./ Veilonella spp./Dialister spp., Sneathia spp./Leptotrihia spp. / Fusobacterium spp., Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum, Mycoplasma hominis.*

Дрожжеподобные грибы *Candida spp.* регистрировались у 7,3% (7) обследованных.

Специфические возбудители выявлялись у 16,7% (16) обследованных: *Mycoplasma genitalium* выявлены у 5,2% (5), *Trichomonas vaginalis* у 3,1% (3), *Neisseria gonorrhoeae* у 2,1% (2), *Chlamydia trachomatis* у 6,3% (6). У всех пациентов со специфической микрофлорой регистрировался выраженный дисбиоз.

Выводы.

1. Наиболее часто инфекционными агентами при хроническом простатите являются группы условно-патогенных микроорганизмов, они регистрировались у 57,3% (55) обследованных, тогда как специфические возбудители выявлялись только у 16,7% (16).

2. Наиболее частым этиологическим агентом дисбиозов при хроническом простатите являются условно-патогенные микроорганизмы анаэробной группы, они встречаются в 50,7% дисбиозов.

3. ПЦР-исследование позволяет выявлять не только клинически выраженные, но и бессимптомные формы заболеваний, у 12,7% обследованных дисбиоз микрофлоры выявился в период клинической ремиссии.

4. Комплексное ПЦР-исследование «Андрофлор» позволяет быстро и качественно проводить индивидуальную оценку состояния микрофлоры урогенитального тракта мужчины, выявлять этиологический фактор воспалительного процесса, уровень микробной обсемененности и выбрать направленную этиологически обоснованную лекарственную терапию для сохранения репродуктивного здоровья мужчины.

Раздел 8. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ В ДИАГНОСТИКЕ ВНУТРИУТРОБНЫХ ИНФЕКЦИЙ

ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ У ДЕТЕЙ Г. АЛМАТЫ

Орадова А.Ш., Махамедов Б., студент 5-го курса факультета общей медицины

Казахский национальный медицинский университет имени С. Д. Асфендиярова, Алматы, Республика Казахстан

Введение. Цитомегаловирусная инфекция (ЦМВИ) – одно из самых распространенных вирусных поражений у человека. Европейским региональным бюро ВОЗ оно отнесено к группе болезней, которые определяют будущее инфекционной патологии. По данным серологических исследований, проведенных в разных странах Европы и Америки, маркеры ЦМВИ выявляются у 40-60% детей в возрасте до 5 лет.

Цель работы. Проведение ПЦР-диагностики ЦМВИ у новорожденных детей г. Алматы, Республика Казахстан.

Материалы и методы исследования. В исследование были включены 50 детей до года с клиническими симптомами внутриутробной инфекции (ВУИ). Для диагностики ЦМВИ использовали молекулярно-биологический и иммуноферментный методы. ДНК вируса определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). В качестве клинических образцов исследовали кровь, мочу, слюну. У детей с неврологической симптоматикой дополнительно исследовали спинномозговую жидкость.

Результаты исследования. От 50 новорожденных детей было проанализировано 107 проб крови, мочи, слюны и спинномозговой жидкости. Методом ПЦР ДНК вируса была обнаружена в 34 образцах (68%). Так как обнаружение ЦМВ у ребенка 1-й недели жизни свидетельствует о внутриутробной инфекции, можно констатировать, что среди обследованных 50 недоношенных новорожденных внутриутробная инфекция была вызвана цитомегаловирусом. При этом у 3-х детей были определены анти-ЦМВ-IgM, что коррелировало с обнаружением большого количества вируса в клинических материалах. При этом в некоторых случаях у детей с ВУИ инфекционная активность ЦМВ в биологических жидкостях была очень высокой. Отсутствие противовирусных антител, так же как и присутствие АТ с низкой авидностью, служит основанием для подозрения дальнейшего развития ЦМВИ. В связи с этим было проведено изучение инфицированных детей в динамике. 10 детей были повторно обследованы в течение трех месяцев после рождения на наличие прямых маркеров ЦМВ. Анализ данных показал, что у 19 (38%) детей методом ПЦР были обнаружены прямые маркеры ЦМВ. При этом у 6 из 10 детей, в клинических материалах от которых был найден инфекционный ЦМВ, вирусная нагрузка была высокой (от 10 000 вирусных частиц до 110 000 в 1 мл мочи). У 2-х из этих 6 детей были идентифицированы также маркеры острого инфекционного процесса анти-ЦМВ-IgM. Повторные обследования детей с ЦМВИ показали исчезновение прямых маркеров инфекции спустя 2 месяца у 16 (32%) детей.

Выводы. Таким образом, использование количественных методов оценки ДНК ЦМВ помогает судить о форме и стадии заболевания, предсказать его исход и своевременно начать лечение. При этом очень важным является комплексное лабораторное обследование детей с признаками внутриутробной ЦМВИ в динамике. Отрицательный результат лабораторного обследования в первые дни жизни не исключает возможности отсроченной реализации внутриутробной ЦМВИ в течение первого года жизни.

СЛУЧАЙ ЛИХОРАДКИ ЗИКА У БЕРЕМЕННОЙ ЖЕНЩИНЫ, МОСКВА, 2016

Карань Л.С.[1], Григорьева Я.Е.[1], Сайфуллин М.А.[2], Федорова М.В.[1], Журенкова О.Б.[1], Маленов М.Т.[1], Стуколова О.А.[1,3], Базарова М.В.[2], Девяткин А.В.[2], Шипулин Г.А.[1], Малеев В.В.[1]

ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия
ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница №1 Департамента здравоохранения г. Москва», Москва, Россия
ФГБНУ «НИИ медицины труда РАН», Москва, Россия

Лихорадка Зика (ЛЗ) – природно-очаговая арбовирусная инфекция, возбудитель которой вирус Зика (ВЗ, ZIKV) относится к роду *Flavivirus* семейства *Flaviviridae*. Резервуаром инфекции являются инфицированный человек или обезьяны. Передача вируса осуществляется в основном трансмиссивным путем, но также регистрируются случаи половой передачи инфекции. Основное социальное и медицинское значение имеет внутриутробная передача вируса плоду. Вирус Зика способен вызывать значительные нарушения со стороны ЦНС в процессе ее формирования: гипоплазию мозжечка, вентрикуломегалию, образование кальцификатов в корково-подкорковой зоне, микроцефалию, пахигирию (расширение извилин больших полушарий мозга и уменьшение количества мозговых борозд вплоть до агирии, когда в некоторых отделах мозга борозды отсутствуют и извилины вообще не различаются, вес головного мозга при этом, как правило, уменьшен). Клетки двигательной коры часто остаются на стадии эмбрионального развития. Наиболее опасным для развития такого рода осложнений является инфицирование вирусом Зика в первый и в начале второго триместров беременности. Процент развития патологии ЦНС плода при инфицировании матери в первом триместре беременности составляет от 1до 13%, во втором – от 0 до

0,7% и в третьем – от 0 до 0,2%. По данным ультразвукового исследования плода, патологические изменения в его нервной системе регистрируются не ранее чем через 8 недель после заболевания беременной. Микроцефалия определяется не ранее 27-й недели гестации.

Помимо патологии ЦНС у плода также регистрируют нарушение зрения, гиперпигментацию сетчатки глаз, снижение слуха вплоть до глухоты, кальцификаты в тканях сердца, в последнее время с ВЗ связывают случаи артрогриппоза, косолапости.

Все это привлекло большое внимание медицинского сообщества к изучению заболевания и разработкам мер специфической профилактики лихорадки Зика. В настоящее время активно ведутся работы по созданию вакцин от лихорадки Зика: инактивированной, живой аттенуированной, ДНК- и РНК-вакцин, ряд которых находится в первой фазе клинических испытаний.

Для выявления случаев инфицирования беременных вирусом Зика разработаны ***эпидемиологические критерии:*** пребывание на эндемичной территории, будучи беременной, незащищенный половой контакт с партнером, который посещал эндемичный по лихорадке Зика регион не позднее чем за полгода до него; ***клинические критерии:*** сыпь, склерит, лихорадка, миалгии и артралгии; ***лабораторные критерии:*** обнаружение РНК в клиническом материале: моче, слюне в течение двух недель после возможного инфицирования, крови – в течение двух месяцев после возможного инфицирования; выявление IgM-антител в первые два месяца после возможного инфицирования.

При обследовании беременных УЗИ плода проводится 1 раз в месяц после установления факта инфицирования матери: учитывается вес, бипариетальный размер, длина бедра, окружность живота, окружность головы согласно гестационному возрасту и полу, исследуются аномалии ЦНС плода. При обнаружении поражения ЦНС-кальцификатов в области коры и подкорковых структур, базальных ганглиев, перивентрикулярных пространств, мозжечка; атрофии коры головного мозга, гипоплазии мозжечка и ствола мозга, вентрикуломегалии и др. – возможно проведение исследования методом ПЦР амниотической жидкости для установления связи между поражениями и инфицированием плода вирусом Зика.

При обследовании ребенка, рожденного матерью с подтвержденной лихорадкой Зика или с соответствующим эпидемиологическим анамнезом, но не обследованной на инфицированность ВЗ, в том случае, если в перинатальный период наблюдаются признаки поражения ЦНС, то в первые двое суток после рождения исследуются пуповинная кровь, сыворотка крови ребенка, моча и СМЖ (в случае проведения пункции) на наличие РНК ВЗ и специфических IgM-антител в сыворотке крови. Также на наличие РНК вируса исследуется плацента (не менее трех участков средней трети плаценты и 1 участок внешней трети плаценты) и несколько участков пуповины.

Цель. Изучение длительности персистенции вируса в организме беременной, инфицированной вирусом Зика, наличие маркеров вируса Зика в биологических жидкостях новорожденного.

Материалы и методы. Беременная З. с подозрением на инфицирование вирусом Зика обратилась в лечебное учреждение Москвы 25.08.2016 в первый день появления сыпи (другие симптомы: лихорадка, склерит и головная боль – отсутствовали) после возвращения из Доминиканской республики. Кровь, моча и слюна, собираемые в динамике после лабораторного подтверждения лихорадки Зика, были исследованы на наличие РНК вируса Зика с использованием набора реагентов «АмплиСенс® *Zika virus*-FL» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии», Москва) по инструкции производителя. Инфицирование больной произошло на 20-й неделе гестации. УЗИ плода проводилось на 24-й, 28-й, 32-й неделях беременности. Роды естественные в срок на 40-й неделе гестации. В первые сутки получены для исследования пуповинная кровь, периферическая кровь новорожденного, кровь и вагинальный мазок матери, на 5-е сутки – моча новорожденного и молоко матери. Также было проведено исследование четырех участков плаценты, трех участков пуповины. Наличие специфических IgG и IgM в образцах сыворотки крови матери и новорожденного изучены с использованием планарного белкового биочипа, основанного на раздельно иммобилизованных рекомбинантных фрагментах белков-антигенов ВЗ Е (белок оболочки ВЗ) и NS1 (неструктурный белок ВЗ) (MeridianLifeScience, США). Иммуночипы изготовляли на слайдах с альдегидным покрытием VALS (CELL, США) с помощью плоттера для бесконтактной пьезопечати S3 (Scienion AG, Германия). Сроки забора образцов клинического материала и результаты их исследования приведены в таблице.

Результаты:

Исследование проб клинического материла от больной З.							
День болезни	**Неделя гестации**	**Результат ПЦР**			**Результат иммуночипа, ед. измерения сигнала (положительные значения >100)**		
		плазмы	**мочи**	**слюны**	**IgM**	**IgG**	
					NS1	**Env**	**NS1**
1	**20**	+	+	+	**38**	**30**	**5**
2		+	+	+	**178**	**27**	**10**
4		+	+	**+**	ни	ни	ни
5		+	+	-	**817**	**24**	**153**
6		**+**	**+**	**-**	ни	ни	ни

Исследование проб клинического материла от больной 3.							
День болезни	**Неделя гестации**	**Результат ПЦР**			**Результат иммуночипа, ед. измерения сигнала (положительные значения >100)**		
		плазмы	**мочи**	**слюны**	**IgM**	**IgG**	
					NS1	**Env**	**NS1**
8	**21**	**+**	**+**	ни*	**665**	**23**	**764**
14	**22**	**+**	**-**	ни	**331**	**34**	**879**
21	**23**	**+**	**-**	ни	**99**	**50**	**1775**
29	**24**	**+**	ни	ни	**47**	**107**	**2214**
35	**25**	**+**	ни	ни	ни	ни	ни
49	**27**	**+**	ни	ни	ни	ни	ни
63	**29**	**+**	ни	ни	ни	ни	ни
71	**30**	**-**	ни	ни	ни	ни	ни
78	**31**	**-**	ни	ни	ни	ни	ни
141	**40**	**-**	ни	ни	**3**	**376**	**4949**
Результаты исследования проб клинического материала от новорожденного, взятые на 1-й и 5-й дни со дня рождения							
1		**-**	ни	ни	**4**	**374**	**4843**
5		ни	-	ни			

*ни – не исследовано.

В пуповинной крови, пуповине, молоке и крови матери, ее вагинальном мазке, в крови и моче новорожденного РНК вируса Зика не обнаружена. Из четырех исследованных участков плаценты РНК вируса Зика обнаружена в одном образце из средней трети плаценты.

Результаты УЗИ на 24-й, 28-й, 32-й неделях гестации не выявили отклонений в развитии ребенка. Постнатальный период у новорожденного без особенностей, патологии со стороны ЦНС, органов слуха и зрения не выявлено.

Антитела класса IgM к вирусу Зика не обнаружены в сыворотке крови новорожденного. Уровень IgG-антител в крови ребенка совпадает с концентрацией антител в крови матери. Несмотря на то, что не обнаружены IgM-антитела в крови ребенка, так как с момента инфицирования матери прошло более четырех месяцев, нельзя однозначно утверждать, что у ребенка отсутствовал собственный иммунный ответ на внутриутробное заражение вирусом Зика. Исследование необходимо продолжить через полгода.

КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА СЛУЧАЕВ, ПОДОЗРИТЕЛЬНЫХ НА КРАСНУХУ, У БЕРЕМЕННЫХ

Григорьева Т.Д., Белопольская М.А., Вашукова С.С., Андреева Н.В., Макарова Н.Г., Никонова А.Н.

Городской консультативно-диагностический центр (вирусологический), Санкт-Петербург, Россия
Клиническая инфекционная больница имени С.П. Боткина, Санкт-Петербург, Россия

Краснуха – высококонтагиозное заболевание, которое повышает вероятность возникновения врожденных пороков развития плода. Учитывая необходимость обязательного обследования беременных на краснуху (согласно приказу МЗ РФ № 572 от 12.11.12) в акушерской практике нередко встречается следующая ситуация: позитивный тест на антитела класса IgM у беременных без клинических проявлений и эпидемиологических данных, что служит основанием для дальнейшего обследования.

Цель работы. Проанализировать результаты работы экспертной комиссии по диагностике краснухи поликлинического отделения «Клинической больницы им С.П. Боткина» с учетом результатов углубленного обследования беременных на базе «Городского консультативно-диагностического центра (вирусологического)» (далее СПб ГБУЗ ГКДЦ (вирусологический)).

Результаты. В 2014-2016 гг. на антитела к краснухе класса IgM было обследовано 1390 человек, из них 312 беременных и 799 новорожденных. В случае выявления положительных IgM у беременных при обследовании в районных лабораториях дальнейшая лабораторная диагностика проводилась в СПб ГБУЗ ГКДЦ (вирусологический). Всего было проанализировано 30 подобных случаев. Симптомов текущей краснушной инфекции на момент обращения или с момента наступления беременности не было ни в одном случае. Средний возраст

обследованных беременных составил 29,8±3,19 лет. Срок беременности, на котором впервые выявлялись IgM антитела, в среднем 11±1,12 недель. Как выяснилось из анамнеза, 14 пациенток были вакцинированы от краснухи, давность вакцинации составила от 4 месяцев до 14 лет. В одном случае вакцинация была проведена на ранних сроках беременности, когда женщина еще не знала о своей беременности. При повторном обследовании положительные IgM к краснухе были обнаружены у 24 пациенток (80%). Нарастания антител класса IgG в динамике не выявлялось ни у одной беременной. Определение РНК вируса методом ПЦР во всех случаях дало отрицательный результат. Всем беременным определялся индекс авидности. У 22 пациенток индекс авидности был высоким, у 2 – низким, у 3 – средним или неопределенным. Иммунный блот выполнен в 21, в том числе белок Е2, характерный для перенесенной краснухи или выполненной ранее вакцинации, выявлен в 14 случаях, у 4 беременных – не обнаружен, у 3 результат неопределенный. После комиссионного обсуждения всех представленных случаев ни у одной беременной не обнаружено риска внутриутробного инфицирования краснухой, даны рекомендации дальнейшего наблюдения в женских консультациях по месту жительства. Восемь пациенток были опрошены в динамике, в 7 случаях беременность закончилась срочными родами, в одном беременность была прервана по желанию самой беременной. Ни в одном случае синдрома врожденной краснухи выявлено не было.

Выводы. Обнаружение IgM-антител у беременных требует комплексного подхода, выполнения целого ряда лабораторных обследований и комиссионного обсуждения результатов. Проводить диагностику сложных случаев необходимо в одной лаборатории с интервалом в 10-14 дней. Целесообразно выполнение иммунного блота и ПЦР-исследования.

ОСОБЕННОСТИ МИКРОФЛОРЫ ОСНОВНЫХ БИОТОПОВ У НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ С ОЧЕНЬ НИЗКОЙ И ЭКСТРЕМАЛЬНО НИЗКОЙ МАССОЙ ТЕЛА ПРИ РОЖДЕНИИ НА ФОНЕ ВНУТРИУТРОБНОГО ИНФИЦИРОВАНИЯ

Малыгина О.Г., Бажукова Т.А.

ФГБОУ ВО «Северный государственный медицинский университет», Архангельск, Россия

Высокая инфицированность взрослого населения вирусами, бактериями определяет значительную распространенность внутриутробных инфекций (ВУИ). Термин «перинатальные инфекции» принято применять к инфекциям, передаваемым от матери ребенку в период внутриутробного развития, во время родов или непосредственно после родов. К числу инфекционных агентов, которые могут передаваться трансплацентарным путем и вызывать серьезное заболевание плода и новорожденного, относятся вирусы иммунодефицита человека, гепатитов В и С, цитомегалии, герпеса, краснухи, парвовирус В19, вирус варицелла-зостер, возбудители сифилиса, токсоплазмоза и листериоза. Внутриутробное инфицирование чаще становится причиной преждевременных родов, приводящих к гибели младенцев. По литературным данным, ВУИ развивается у 27,6% детей, рожденных живыми, а внутриутробное инфицирование – у 66,6%.

Целью работы явилось изучение характера микробиоценозов основных биотопов у недоношенных детей на фоне внутриутробного инфицирования.

Задачи. Выявить особенности микрофлоры ротоглотки, мочевыделительной системы и толстой кишки у недоношенных детей на фоне внутриутробного инфицирования.

Материалы и методы. Обследовано 58 недоношенных детей с массой тела до 1500 г при рождении, находившихся на выхаживании в стационаре. Проведено микробиологическое исследование с использованием бактериологического и молекулярно-генетического методов. Для молекулярно-генетического метода в качестве материала забирали кровь (для определения *HSV-1,2, EBV, CMV, HHV-6, HHV-8*), мочу и отделяемое трахеи (для выявления *Chlamydia trachomatis, Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealyticum*, *CMV*). При поступлении в отделение проводили исследование крови, мочи, отделяемого трахеи, а при выписке из стационара – мочи (определение *CMV*). Определение нуклеиновых кислот осуществляли метод ПЦР in real time с использованием тест-системы производства НПФ «ДНК-Технология» по инструкции производителя.

Основные результаты. При поступлении в отделение с одинаковой частотой обнаруживали *CMV и M. hominis* (6,9%), у 10,3% недоношенных детей – *U. urealyticum.*

У 15,5% обследованных детей были выявлены в отделяемом ротоглотки представители внутриутробного инфицирования. Чаще регистрировали *U. urealyticum* (66,7%), затем *CMV* (33,3%), *M. hominis* (11,1%). У одного ребенка (1,7%) выявлена ассоциация *U. urealyticum* и *M. hominis*. Отмечено, что на фоне внутриутробного инфицирования происходит контаминация ротоглотки условно-патогенной флорой: высокий уровень *грибов Candida* 44,4% (p = 0,001), *P. aeruginosa* 22,2%; *Enterococcus spp*. (22,2%) и *S. pneumoniae* (11,1%). Только у половины детей (55,5%) происходило заселение ротоглотки облигатными коагулазоотрицательными стафилококками на фоне отсутствия облигатных «ротовых» стрептококков, в отличие от детей без инфицирования, указанные стрептококки регистрировали в 10,2% случаев.

В моче у 6,9% обследованных детей был выявлен *CMV*, у 5,2% – *U. urealyticum*, у 3,4% – *M. hominis* и у 1,7% выявлена ассоциация *U. urealyticum и M. hominis*. Установлено, что у детей на фоне внутриутробного инфицирования в 2 раза чаще выявляли присутствие микрофлоры

(60,0%), чем у детей без инфицирования (33,3%) в одинаковой численности (3,5 lg КОЕ/мл); в 5 раз чаще происходила колонизация мочи грибами рода *Candida* (40,0%, p = 0,024) и *P.aeruginosa* (10,0%). Различий в частоте обнаружения кокковой флоры (*Staphylococcus spp.* и *Enterococcus spp.*) не выявлено, но количество энтерококков было в 2 раза выше у детей на фоне инфицирования (6,0 lg КОЕ/мл), преимущественно за счет *E.faecalis.*

Проведено исследование мочи на наличие ДНК *CMV* при выписке из стационара. Выявлено, что у 10,3% детей произошла контаминация данным представителем за время госпитализации. У всех детей, в моче которых присутствовал *CMV,* выявлялась облигатная и факультативная бактериальная флора, в сравнении с детьми без *CMV* (93,7%). На фоне CMV в два раза чаще регистрировали *S. epidermidis* (60,0%, p=0,028) и *P. aeruginosa* (10,0%). На частоту выявления *Enterococcus CMV* не оказывал влияния. Энтеробактерии реже колонизировали мочевыделительную систему (50,0%) на фоне обнаружения *CMV,* при сужении их спектра (*E. coli, Klebsiella spp., Serratia spp.*), в сравнении с детьми без инфицирования (68,7%; *E. coli, Klebsiella spp., Serratia spp., Hafnia, Cirtobacter spp.*).

Анализ микрофлоры толстой кишки выявил, что внутриутробное инфицирование не оказывает отрицательного влияния на заселение данного биотопа облигатными представителями (бифидо-, лактобактерии, энтерококки, кишечная палочка). Однако на фоне внутриутробного инфицирования в 4 раза чаще регистрировали *P. aeruginosa* (33,3%; p = 0,049), граммотрицательные энтеробактерии (25,0%) и грибы рода *Candida* (50,0%). Среди грибов *Candida* статистически значимо чаще выявлялась C. albicans (p = 0,014).

Проведенное исследование позволило заключить, что основными внутриутробными представителями у недоношенных детей, с очень низкой и экстремально низкой массой тела являются *CMV, M. hominis* и *U. urealyticum,* на фоне которых происходит патологическое формирование микрофлоры основных биотопов. Данные представители способствуют контаминации слизистой ротоглотки, мочевыделительной системы и толстой кишки грибами рода *Candida и P. aeruginosa* и препятствуют заселению облигатными представителями.

Таким образом, необходимо проведение молекулярно-генетического обследования недоношенных детей с массой тела 1500 г и менее на наличие основных внутриутробных микроорганизмов для дальнейшей коррекции формирования нормофлоры основных биотопов организма ребенка.

ДИАГНОСТИКА ЛЕТАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ У МАЛОВЕСНЫХ ДЕТЕЙ

Островская О.В., Ивахнишина Н.М., Кожарская О.В., Наговицына Е.Б., Власова М.А., Бачалдин С.Л., Обухова В.Г., Мусатов Д.В.

Хабаровский филиал ДНЦ ФПД «Научно-исследовательский институт охраны материнства и детства», Перинатальный центр МЗ Хабаровского края, Хабаровск, Россия

Введение. В клинической практике инфекционно-воспалительные заболевания новорожденных подразделяют на врожденные (диагностируются в раннем неонатальном периоде до 7 дней жизни) и постнатальные (приобретенные после рождения). Инфекции занимают одно из ведущих мест среди причин перинатальной и младенческой заболеваемости и смертности. Перинатальная смертность недоношенных детей в 6 - 10 раз выше, чем смертность новорожденных с нормальной массой тела. Классические способы выявления микроорганизмов в аутопсийном материале трудоемки, дорогостоящи и занимают длительное время. На результаты диагностики значительно влияет предварительная эмпирическая антибиотикотерапия. Этих недостатков лишены методы молекулярной диагностики, позволяющие осуществлять прямую детекцию возбудителей в клиническом образце.

Цель исследования. Определить инфицированность плаценты и внутренних органов умерших недоношенных детей с использованием ПЦР.

Материалы и методы. С помощью ПЦР исследовали аутопсийный материал 20 случаев смерти недоношенных детей, в том числе 5 умерших в раннем неонатальном периоде до 7 суток жизни (1-я группа) и 15 случаев смерти в неонатальном и постнеонатальном периоде, дети прожили от 10 суток до 2 месяцев жизни (2-я группа). В 1-й группе роды произошли на 26-29 неделе гестации. Масса тела детей при рождении варьировала от 960 г до 1590 г. Во 2-й группе беременность завершилась на 26 – 33 неделе. Масса тела при рождении составила от 860 до 2205 г. Изучали пробы головного мозга, сердца, легких, почек, печени, селезенки и плаценты. Определяли ДНК/РНК следующих возбудителей: *Chlamydia trachomatis, Mycoplasma hominis, Mycoplasma genitalium, Ureaplasma urealyticum, Cytomegalovirus (CMV), Herpes simplex virus, Herpes human virus 4 type, Herpes human virus 6 type, Enteroviruses, Rubella virus, Parvovirus* B19*, Listeria monocytogenes, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Streptococcus agalactiae, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Haemophilus influenzae, Candida albicans, Aspergillus fumigatus.* Работу осуществляли с помощью наборов реагентов ФБУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора (г. Москва) и ООО «Лаборатория Изоген» (г. Москва).

Результаты и обсуждение. Основной причиной смерти по результатам патологоанатомического заключения в 1-й группе стали: синдром дыхательных расстройств и аспирационная пневмония (1), синдром дыхательных расстройств и внутрижелудочковое кровотечение (1), генерализованная внутриутробная инфекция с вовлечением 2-5 органов (3). Во 2-й группе бронхопневмония стала основной причиной смерти у 5 детей, внутриутробная

инфекция в генерализованной форме – у 4, неонатальный сепсис – у 3, некротически-язвенный колит – у 3.

Возбудители инфекционно-воспалительных процессов выявлены во всех случаях исследования плаценты и органов умерших маловесных детей 1-й группы. В том числе определены моноинфекции (*U. urealyticum* – в 2 случаях и *S. pneumoniae* – в 1) и смешанные инфекции (*M. hominis* + *U. urealyticum* – 1; *M. hominis* + *U. urealyticum.* + *S. pneumoniae* – 1). Эти возбудители, являясь частью микрофлоры нижних отделов генитального тракта женщин, инфицируют плод восходящим путем или во время прохождения плода через инфицированные родовые пути матери. Ранее нами было показано, что *U. urealyticum* определяется в генитальных мазках у 40,0-54,7% женщин репродуктивного возраста г. Хабаровска, *M. hominis* – у 15,1-37,2%. Пневмококки колонизируют носоглотку, не обнаруживаются в генитальном тракте женщин при физиологически протекающей беременности, но при преждевременном отхождении околоплодных вод появляются в 10,2% случаев в составе дисбиозов. Во 2-й группе инфицированным оказался материал 9 из 15 обследованных (60%). Были установлены как моноинфекции (*U. urealyticum*- 2, *M. hominis*– 1, *CMV*-1), так и смешанные инфекции (*U. urealyticum* + *S. pneumoniae* + *CMV* + *Candida albican* – 1; *U. urealyticum* + *Adeno* – 1; *U. urealyticum* + *M. hominis*+*H. influenzae* – 1; *Adeno* + *A. fumigatus* – 1; *P. aeruginosa.*+ *K. pneumoniae* – 1). *CMV* персистирует и репродуцируется в лимфоцитах человека. Вирус способен попасть в плод гематогенным путем, восходящим или интранатально во время родов. Анти-*CMV IgG* обнаруживаем у 98% женщин репродуктивного возраста г. Хабаровска, ДНК *CMV* в генитальных мазках – у 2% женщин. Грибы рода *Candida* входят в состав микрофлоры генитального тракта как при нормоценозе, так и при дисбиозах. Аденовирусы воздушно-капельным или контактным путем от больных ОРВИ заражают новорожденных, вызывая бронхиолиты. *H. influenzae* – причина септических процессов у детей, передается младенцу только от матери-бактерионосителя. *A. fumigatas* широко распространен в почве, воде, воздухе, инфицированию ребенка способствуют инвазивные методы исследования и лечения. Источником заражения младенца клебсиеллой и сине-гнойной палочкой в большинстве случаев являются объекты окружающей больничной среды. В большинстве случаев детекция инфекционных агентов давала положительный результат одновременно во всех исследуемых органах и в плаценте.

В 30% наблюдений результаты ПЦР оказались отрицательными в отношении исследованных инфекций. Не было установлено таких возбудителей, как *C. trachomatis*, *M. genitalium*, *Herpess implex virus*, *Herpes human virus 4 type*, *Herpes human virus 6 type*, *Enteroviruses*, *R. virus*, *Parvovirus* B19, *L. monocytogenes*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. aureus*.

Основные результаты. Методом ПЦР проведена этиологическая верификация летальных инфекций у маловесных детей. Аутопсийный материал от детей, умерших в ранний неонатальный период, был инфицирован возбудителями инфекций, колонизирующими генитальный тракт женщин. При гибели детей в более позднем периоде в аутопсийном материале выявлены моноинфекции и ассоциации микроорганизмов, таких как микоплазмы, персистирующие и респираторные вирусы, кокковая, бациллярная микрофлора, грибы. Они вызвали тяжелые инфекционно-воспалительные заболевания с неспецифической морфологической картиной. В большинстве случаев детекция инфекционных агентов давала положительный результат одновременно во всех исследуемых органах и в плаценте. Источником инфицирования при этом является как микрофлора респираторного и генитального тракта матери, так и окружающая среда.

Выводы. В большинстве случаев клинические и патоморфологические проявления врожденных и постнатальных инфекций не патогномоничны. Это дает основание рекомендовать ПЦР как быстрый, высокочувствительный и высокоспецифичный метод, позволяющий проводить этиологическую верификацию летальных инфекций при перинатальной и младенческой смертности. Результаты работы указывают на пути профилактики заболеваемости и смертности маловесных детей.

ПЕРИНАТАЛЬНЫЕ ИНФЕКЦИИ – ПРОБЛЕМЫ СКРИНИНГА И ПРОФИЛАКТИКИ

Савичева А.М.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Термин «перинатальные инфекции» принято применять к инфекциям, передающимся от матери ребенку в период внутриутробного развития (внутриутробные, или врожденные, инфекции), во время родов (интранатальные инфекции) или непосредственно после родов (постнатальные инфекции). В настоящее время основным способом профилактики перинатальных инфекций является скрининг беременных женщин на инфекции. Скрининг является целесообразным, если доказано, что инфекция матери может передаваться плоду и вызывать его поражение, если существует надежный скрининговый тест и если разработаны безопасные и эффективные меры по минимизации риска передачи инфекции плоду и его поражения. В таблице суммированы международные рекомендации по антенатальному скринингу, основанные на принципах доказательной медицины.

Таблица. Рекомендации по антенатальному скринингу на инфекции

Инфекция	Рекомендации по скринингу (сроки тестирования)	Скрининговый метод
Вирусный гепатит В	Рутинный скрининг всех беременных (при постановке на учет по беременности)	Серологическое исследование на HBsAg

Инфекция	Рекомендации по скринингу (сроки тестирования)	Скрининговый метод
ВИЧ-инфекция	Рутинный скрининг всех беременных (при постановке на учет по беременности)	ИФА, ИБ
Сифилис	Рутинный скрининг всех беременных (при постановке на учет по беременности, на сроке 28-30 недель и за 2-3 недели до родов)	RPR, VDRL
Хламидийная инфекция	Рутинный скрининг всех беременных (при постановке на учет по беременности)	МАНК
Инфекция, вызываемая стрептококками группы В	Рутинный скрининг всех беременных (35-37 недель)	Культуральное исследование
Бессимптомная бактериурия	Рутинный скрининг всех беременных (при постановке на учет по беременности)	Культуральное исследование
Краснуха	Рутинный скрининг всех беременных (при постановке на учет по беременности) или скрининг всех женщин, планирующих беременность (при отсутствии иммунитета – вакцинация)	Серологическое исследование на IgG к вирусу краснухи
Ветряная оспа	Скрининг женщин, не болевших ветряной оспой, и женщин, не знающих своего анамнеза по этому заболеванию	Серологическое исследование на IgG к VZV
Вирусный гепатит С	Скрининг в группах риска (при постановке на учет по беременности)	Серологическое исследование на IgG к HCV
Гонококковая инфекция	Скрининг в группах риска (при постановке на учет по беременности)	МАНК или культуральное исследование
Цитомегаловирусная инфекция	Рутинный скрининг не рекомендуется; тестирование при контакте и/или наличии симптомов ЦМВИ	–
Токсоплазмоз	Рутинный скрининг не рекомендуется; тестирование при наличии симптомов или выявлении ультразвуковых маркеров инфекции у плода	–
Парвовирусная инфекция	Рутинный скрининг не рекомендуется; тестирование при контакте и/или наличии симптомов	–
Герпесвирусная инфекция	Рутинный скрининг не рекомендуется; тестирование при наличии симптомов и/или при наличии партнера с историей генитального герпеса	–
Бактериальный вагиноз	Рутинный скрининг не рекомендуется; тестирование при наличии симптомов	–
Трихомониаз	Рутинный скрининг не рекомендуется; тестирование при наличии симптомов	–
Кандидоз	Рутинный скрининг не рекомендуется; тестирование при наличии симптомов	–

ИФА – иммуноферментный анализ; ИБ – иммуноблоттинг; МАНК – методы амплификации нуклеиновых кислот; RPR – rapid plasma regain test (тест на быстрые плазменные реагины); VDRL – Venereal Disease Research Laboratory test.

В нашей стране антенатальный скрининг на инфекции регулируется Приказом МЗ РФ от 01.10.2012 № 572н «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи по профилю «акушерство и гинекология (за исключением использования вспомогательных репродуктивных технологий)». Приказ включает определение в крови антител к возбудителям сифилиса, ВИЧ-инфекции, гепатитов В и С, краснухи и токсоплазмоза, микроскопическое исследование отделяемого половых органов на гонококк и грибы рода кандида, культуральное исследование мочи на бессимптомную бактериурию, ПЦР-исследование на *Chlamydia trachomatis*, бактериологическое исследование отделяемого половых органов на аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы и чувствительность к антибиотикам и микроскопическое исследование отделяемого женских половых органов на аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы.

Несмотря на существенную модернизацию комплекса антенатальных исследований на инфекции по сравнению с ранее существовавшей нормативной базой (Приказ МЗ РФ от 10.02.2003 № 50 «О совершенствовании акушерско-гинекологической помощи в амбулаторно-поликлинических учреждениях»), его нельзя считать оптимальным. В первую очередь, речь идет о недопустимости использования микроскопического метода в диагностике гонореи у женщин ввиду его низкой чувствительности и специфичности и необходимости применения МАНК или культурального метода для этой цели. Далее, необходимо введение скрининга беременных женщин на стрептококки группы В. Оптимизации требует также серологический скрининг. Наконец, для эффективной профилактики перинатальных инфекций насущно необходимо создание национальных стандартов ведения беременных женщин с инфекциями, опасными для плода и новорожденного.

STREPTOCOCCUS AGALACTIAE: ЧАСТОТА ИНФИЦИРОВАНИЯ НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ, РОЖДЕННЫХ ОТ *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*-ПОЗИТИВНЫХ ЖЕНЩИН

Садова Н.В.[1], Скачкова Т.С.[2], Смирнова В.С.[2], Домонова Э.А.[2], Шипулина О.Ю.[2], Подзолкова Н.М.[1], Назарова С.В.[1], Насекина Е.А.[3], Паносян С.Р.[3], Волкодав А.А.[3], Черемухина Е.П.[3], Заплатников А.Л.[1]

[1] ФГБОУ ДПО «РМАНПО» Минздрава России, Москва, Россия
[2] ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия
[3] Родильный дом ГБУЗ «ГКБ им. Д.Д. Плетнева ДЗМ», Москва, Россия

Введение. Одними из наиболее частых перинатальных инфекций бактериальной этиологии являются инфекционно-воспалительные заболевания, вызываемые стрептококками группы В (*Streptococcus agalactiae*). Установлено, что у женщин инфекция, обусловленная *S.agalactiae*, может приводить к бактериемии, эндометриту, воспалению мочевых путей, а в период беременности – к хориоамниониту и интранатальному инфицированию плода. При этом у новорожденных детей внутриутробная *S.agalactiae*-инфекция может протекать не только в виде локализованных, но и в инвазивных формах, характеризующихся высоким риском неблагоприятного исхода [1].

В подавляющем большинстве случаев *S.agalactiae*-инфицирование плода происходит в интранатальный период, причем чаще это отмечается при вагинальном родоразрешении [1]. При этом риск реализации *S.agalactiae*-инфекции у доношенного ребенка составляет 1–2%, у недоношенного – 15–20%, а при сроке гестации менее 28 недель – практически у 100% инфицированных детей [1, 2, 3].

Цель. Определить частоту *S.agalactiae*-носительства у беременных женщин, родивших раньше 37-й недели гестации, и риск перинатального *S.agalactiae*-инфицирования их недоношенных детей.

Материалы и методы. Обследовано 106 женщин в возрасте от 18 до 41 года (медиана 30) и 118 недоношенных новорожденных детей (12 двоен), родившихся на 25–36-й неделе гестации. Забор биологического материала для исследования осуществляли: у женщин (периферическая венозная кровь, вагинальные мазки) – в I периоде родов; у новорожденных детей (пуповинная кровь, мазки из ротоглотки, аноректальные мазки) – в первые 10 минут жизни. Для выявления и количественного определения ДНК *S.agalactiae* использовали набор реагенов «АмплиСенс® *Streptococcus agalactiae*-скрин-титр-FL» (РУ № ФСР 2012/13618). Постановку и анализ результатов амплификации проводили на приборах с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени «Rotor-Gene» 3000/6000 («Corbett Research», Австралия) в соответствии с инструкцией производителя. Сбор, хранение и транспортировку биологического материала проводили согласно МУ «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности» (2010). Параллельно выполняли бактериологическое исследование мазков из ротоглотки новорожденных традиционным методом в бактериологической лаборатории ГБУЗ «ГКБ им. Д.Д. Плетнева ДЗМ».

Результаты. Анализ результатов проведенного обследования свидетельствует о том, что ДНК *S.agalactiae* была обнаружена в вагинальных мазках у 6 (5,7%) женщин. При этом отмечено, что концентрация ДНК *S.agalactiae* составляла от $7{,}00x10^2$ до $4{,}07x10^5$ копий/мл. В крови матерей ДНК *S.agalactiae* не выявлялась. Установлено, что у трех из шести детей (q=0,5), рожденных матерями с вагинальной *S.agalactiae*-колонизацией, в различных видах биологического материала была обнаружена ДНК *S.agalactiae* (табл.). При этом проведенное бактериологическое исследование мазков из ротоглотки у *S.agalactiae*-инфицированных новорожденных роста микрофлоры не выявило ни в одном случае.

Таблица. Выявление и количественное определение ДНК *S.agalactiae* в различных видах биологического материала у матерей и их новорожденных детей методом ПЦР в режиме реального времени

№№ пары	Мать		Новорожденный				
	возраст, лет	вагинальный мазок, копии/мл	гестационный возраст при рождении, нед.	способ рождения	мазок из ротоглотки, копии/мл	плазма пуповинной крови, копии/мл	аноректальный мазок, копии/мл
1	31	$9{,}00x10^3$	34–35	к/с	–	–	–
2	32	$7{,}00x10^2$	36–37	ест	$1{,}00x10^3$	–	$7{,}00x10^2$
3	30	$1{,}81x10^4$	33–34	к/с	–	–	–
4	33	$8{,}00x10^2$	34–35	ест	$2{,}09x10^5$	$3{,}4x10^3$	$4{,}9x10^3$
5	36	$4{,}07x10^4$	36–37	ест	–	–	–
6	30	$3{,}84x10^4$	34–35	ест	$6{,}53x10^4$	$2{,}29x10^5$	–

У двух из трех *S.agalactiae*-инфицированных недоношенных детей развилась генерализованная *S.agalactiae*-инфекция. Показано, что раннее выявление перинатального *S.agalactiae*-инфицирования с помощью метода амплификации нуклеиновых кислот позволило своевременно назначить адекватную этиотропную терапию, что и определило благоприятный исход заболевания у недоношенных детей с генерализованной *S.agalactiae*-инфекцией. Анализ полученных данных показал отсутствие прямолинейной корреляции между концентрацией ДНК *S.agalactiae* у женщин с вагинальной колонизацией и развитием *S.agalactiae*-инфекции новорожденных. Вероятно, это обусловлено многими факторами, в том числе и интермиттирующим характером *S.agalactiae*-носительства во влагалище.

Выводы. Частота выявления ДНК *S.agalactiae* в вагинальных мазках у женщин, родивших раньше 37-й недели гестации, составила 5,7% (6 из 106 обследуемых) с концентрацией ДНК возбудителя от $7{,}00x10^2$ до $4{,}07x10^5$ копий/мл. Рождение детей от женщин с вагинальной колонизацией *S.agalactiae* сопровождалось вертикальной трансмиссией изучаемого возбудителя в половине случаев. Ранняя детекция *S.agalactiae* в биологических средах новорожденного ребенка определила возможность своевременного назначения этиотропной терапии, что существенно улучшило прогноз заболевания. Учитывая высокий риск развития генерализованных форм *S.agalactiae*-инфекции у недоношенных новорожденных детей, следует включить определение ДНК *S.agalactiae* в вагинальных мазках у всех беременных женщин в перечень обязательных исследований (в рамках скрининга). Для своевременной верификации перинатальной *S.agalactiae*-инфекции необходимо использовать метод ПЦР в режиме «реального времени».

Список литературы

1. Prevention of perinatal group B streptococcal disease revised guidelines from CDC. MMWR Recomm Rep. 2010; 59: 1–36.

2. Phares C.R., Lynfield R., Farley M.M. et al. Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999-2005. JAMA. 2008; 299(17): 2056–65.

3. Schrag S.J., Zywicki S., Farley M.M. et al. Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. N Engl J Med. 2000; 342(1): 15–20.

ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* У ЖЕНЩИН РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА ГОРОДА МОСКВЫ

Смирнова В.С., Домонова Э.А., Скачкова Т.С., Шипулина О.Ю.

ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение. *S.agalactiae* (стрептококк группы В) – это микроорганизм, относящийся к роду *Streptococcus* семейства *Streptococcaceae* серогруппы B. *S.agalactiae* является частью нормальной микрофлоры ЖКТ, колонизирует ротоглотку, дистальную область прямой кишки, преддверие влагалища, урогенитальный тракт, кожу. При этом у большей части людей колонизация протекает бессимптомно, в виде здорового носительства, и чаще всего носит интермиттирующий характер. Однако *S.agalactiae*-инфекция представляет опасность для беременных женщин, проявляясь в виде бактериемии, инфекции мочеполовых путей, хориоамнионита, преждевременного излития околоплодных вод, преждевременных родов, послеродового эндометрита и др. Для новорожденных *S.agalactiae* представляет угрозу при вертикальной передаче возбудителя по причине колонизации урогенитального тракта матери, вызывая сепсис, менингит и пневмонию.

В настоящее время частота распространения *S.agalactiae* у беременных и небеременных женщин составляет в Германии – 16% (Nadia B. с соавт., 2005), Иране – 15,4% (Sadeh M. с соавт., 2015), Турции – 13,6% (Alp F. с соавт., 2016), России – 16% (Крысанова А.А. с соавт., 2014). В США, Канаде и странах Европы существуют регламентированные национальные программы профилактики и лечения *S.agalactiae*-инфекции. Центр по контролю и профилактике заболеваний (CDC) рекомендует скрининг всех беременных женщин на 35–37-й неделе беременности, а также проведение антибиотикопрофилактики беременным женщинам с вагинально-ректальной колонизацией, женщинам с инвазивной *S.agalactiae*-инфекцией и с неизвестным статусом в начале родов, но имеющим факторы риска, для профилактики раннего начала заболевания у новорожденных (2010).

Целью представленного исследования явилось изучение частоты выявления ДНК *S.agalactiae* в урогенитальном тракте у женщин различного репродуктивного возраста города Москвы при использовании метода ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Материалы и методы. В период с января по декабрь 2016 года в ФБУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора обследовано 609 беременных и небеременных женщин в возрасте от 18 до 49 лет. Материалом для исследования являлись 609 соскобов эпителиальных клеток с боковых стенок влагалища обследованных женщин. Методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» в исследуемом биологическом материале выявляли и количественно определяли ДНК *S.agalactiae*. Для тестирования использовали набор реагентов «АмплиСенс® *Streptococcus agalactiae*-скрин-титр-FL» (РУ № ФСР 2012/13618), разработанный в ФБУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора. Постановку и анализ результатов амплификации проводили на приборах с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени «Rotor-Gene» 3000/6000 («Corbett Research», Австралия), «Rotor-Gene Q» («Qiagen», ФРГ) в соответствии с инструкциями производителей. Сбор, хранение и транспортировку биологического материала проводили согласно МУ «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе

с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности» (2010).

Результаты. Все обследованные женщины в зависимости от возраста условно были разделены на четыре группы. Первую группу составили 65 (10,7%) женщин в возрасте от 18 до 25 лет, вторую группу – 361 (59,3%) женщина в возрасте от 25 до 35 лет, третью группу – 106 (17,4%) женщин от 35 до 40 лет и четвертую группу – 77 (12,6%) женщин от 40 до 49 лет. ДНК *S.agalactiae* методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» выявлена в 96 (15,8%) из 609 исследованных образцов. Концентрация выявляемой ДНК *S.agalactiae* в образцах соскобов эпителиальных клеток с боковых стенок влагалища варьировала от $2,0x10^2$ копий/мл до $2,0x10^7$ копий/мл (медиана $6,45x10^4$ копий/мл). Результаты проведенного исследования в четырех возрастных группах женщин репродуктивного возраста представлены в таблице. Достоверность полученных результатов отрицательных и положительных образцов существенно не отличалась ($p<0,05$).

Таблица. Частота выявления ДНК *S.agalactiae* у женщин репродуктивного возраста города Москвы

№№ группы	Возраст, лет	Кол-во отрицательных образцов, абс. (%)	Кол-во положительных образцов, абс. (%)	Концентрация ДНК *S.agalactiae,* копий/мл		
				min	max	медиана
1	18–25	54/65 (83,0)	11/65 (17,0)	$3,4x10^3$	$6,0x10^6$	$4,45x10^4$
2	25–35	301/361 (83,4)	60/361 (16,6)	$2,0x10^2$	$2,0x10^7$	$6,45x10^4$
3	35–40	90/106 (85,0)	16/106 (15,0)	$5,0x10^2$	$1,0x10^7$	$3,00x10^4$
4	>40	68/77 (88,3)	9/77 (11,7)	$1,2x10^3$	$4,0x10^6$	$3,00x10^4$
Всего	18–49	513/609 (84,2)	96/609 (15,8)	$2,0x10^2$	$2,0x10^7$	$6,45x10^4$

Выводы. Частота выявления ДНК *S.agalactiae* в урогенитальном тракте женщин различного репродуктивного возраста при использовании метода ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» составила 15,8% (96 из 609 образцов) с концентрацией $2,0x10^2$–$2,0x10^7$ копий/мл (медиана $6,45x10^4$ копий/мл). При этом доля носительства *S.agalactiae* с возрастом снижалась с 17,0 до 11,7%, концентрация выявляемой ДНК достоверно не изменялась. Широкое распространение *S.agalactiae* в урогенитальном тракте женщин различного репродуктивного возраста в городе Москве подтверждает целесообразность и необходимость проведения скрининга всех женщин на 35–37-й неделе беременности. Обнаружение ДНК *S.agalactiae* в соскобах эпителиальных клеток с боковых стенок влагалища с помощью метода ПЦР в режиме «реального времени» в кратчайшие сроки позволяет выявить женщин с вагинально-ректальной колонизацией, оценить риск пре- и интранатального заражения ребенка, своевременно провести этиотропную терапию и тем самым снизить риск перинатальных потерь.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ГРУДНОГО МОЛОКА НА ГЕРПЕСВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ ПЦР-МЕТОДОМ

Черемных Н.В.

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Ямало-ненецкого автономного округа «Новоуренгойская центральная городская больница», Новый Уренгой, Россия

Ранняя диагностика перинатальных инфекций – одна из проблем акушерства и неонатологии. Обследование беременных женщин проводится на этапе женской консультации в соответствии с приказом МЗ РФ № 572н от 12.11.201 «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи по профилю «акушерство и гинекология». Стандартное обследование предполагает определение антител к ЦМВ, ВПГ 1, 2-го типа в крови методом ИФА. Заболеваемость врожденной цитомегаловирусной инфекцией среди новорожденных, зарегистрированных в условиях отделения новорожденных, составляет 0,6‰ в год. При ретроспективном анализе заболеваемость возрастает до 7,4‰ в год. Регистрация данной инфекции чаще всего происходит на 2-м этапе выхаживания новорожденных или детского инфекционного отделения.

Цель исследования. Практическое применение обследования грудного молока при постановке диагноза «врожденная цитомегаловирусная инфекция» у детей 1-го года жизни.

Материалы и методы. Обследовано 11 детей 1-го года жизни в возрасте 1-4 мес. и 11 матерей. В дальнейшем сформированы 11 групп. Госпитализированы в ОПНН (6 чел.) и ДИО (5 чел.) за 2016 г. Всего обследовано 22 чел. Обследование проводилось методом ПЦР на присутствие ДНК EBV, CMV, HHV6. Биологический материал для исследования – у матерей – грудное молоко, детей – моча, кровь, соскоб со слизистой ротоглотки. Экстракция ДНК проводилась при помощи наборов реагентов производства ФБУЗ «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора «АмплиСенс – EBV/CMV/HHV6-скрин-FL». Постановка ПЦР

и последующий анализ результатов выполнены с использованием амплификатора «Rotor-Gene Q» производства Qiagen ФРГ в режиме реального времени.

Результаты исследования. В результате анализа полученных данных обнаружена ДНК ЦМВ в грудном молоке в 91,0% (n=10) случаев. В 0,9%(n=1) ДНК ЦМВ не обнаружена. Сочетанное выделение ДНК ЦМВ и ВЭБ – 0,9% (n=1). Среди детей ДНК ЦМВ обнаружена в 82,0% (n=9) случаев. При этом, степень выделения ДНК ЦМВ составляла 10^1 – 10^5 копий. Зависимость от степени выделения ДНК ЦМВ в грудном молоке и степени выделения ДНК ЦМВ у детей из разных локусов не нашла своего отражения. Не обнаружена ДНК ЦМВ в 18,0% (n=2), хотя при этом отмечается выделение ДНК ЦМВ из грудного молока. Находкой для клиницистов стали как дети, у которых обнаружили ДНК ЦМВ И ВПГ-6 в 9,0% (n=1), так и мать, у которой выделена сочетанная герпесвирусная инфекция (ЦМВ+ВЭБ).

	Моноинфекция							
№ группы	Грудное молоко/ ЦМВ (копий/ мл)	Обследование крови ребенка (копий ДНК/10^5 клеток)	№ группы	Грудное молоко/ ЦМВ (копий/мл)	Соскоб со слизистой ротоглотки ребенка (копий/ мл)	№ группы	Грудное молоко/ ЦМВ (копий /мл)	Обследование мочи ребенка (копий/мл)
1	$4,5*10^3$	0	6	$7,6*10^4$	$9,2*10^3$	8	$1,0*10^2$	0
2	$1,6*10^3$	$2,3*10^3$	7	$7,4*10^3$	$1,8*10^2$			
3	$9,8*10^3$	$5,9*10^4$						
4	$9,2*10^2$	0						
5	0	$6,8*10^1$						

Сочетанная инфекция				
№ группы	Грудное молоко/ ЦМВ/ ВЭБ (копий/мл)	Обследование крови ребенка (копий ДНК/10^5 клеток)	Соскоб со слизистой ротоглотки ребенка (копий /мл)	Обследование мочи ребенка (копий/мл)
9	ЦМВ – $1,1*10^3$	$2,3*10^3$		
10	ЦМВ – $1,6*10^3$		ЦМВ – $9,9*10^5$, ВПГ-6 – $4,8*10^2$	
11	ЦМВ – $1,5*10^4$ + ВЭБ $2,1*10^2$			ЦМВ – $3,0*10^3$

Выводы. Проведенный анализ доказывает необходимость параллельного обследования детей 1-го года жизни и матерей для установления источника инфекции. Применение в формате «МультиПрайм» реагентов для диагностики герпесвирусных инфекций позволяет достоверно определить этиологию заболевания. Данные исследования имеют практическое значение для врачей-неонатологов, врачей-инфекционистов, невропатологов и участковых педиатров для ранней диагностики герпесвирусных инфекций, в частности врожденной цитомегаловирусной инфекции, выделения групп риска, а также проведения адекватной терапии.

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ СРЕДИ БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН В Г. МОСКВЕ

Науменко Н.С., Белова А.В., Асцатурова О.Р., Никонов А.П.

ФБГОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России

Введение. *Цитомегаловирус* является одной из наиболее распространенных вирусных инфекций в мире, обычно протекает бессимптомно. Клиническая манифестация заболевания, с возможным развитием крайне тяжелых форм, происходит очень редко и только у пациентов с иммунодефицитными состояниями приобретенного (СПИД, цитостатическая, иммуносупрессивная терапия и т.д.) или физиологического характера, что свойственно, например, для новорожденных. Именно это последнее обстоятельство и предопределяет особый интерес к проблеме ЦМВ-инфекции во время беременности. [4]

Первичная ЦМВ-инфекция во время беременности встречается достаточно редко – в 1-2% случаев. Тем не менее эта ситуация наиболее опасна с точки зрения внутриутробной передачи инфекции. Еще около 13-14% серопозитивных женщин подвержены во время беремен-

ности вторичной инфекции, которая может представлять собой как активацию латентной инфекции (рецидив), так и реинфекцию новым штаммом вируса.

У абсолютного большинства новорожденных (90-95%) внутриутробная ЦМВ-инфекция протекает бессимптомно. Таким образом, клинические проявления при рождении имеются только у 5-10% внутриутробно инфицированных детей. Учитывая высокий тропизм *ЦМВ* к центральной нервной системе, у 70-90% таких детей в дальнейшем возможны очень серьезные отдаленные последствия – потеря слуха, нарушение зрения, задержка умственного развития и церебральный паралич. Вероятность развития тяжелых форм заболевания значительно возрастает при первичной ЦМВ-инфекции у матери, особенно если вирус попадает к плоду в первой половине беременности. Смертность при тяжелых формах заболевания составляет 30%. [8]

Цель и задачи. Целью данного исследования явилось определение распространенности *ЦМВ* среди беременных женщин в Москве для оптимизации подходов к диагностике и профилактике инфицирования плода.

Материалы и методы. Проведено ретроспективное исследование в период с декабря 2015 по декабрь 2016 года. 420 беременных были выбраны случайным образом среди женщин, которые пришли на свой первый дородовой визит в государственные женские консультации г. Москвы. Из 420 пациенток 391 (93%) были обследованы на *ЦМВ*. Данные медицинской документации 391 женщины, прошедшей скрининговое обследование на выявление антител IgG и IgM к *CMV,* были ретроспективно рассмотрены. Дополнительные данные были получены с помощью структурированного вопросника, разработанного авторами исследования. Запрашиваемая информация, содержащаяся в анкете: возраст, гестационный срок, паритет.

Исследование было одобрено локальным комитетом по этике ПМГМУ им. Сеченова.

Основные результаты. Из 391 обследованной беременной женщины у 308 (78,8%) были обнаружены IgG к *CMV*, тогда как у 83 (21,2%) результаты были отрицательными. Были выявлены 6 (1,5%) случаев концентрации IgM, соответствующей серой зоне, из которых 1 при дальнейшем обследовании подтвердился как реактивация латентной инфекции, остальные же результаты оказались ложнопозитивными. В то же время мы не обнаружили ни одного случая первичной острой цитомегаловирусной инфекции во время беременности (IgG-IgM+).

В таблице представлены соотношения показателей пациенток: возраст, паритет, серопозитивность.

Женщины 24-29 и 30-35 лет составляли большую часть когорты (n = 181 [46,3%] и n = 140 [35,8%] соответственно). Большинство женщин были первородящими или имели в анамнезе одни роды (n = 226 [57,8%] и n = 125 [32%] соответственно).

Отмечается корреляция между ЦМВ-серопозитивностью и возрастными группами. Так, самый высокий уровень серопозитивности отмечен в старшей возрастной группе (возрастная группа 36-41 год – 93,2%).

	Паритет						
Возраст	1	2	≥3	IgG+IgM-	IgG+IgM+	IgG-IgM -	IgG-IgM+
18-23	22	4	0	21 (80,8%)	0	5 (19,2%)	0
24-29	126	49	6	141 (77,9%)	2 (1,1%)	38 (21%)	0
30-35	60	58	22	99 (70,7%)	4 (2,9%)	37 (26,4%)	0
36-41	18	14	12	41 (93,2%)	0	3 (6,8%)	0
Всего	226	125	40	302	6	83	0

Заключение

В России проведение рутинного скрининга беременных на *ЦМВ* не предполагается. Но на практике большинство пациенток проходит серологическое обследование на *ЦМВ* во время беременности. Так, по результатам нашего исследования 93% женщин были обследованы на *ЦМВ*. Однако, несмотря на столь часто проводимую серодиагностику, не существует статистических данных о распространенности цитомегаловирусной инфекции среди беременных женщин в России.

Согласно нашим результатам, серопозитивность к *ЦМВ* беременных женщин в Москве достаточно высока (78,8%). В соответствии с последними исследованиями, этот показатель несколько выше, чем в развитых странах (США – 70%, Норвегия – 58,5-72,1%, Япония – 69,1%), но ниже, чем в развивающихся (Китай – 98,7%, Нигерия – 91,1%, Турция – 97,3%) [1, 2, 3, 6, 7, 9]. При этом мы обнаружили только один случай реактивации латентной инфекции во время беременности и ни одного случая острой ЦМВ-инфекции, то есть той ситуации, в которой наиболее высока вероятность реализации внутриутробной инфекции.

Скрининг на *ЦМВ* обладает невысокой эффективностью и несет большие экономические затраты. Во-первых, оценить риск передачи вируса плоду и тем более развития у него клинически выраженных форм заболевания на основе проводимого серологического обследования чрезвычайно сложно; во-вторых, на сегодняшний день не существует общепринятой специфической терапии внутриутробной ЦМВ-инфекции.

Полученные нами результаты указывают на необоснованность рутинного обследования беременных на *ЦМВ* в Москве. Однако эпидемиологическая обстановка в других регионах России требует уточнения, что позволит оценить целесообразность скрининга беременных на *ЦМВ*.

Список литературы

1. Daisuke Shigemi, Satoru Yamaguchi, Toshiaki Otsuka, Seiryu Kamoi, Toshiyuki Takeshita. Seroprevalence of cytomegalovirus IgG antibodies among pregnant women in Japan from 2009-2014 American Journal of Infection Control, Volume 43, Issue 11, 1218–1221.

2. Doğan K, Güraslan H, Özel G, Aydan Z, Yaşar L. Seroprevalence rates of Toxoplasma gondii, rubella, cytomegalovirus, syphilis, and hepatitis B, seroprevalences rate in the pregnant population in İstanbul. [Article in Turkish] Turkiye Parazitol Derg. 2014 Dec; 38(4): 228-33. doi: 10.5152/tpd.2014.3435.

3. Hamid K., Onoja A., Tofa U., Garba K. Seroprevalence of cytomegalovirus among pregnant women attending Murtala Mohammed Specialist Hospital Kano, Nigeria. *African Health Sciences*. 2014; 14(1): 125-130. doi:10.4314/ahs.v14i1.19.

4. Kenneson A., Cannon M.J.: Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. Rev Med Virol 2007, 17(4): 253–76.

5. Lazzarotto T., Guerra B., Lanari M., Gabrielli L., Landini M.P.: New Advances in the diagnosis of congenital CMV infection. J Clin Virol 2008, 41:192–197.

6. Manicklal S., Emery V.C., Lazzarotto T., Boppana S.B., Gupta R.K. The «Silent» Global Burden of Congenital Cytomegalovirus. *Clinical Microbiology Reviews*. 2013; 26(1): 86-102. doi:10.1128/CMR.00062-12.

7. Odland M.L., Strand K.M., Nordbø S.A., Forsmo S., Austgulen R., Iversen A.-C. Changing patterns of cytomegalovirus seroprevalence among pregnant women in Norway between 1995 and 2009 examined in the Norwegian Mother and Child Cohort Study and two cohorts from Sør-Trøndelag County: a cross-sectional study. BMJ Open. 2013; 3(9): e003066. doi:10.1136/bmjopen-2013-003066.

8. Williams E.J., Gray J., Luck S., Atkinson C., Embleton N.D., Kadambari S., Davis A., Griffiths P., Sharland M., Berrington J.E., Clark J.E.:First estimates of the potential cost and cost saving of protecting childhood hearing from damage caused by congenital CMV infection. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2015 Nov; 100(6): F501-6.

9. Zhang S., Hu L., Chen J., Xu B., Zhou Y.-H., Hu Y. Cytomegalovirus Seroprevalence in Pregnant Women and Association with Adverse Pregnancy/Neonatal Outcomes in Jiangsu Province, China. Gantt S, ed. PLoS ONE. 2014; 9(9): e107645. doi:10.1371/journal.pone.0107645.

ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ МАНИФЕСТНЫХ ФОРМ ВРОЖДЕННОЙ ЭНТЕРОВИРУСНОЙ И ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Юрлова О.В., Быков Ю.Н., Берденникова В.В., Новожилов В.А., Акулич И.С.

ГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет» МЗ, Иркутск, Россия
ОГАУЗ ГИМ ДКБ, отделение хирургии и реанимации, Россия
Независимая лаборатория «Юнилаб», Иркутск, Россия

Введение. Диагностика врожденных инфекций остается одной из приоритетных задач медицины, так как основы здоровья каждого человека закладываются на самых ранних стадиях развития организма. Основным источником внутриутробных инфекций (ВУИ) всегда является организм матери и вертикальный путь передачи инфекции [1, 2]. По данным ряда исследований, в том числе последних лет, в структуре врожденных вирусных инфекций цитомегаловирус является возбудителем антенатального инфекционного процесса у плода в 28-91% случаев, энтеровирус – в 8-18% случаев [3, 4]. Оба возбудителя тропны к нервной ткани, и поражение структур мозга плода инфекционными агентами ведет к тяжелым нарушениям в формировании структур мозга, вторичным изменениям вследствие протекающих воспалительных процессов, формированию врожденных и вторичных пороков развития и, как результат, исходу в нарушения двигательных и психических функций. Данные эпидемиологической ситуации в нашей стране свидетельствуют, что возможность инфицирования беременных существует во всех регионах. Так, за период с 2006 по 2011 г. уровень заболеваемости ЭВИ на территории Иркутской области превышает общероссийский в 1,9–3,7 раза [4].

С 2011 г. на территории Иркутской области выявлена циркуляция серотипов энтеровирусов ECHO 68, ECHO 70, ECHO 71, не циркулировавших ранее. В 2016 году при вспышках энтеровирусной инфекции в нашем регионе и Юго-Восточной Азии верифицирован серотип ECHO 71. В настоящее время энтеровирус 71-го типа рассматривается как один из наиболее значимых патогенных агентов из числа энтеровирусов человека. Таким образом, в существующей эпидемической ситуации в регионе вопросы своевременной диагностики и лечения не только приобретенной энтеровирусной инфекции в популяции, но и ее врожденных форм остаются исключительно актуальными для практического здравоохранения.

Цель и задачи. Изучение и сравнение анамнестических данных, результатов обследования, клинических проявлений врожденной энтеровирусной инфекции (ЭВИ) и цитомегаловирусной инфекции (ЦМВИ) у новорожденных Иркутска и Иркутской области. Выявление клинико-неврологических особенностей течения ВУИ различной этиологии.

Материалы и методы. Проанализированы анамнестические данные, результаты комплексного обследования, эпиданамнез, клинические проявления текущего инфекционного процесса у 71 новорожденного с ВУИ вирусной этиологии. Из них 35 новорожденных с верифицированной врожденной ЭВИ и 36 младенцев с врожденной ЦМВИ. Верификация инфекционного агента проводилось с первых до 28-х суток жизни (стандарты РАСПМ) методом ПЦР в трех и более биологических средах (кровь, ликвор, осадок мочи, биоптатный материал, смывы зева и носоглотки). Среды определялись с учетом преимуществен-

ной локализации воспалительного процесса, где определение инфекционного агента было наиболее вероятно на данном этапе развития заболевания. Серологические тесты матери и ребенку проводились во всех случаях возможности их корректной интерпретации. Известно, что метод ПЦР строго специфичен и выявляет характерную последовательность аминокислот РНК всех патогенных энтеровирусов человека, но не позволяет верифицировать их серотипы. Из группы исследования исключены цитомегаловирусные, герпесвирусные, краснушные, сочетанные врожденные вирусные и первичные бактериальные инфекции. А также пациенты с генетически детерминированной патологией.

Основные результаты. Полученные на протяжении ряда лет данные позволили определить целый ряд специфических и статистически достоверных различий не только в клинических проявлениях врожденных манифестных форм ЭВИ и ЦМВИ, но и в анамнестических данных, развивающихся осложнениях, структурных изменениях, выявляемых методами нейровизуализации. Так, анализ эпидемиологического анамнеза показал, что клинические проявления ОРВИ в III триместре беременности чаще имели матери младенцев с врожденной ЭВИ, что соответствует литературным данным [1]. Возраст матери младше 25 лет чаще наблюдался в группе детей с ЦМВИ. Статистически достоверна разница в гестационном возрасте детей групп исследования. Так, в группе ЭВИ были рождены доношенными 83% с проявлениями поздней инфекционной фетопатии (* U> 3,49; P> 99,92%; x2> 11,28), что соответствует данным о свойствах данного инфекционного агента и его неспособности к длительной персистенции в тканях плода. Вторичный внутричерепной геморрагический синдром (ВЧГС) в 11-25% обеих групп исследования. При этом статистически чаще ВЧГС у доношенных новорожденных наблюдался в группе ЭВИ (* U> 1,96; P> 95%; x2> 3,841). И только в этой группе диагностированы обширные внутримозговые геморрагические инфаркты мозга в зонах пограничного кровоснабжения (n=9). Также характерной особенностью врожденной ЭВИ являлись: внутричерепной оболочечно-гипертензионный синдром без дилятации ликворных путей и резистентный судорожный синдром в остром периоде.

Заключение. Проведенное исследование верифицирует целый ряд статистически достоверных различий в клинической картине, данных результатов обследования, анамнестических данных у новорожденных с ВУИ энтеровирусной и цитомегаловирусной этиологии. Это имеет значение как на этапе выбора диагностических мероприятий, так и в процессе ведения данной категории пациентов.

Список используемой литературы

1. Федеральное руководство по детской неврологии /Под редакцией профессора Гузевой В.И. – М.: 2016: 656-139.

2. Yinon Y., Farine D., Yudin M.H. Cytomegalovirus infektion in pregnancy // J.Obstet Gynoecol.Can. – 2010. – Vol. 32(4). – P. 348-54.

3. Гаврилова Т.А., Севостьянова А.В., Нурсаянова Л.П. и др. Анализ заболеваемости энтеровирусной инфекцией и пейзажа циркулирующих энтеровирусов на территории Иркутской области. Полиомиелит и энтеровирусные инфекции. 2012. Т 2: 1-2.

4. Орджоникидзе Н.В., Ушницкая Е.К. Диагностика внутриутробной инфекции. Акушерство и гинекология. 2008; 5: 12-14.

Раздел 9. ТЕХНОЛОГИИ МОЛЕКУЛЯРНОГО АНАЛИЗА В КРИМИНАЛИСТИКЕ И СУДЕБНОЙ МЕДИЦИНЕ

EXTRACTION OF HIGH QUALITY DNA FROM CONTEMPORARY AND ANCIENT HUMAN SKELETONS

Zupanič Pajnič I.

Laboratory of Molecular Genetics, Institute of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

Introduction. In cases where unidentified skeletonised human remains are found and identification cannot be performed using classical forensic methods, bones or teeth can be used for molecular genetic identification. In recent years the recovery and analysis of DNA from skeletal remains has been applied to several contexts ranging from disaster victim identification to the identification of missing persons and the victims of war conflicts. The condition of the skeletal remains analysed for forensic identifications are often not ideal for DNA recovery. In old bones and teeth, small amounts of degraded endogenous DNA, the presence of polymerase chain reaction (PCR) inhibitors, and the exceptional risk of contamination limit the success of DNA typing.

Aims and tasks. Extraction of high quality DNA from contemporary and ancient human skeletal remains will be presented. Superior extraction techniques that maximise DNA yield from skeletal samples are crucial in the success of DNA amplification in poorly preserved bone samples. For extracting genomic DNA from Second World War (WWII) victim's remains and skeletal remains from archaeological sites, a highly efficient extraction protocol was developed in our laboratory. The same method is also used in our laboratory for molecular genetic identification of contemporary unknown decomposed bodies in routine forensic casework where only bones and teeth are suitable for DNA typing. We analysed more than 150 bones and teeth from WWII mass graves to evaluate this method and additionally some 300 years old bones and teeth from archaeological sites. We also performed the efficiency studies of different commercially available quantification and amplification kits for autosomal STR typing of skeletal remains excavated from WWII mass graves and we found out that they are highly reliable for human quantification and STR typing of old bones and teeth with the DNA extraction method optimised in our laboratory.

Materials and methods. Procedures for processing the bone and tooth samples including mechanical and chemical cleaning, cutting and powdering in the presence of liquid nitrogen, complete demineralization of bone and tooth powder, DNA extraction, DNA purification using magnetic beads, and the precautions and strategies implemented to avoid and detect contamination will be discussed. Extraction protocol that will be presented utilises complete demineralisation of the sample and maximises DNA recovery. Several studies have shown that the total demineralisation method significantly improves DNA quantity and quality from old skeletal material. When drying the bones and teeth at 50°C in an oven or incubator the protocol yields DNA extracts in 28 hours otherwise two more days are needed for complete the extraction procedure when bone and tooth samples are dried at room temperature. The method proved effective from relatively small amount of bone or tooth powder (0.5 g). Less than 0.5 g can be used in case of small sample. In that case the volume of EDTA solution should be adjusted proportionally. The purification procedure using a Biorobot EZ1 (Qiagen) device doesn't use any aggressive organic solvents like phenol or chloroform. It is automated and takes only 20 min to complete. It is based on technology of magnetic particles that are covered with silicon. Such magnetic particles are very efficient for binding DNA, especially in the presence of chaotropic salts (like guanidine thyocyanat GuSCN or guanidine hydroksychloride-GuHCl or NaJ). These salts are highly efficient for nucleic acid cleaning. Chaotropic salts lyse cells, denature proteins, inactivate nucleases and accelerate the binding of DNA to the paramagnetic particles covered with silicon. The whole extraction process is done in a huge filter tip that is thrown away after the procedure is finished. The rest of the extraction reagents are safely placed in a container - cartridge for single use only. Therefore, no manual pipetting is needed. This is very important for prevention of contamination. Any validated human quantification and multiplex STR kit may be used with this extraction method. For autosomal STR typing of skeletal remains excavated from WWII mass graves in Slovenia especially new amplification kits with the extended ESS loci proved highly reliable.

Main results. We successfully identified numerous of victims of massacres that took place after the World War II in Slovenia. We managed to obtain nuclear DNA for successful STR typing from skeletal remains and complete genetic profiles of autosomal DNA, Y-STR haplotypes, and mtDNA haplotypes were obtained from almost all bone and tooth samples analysed from Slovenian WWII mass graves till now. Where living relatives were available, genetic profiles from mass graves skeletons were compared to the genetic profiles of close and distant relatives (brothers, sisters, sons, daughters, nephews, cousins, etc.). High confidence of correct identification of victims, reaching the posterior probability of 99.9 % was usually obtained with statistical analyses for matching profiles. For traceability in the event of contamination, we always create an elimination database for each mass grave, including genetic profiles of the nuclear and mtDNA of all persons that had been in contact with the skeletal remains. In the process of identifying victims of WWII mass graves in Slovenia, we minimize the possibility of contamination during genetic investigations. The authenticity of genetic profiles of bones are confirmed by clean isolation and amplification-negative controls for nuclear DNA, identical genetic profiles obtained using different PCR amplification kits, and mismatch of genetic profiles of bones with persons from the elimination database.

Conclusions. The extraction method has proven highly successful in the analysis of bones and teeth from WWII victims' skeletal remains that have been excavated

from mass graves in Slovenia and is also suitable for genetic identification of relatively fresh human remains. Positive identification of the victims of WWII mass graves was possible where we could collect reference samples from living relatives. Skeletal remains were analysed for the Konfin I mass grave, located in a karst cave, where 88 victims were killed, the karst cave Konfin II mass grave with 62 excavated skeletons and mass graves found in the Storžič forest (4 victims), Bodovlje gorge (25 victims), Mozelj (5 victims), Mačkovec (16 victims), Zaplana (12 victims), Kržeti (3 victims), Mače (2 victims), Babna gora (7 victims), and Krimska jama (35 victims) where massacre victims were excavated.

X-SNPID: ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ДНК-ИДЕНТИФИКАЦИИ, ОСНОВАННАЯ НА МАРКЕРАХ X-ХРОМОСОМЫ

Вагайцева К.В., Харьков В.Н., Степанов В.А.

«Научно-исследовательский институт медицинской генетики» федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», Томск, Россия

Разработка систем генетических маркеров для ДНК-идентификации, основанных на локусах Х-хромосомы, активно ведется по всему миру с начала XXI века. Интерес к данному типу систем обусловлен высокой информативностью Х-хромосомных маркеров для экспертизы, устанавливающей родственные связи. Такая особенность Х-хромосомных маркеров является преимуществом при идентификации останков жертв природных и техногенных катастроф, терактов, жертв военных действий или при идентификации неизвестных, в случаях отсутствия данных об аутосомном генотипе в базах данных. Многочисленные публикации, отмечающие ошибочные результаты экспертиз, определяющих родство, проведенных с использованием аутосомных микросателлитных маркеров, подчеркивают необходимость использования Х-хромосомной системы в качестве дополнительного инструмента в ряде случаев (Li L. et al., 2015). Х-хромосомные маркеры могут быть использованы для определения родства тогда, когда в анализе участвует хотя бы одна женщина, точнее, в случаях когда у участвующих в экспертизе индивидов возможно наличие общих по происхождению аллелей Х-хромосомы.

Несмотря на активный интерес, утвержденных стандартов для Х-хромосомных систем не существует. В различных странах ведутся разработки наиболее информативных наборов маркеров на основе данных о генетической структуре популяций, проживающих на их территории. Особенность России с точки зрения интерпретируемости данных при ДНК-идентификации состоит в ее многонациональности. Вследствие того что полиморфизм маркеров Х-хромосомы обладает расовой и этнической специфичностью, необходимо создание баз данных, содержащих информацию по нескольким референсным популяциям, представляющим наиболее многочисленные этнические группы.

Цель и задачи. Разработка высокоинформативной тест-системы, основанной на Х-хромосомных маркерах, для популяций, проживающих на территории РФ. Формирование референсной базы данных.

Материал и методы. Материалом исследования послужили образцы ДНК индивидов, не состоящих в родстве, без метисации, принадлежащих к популяциям РФ и сопредельных государств (Банк ДНК «НИИ медицинской генетики»). Работа проводилась с использованием мультиплексной ПЦР с последующим анализом методом MALDI-TOF масс-спектрометрии на генетическом анализаторе MassARRAY Analyzer 4 (Agena Bioscience, США). Определение частот аллелей, гетерозиготности и других характеристик проводилось стандартными биостатистическими методами.

Основные результаты. Формирование перечня высокоинформативных маркеров проводилось на основе данных о частотах 2867 SNP в 26 популяционных выборках (русские, карелы, абхазы, адыгейцы, башкиры, белорусы, буряты, украинцы, чеченцы, черкесы, чуваши, ханты, казахи, карачаевцы, кабардинцы, узбеки, молдаване, мегрелы, киргизы, кеты, коми, татары, удмурты, якуты).

Выбор однонуклеотидных полиморфизмов в качестве маркера разрабатываемой системы обусловлен несколькими причинами: SNP являются наиболее распространенным типом генетической изменчивости у человека, что дает возможность формировать разнообразные мультиплексы; небольшие размеры ампликонов позволяют работать с деградированной ДНК; меньшее число артефактов при проведении ПЦР и пробоподготовке образцов. Кроме того, SNP обладают низким темпом мутации, что является преимуществом для проведения экспертизы, устанавливающей родственные связи. Отбор наиболее информативных маркеров проводился в несколько этапов. На первом этапе, на основании частот встречаемости аллелей для 26 популяций, были рассчитаны значения ожидаемой гетерозиготности по 2867 SNP-маркерам Х-хромосомы. Опираясь на среднее значение ожидаемой гетерозиготности в популяциях, были отобраны наиболее информативные для ДНК-идентификации маркеры SNP-маркеров Х-хромосомы. На втором – из перечня были исключены потенциально сцепленные локусы, расположенные на расстоянии менее 1000000 п.н. При отборе учитывались значения ожидаемой гетерозиготности с целью отсортировать максимально информативные маркеры. На третьем – были сформированы мультиплексы для MALDI-TOF масс-спектрометрии, включающие достаточное количество информативных маркеров. Сформированная таким образом система генетических маркеров, получившая название X-SNPid, содержит 66 SNP-маркеров, образующих два мультиплекса для MALDI-TOF масс-спектрометрии. Полученные мультиплексы успешно прошли валидацию и верификацию результатов. Анализ

генетической структуры 7 популяций (русские, сибирские татары, ханты, хакасы, казахи, буряты, тувинцы) позволил сформировать референсную базу данных и оценить информативность X-SNPid для каждой популяции с учетом результатов анализа неравновесия по сцеплению (таблица 1) (Stepanov V.A. et al., 2016; Степанов В.А. и др., 2016).

Таблица 1. Показатели идентификационной информативности тест-системы

	PDf	PDm	PE
Русские	0,99999999999999999999999986	0,999999999999999986	0,99998
Тувинцы*	0,9999999999999999999697	0,99999999999998	0,9998
Ханты	0,999999999999999999997	0,999999999999997	0,99992
Казахи	0,99999999999999999999999883	0,999999999999999984	0,99997
Буряты*	0,999999999999999999999999999986	0,999999999999999999866	0,9999987
Сибирские татары	0,9999999999999999999999997	0,999999999999999989	0,9999878
Хакасы	0,999999999999999999999996	0,9999999999999994	0,99995

* Популяции, для которых необходимо учитывать частоты гаплотипов при вероятностных расчетах.

Заключение. Система генетических маркеров X-SNPid, разработанная для проведения экспертизы на установление родства в популяциях, проживающих на территории РФ, показала высокую идентификационную информативность. Для системы маркеров сформирована референсная база частот аллелей, содержащая информацию по 7 популяциям: русские, сибирские татары, ханты, хакасы, казахи, буряты, тувинцы.

Список литературы

1. Li L., Lin Y., Liu Y., et al (2015) A case of false mother included with 46 autosomal STR markers. Investig Genet. 6:9. doi: 10.1186/s13323-015-0026-y. eCollection 2015.

2. Stepanov V., Vagaitseva K., Kharkov V., et al (2016) Forensic and population genetic characteristics of 62 X chromosome SNPs revealed by multiplex PCR and MALDI-TOF mass spectrometry genotyping in 4 North Eurasian populations. Leg Med (Tokyo). 18:66-71. doi: 10.1016/j.legalmed.2015.12.008.

3. Степанов В., Вагайцева К., Харьков В. и др. (2016) Панель однонуклеотидных сцепленных с Х-хромосомой полиморфных маркеров для ДНК-идентификации (XSNPid) на основе мультиплексного генотипирования с использованием методов многолокусной ПЦР и масс-спектрометрии MALDI-TOF. Молекулярная биология. 50 (3): pp. 445-456. doi: 10.1134/S0026893316030158.

ОСОБЕННОСТИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ЭКСПЕРТНОГО СОПРОВОЖДЕНИЯ РАССЛЕДОВАНИЯ АВИАКАТАСТРОФ (ПО СОБЫТИЯМ 2015–2016 ГГ.)

Иванов П.Л., д.б.н., проф., Земскова Е.Ю., к.м.н., Тимошенко Т.В.

ФГБУ «Российский Центр судебно-медицинской экспертизы» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

В 2015–2016 гг. в России случились как минимум три масштабные авиакатастрофы. 31 октября 2015 г. в результате теракта над территорией Египта произошло крушение российского авиалайнера «Airbus-321 Метроджет» (рейс EI-ETJ Шарм-эль-Шейх – Санкт-Петербург). 19 марта 2016 г. в аэропорту г. Ростова-на-Дону разбился при посадке «Боинг-737-800» A6-FDN FLYDubai (рейс 981 Дубай – Ростов-на-Дону). 25 декабря 2016 г. упал в море в Адлерском районе г. Сочи спецборт Минобороны России Ту-154Б2 № 85572, следовавший в г. Латакию в Сирийской Республике.

Жертвами этих чрезвычайных ситуаций (ЧС) стали российские и иностранные граждане – всего, по официальным данным, 378 человек.

В ходе поисковых операций во всех случаях были обнаружены обломки самолетов и фрагменты биологического происхождения (останки тел).

Для установления личности погибших и принадлежности обнаруженных на месте катастрофы останков пассажирам и членам экипажа из обнаруженных фрагментов тел были изъяты образцы для идентификационного исследования, а у родственников погибших пассажиров и членов экипажа получены референтные образцы в виде образцов крови или буккального эпителия.

По этим объектам, в рамках возбужденных СК России уголовных дел, были назначены и проведены в ФГБУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Минздрава России (РЦСМЭ) судебно-медицинские молекулярно-генетические экспертизы общим числом более 20.

Вопросы, поставленные на разрешение экспертов, не исчерпывались только идентификацией обнаруженных останков погибших, но касались также установления локализации членов экипажа и пассажиров в кабине и в салоне потерпевших крушение воздушных судов в момент катастрофы. Поэтому объектами экспертизы явились в том числе смывы с приборных панелей кабины, вырезы тканей кресел и другие объекты, содержащие биологические следы.

Количество фрагментов, представленных на исследование, и их физическое состояние очень сильно разнились. Это обусловлено разными условиями, в которых происходило разрушение воздушных судов, разными условиями внешней среды в районе катастрофы, разными условиями проведения поисковых операций и другими факторами. В результате теракта над Синаем погибли 224 человека, и общее количество найденных фрагментов составило 1049. При авиакатастрофе в Ростове-на-Дону погибли 62 человека, а общее количество объектов экспертизы составило 4472. На борту погибшего воздушного судна Минобороны Росии Ту-154Б2 № 85572, следовавшего в сирийский город Латакию, находилось 92 пассажира и члена экипажа; в акватории Адлерского района г. Сочи удалось найти порядка 250 фрагментарных останков.

Итоговые результаты выполненных экспертных исследований – с точки зрения полноты решения следственной задачи – также различаются, и анализ этих различий представляет большой интерес.

В самом последнем по дате случае – аварии воздушного судна Минобороны России Ту-154Б2 № 85572 над акваторией Черного моря в районе г. Сочи – экспертами была установлена принадлежность *всех обнаруженных на данный момент* фрагментарных останков конкретным 74 погибшим лицам из списочного состава пассажиров и члена экипажа, находившихся на борту потерпевшего крушение воздушного судна. Но при этом среди всех исследованных фрагментов не были обнаружены останки еще 18 человек из числа лиц, находившихся на борту. По этой причине поисковая операция в Адлерском районе г. Сочи была продолжена. В ее ходе на месте происшествия обнаружены новые фрагменты биологического происхождения (останки тел), которые подлежат молекулярно-генетической идентификации. Эта задача успешно выполняется.

В то же время, в случае разбившегося при посадке «Боинг-737-800» A6-FDN FLYDubai (рейс 981 Дубай – Ростов-на-Дону), были установлены останки *всех без исключения* пассажиров и членов экипажа. И даже больше: в ходе молекулярно-генетического исследования были обнаружены останки еще одного человека, которого не было в списке находившихся на борту. Эти останки идентифицировали как ребенка одной из погибших пассажирок. Сложность следственной ситуации заключалась в том, что это оказался *еще не рожденный ребенок* (плод) этой пассажирки, находившейся на ранней стадии беременности.

В случае же гибели авиалайнера «Airbus-321 Метроджет» (рейс EI-ETJ Шарм-эль-Шейх – Санкт-Петербург) были установлены останки только 217 человек из списочного состава 224 пассажиров и экипажа. Не были обнаружены останки 7 пассажиров. В то же самое время значительная часть найденных фрагментов оказалась непригодна для идентификации.

Примечательно, что этот последний результат (о непригодности), как и положено, являлся полноценным *экспертным выводом* – то есть был аргументирован результатами проведенных исследований. Тем не менее, в силу некоторых причин, у следствия возникли сомнения в полноте и результативности выполненных в РЦСМЭ исследований, касающихся непригодных объектов, и оно решило провести их повторное исследование.

Повторная экспертиза была назначена и выполнена совместными силами двух ведомств: это филиал № 2 ФГКУ «111 Главный государственный центр судебно-медицинских и криминалистических экспертиз» Минобороны России (г. Ростов-на-Дону) и отдел медико-криминалистических исследований управления организации экспертно-криминалистической деятельности Главного управления криминалистики Следственного комитета России (г. Москва).

В ходе этих исследований экспертам указанных лабораторий, по их мнению, удалось распознать в одном обгоревшем фрагменте останки одного из 7 отсутствующих пассажиров…

Однако этот важный результат оказался недостоверным и позже был опровергнут.

Подробности этого казуса и его негативное значение будут обсуждены в докладе.

ДЕГРАДАЦИЯ ДНК В СМЫВАХ С ТЕЧЕНИЕМ ВРЕМЕНИ

Фалеева Т.Г.[1,2], Иванов И.Н.[1], Мишин Е.С.[1], Корниенко И.В.[2,3]

[1] ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия
[2] Филиал № 2 ФГКУ «111 Главный государственный центр судебно-медицинских и криминалистических экспертиз» Минобороны России, Ростов-на-Дону, Россия
[3] ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет», Ростов-на-Дону, Россия

Введение. Отпечатки пальцев относятся к наиболее информативному и распространенному объекту, оставленному на месте преступления [1]. В настоящее время, наряду с методом дактилоскопической визуализации, молекулярно-генетический анализ является одним из самых доказательных методов анализа биологических следов, в том числе потожировых следов (ПЖС) человека [2]. Большое значение имеет выбор метода обнаружения и сбора ПЖС, их транспортировка, длительность хранения перед осуществлением исследований [3]. В экспертной практике при работе со смывами ПЖС, осуществленными на месте происшествия при помощи деионизованной воды, получение полного генетического профиля лица, оставившего свои следы, сопряжено со значительными трудностями.

Цель и задачи. Целью работы стало исследование деградации ДНК в смывах, выполненных при помощи деионизованной воды, с течением времени. Для реализации указанной цели были поставлены следующие задачи: осуществить смывы препаратов ДНК низкой концентра-

ции, как модели ДНК потожирового вещества подушечек пальцев, при помощи деионизованной воды, экстрагировать ДНК из проведенных смывов через различные временные промежутки и оценить концентрацию ДНК в полученных препаратах.

Материалы и методы. В качестве ДНК-матрицы использовали контрольную ДНК человека из тест-набора «XY-Детект» («Синтол») в конечной концентрации 0,25 нг/мкл. Наносили по 20 мкл препаратов ДНК на интактную пластиковую поверхность и сушили в течение двух суток при +22 °С в закрытом ПЦР-боксе без доступа УФИ. Проводили смывы при помощи стерильной хлопчатобумажной ткани, смоченной в 20 мкл деионизованной воды, и хранили выполненные смывы в указанных выше условиях. По истечении срока хранения на ткань наносили по 20 мкл деионизованной воды. Были сформированы группы: смывы «0 суток» (то есть смывы не подвергались хранению) и смывы, хранимые в течение 5, 7 и 30 суток. Каждому сроку соответствовали по 12 параллелей. Помещали ткань с осуществленными смывами в пластиковые колонки с решетчатым дном, которые вставляли в 1,5 мл пробирки типа Эппендорф. Центрифугировали пробирки при 13000 – 14000 g в течение 5 минут. Оценку количества ДНК в фильтрате оценивали на термоциклере с мультиканальным детектором в режиме «реального времени» (РВ) iQ5 (Bio-Rad, США) с использованием набора реактивов для определения количества фрагментов ДНК гена β-актина, фрагментов гена амелогенина, локализованного на X (p22.1-22.3) и Y (p11.2) хромосомах человека «XY-Детект» («Синтол»). Эффективность ПЦР, рассчитанная по концентрациям стандартных ДНК (5 нг/мкл, 1нг/мкл, 0,2 нг/мкл, 0,04 нг/мкл и 0,008 нг/мкл), составила 0,971. Анализ данных РВ-ПЦР проводили с помощью программы iQ5 Optical System Software (версия 2.0).

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием программы STADIA [4]. Ввиду того, что распределения значений в группе «30 суток» отличались от нормального, статистический сравнительный анализ проводили с использованием непараметрических методов.

Результаты. Медианы выборок «0 суток», «5 суток», «7 суток» и «30 суток» (0,2864; 0,0114; 0,0133 и 0,0016 соответственно) указывают на то, что уже спустя 5–7 суток концентрация ДНК в смывах, выполненных с помощью деионизованной воды, уменьшается более чем в 20 раз, а в смывах, которые хранились в течение 30 суток – в 179 раз. Различия между переменными в исследуемых группах оценивали с помощью критериев Вилкоксона и Ван дер Вардена (сдвига/положения). Достоверность различий в концентрациях ДНК в смывах, хранимых в течение 5, 7 и 30 суток при комнатной температуре, приведены в таблице 1.

Таблица 1. Достоверность различий в концентрациях ДНК в смывах, хранимых 5, 7 и 30 суток (различия между медианами выборок)

Срок хранения выполненных смывов	Различия между медианами выборок	
	Критерий Вилкоксона	Критерий Ван дер Вардена
0 суток / 5 суток	Есть различия	Есть различия
0 суток / 7 суток	Есть различия	Есть различия
0 суток / 30 суток	Есть различия	Есть различия
5 суток / 7 суток	Нет различий	Нет различий
5 суток / 30 суток	Есть различия	Есть различия
7 суток / 30 суток	Есть различия	Есть различия

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о существенном уменьшении концентрации ДНК с течением времени в смывах, проведенных при помощи деионизованной воды: более чем в 20 раз спустя 5–7 суток и в 179 раз спустя 30 суток. Проведенное исследование подтверждает предположение о деградации ДНК в выполненных смывах в условиях отсутствия стабилизирующих ее факторов, что имеет особое значение в отношении смывов потожирового вещества, где содержится изначально малое количество генетического материала.

Список литературы

1. Trapecar M. Techniques for fingerprint recovery on vegetable and fruit surfaces used in Slovenia – a preliminary study / M. Trapecar, M. K. Vinkovic // Sci Justice. – 2008. – Vol. 48. – № 4. – P. 192–195.

2. Фалеева Т.Г. Проблемы молекулярно-генетической идентификации потожировых следов отпечатков пальцев человека / Т.Г. Фалеева, И.Н. Иванов, Е.С. Мишин, Н.В. Внукова, И.В. Корниенко // Судебно-медицинская экспертиза. – 2016. – № 2. – С. 14–18.

3. Фалеева Т.Г. Сравнительное исследование методов изъятия и выделения ДНК из потожировых наложений, находящихся на поверхности металлических предметов (на примере результатов судебной молекулярно-генетической экспертизы) / Т.Г. Фалеева, Е.С. Мишин, И.Н. Иванов, И.В. Корниенко // Труды Петербургского научного общества судебных медиков (Теория и практика судебной медицины) / Под ред. проф. И.Н. Иванова. – СПб. – ООО «ИПК «Береста»». – 2015. – Вып. 11. – С. 124–127.

4. Кулайчев А.П. Методы и средства анализа данных в среде Windows. Stadia 6.0. / А.П. Кулайчев. – М.: Информатика и компьютеры. – 1996. – 257 с.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СВЯЗЬ «МАТЬ – РЕБЕНОК» КАК ВАЖНЕЙШИЙ АСПЕКТ КРИМИНАЛИСТИЧЕСКОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ ДЕТОУБИЙСТВ

Перепечина И.О.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Введение. Под детоубийством принято понимать убийство матерью ее новорожденного ребенка. Обобщение данных Судебного Департамента при Верховном Суде РФ показывает, что в 2010-2016 гг. в Российской Федерации по статье 106 УК РФ, которой предусмотрена ответственность за данное преступление, осужден был в общей сложности 381 человек: 65 (2010), 66 (2011), 60 (2012), 75 (2013), 42 (2014), 45 (2015), 28 (2016 – 1-е полугодие) человек в год [1]. Опасность этих преступлений очень велика уже только потому, что они связаны с посягательством на жизнь детей. Надо полагать также, что в связи с латентностью этих преступлений, приобретающей особую остроту в связи с высоким уровнем миграции, в особенности нелегальной, а также неустановлением в ряде случаев виновных, указанные цифры не отражают в полной мере реальное положение вещей в данной сфере.

Современное состояние проблемы расследования детоубийств во многом определяют возможности применяемых при расследовании судебно-экспертных технологий, в особенности методов исследования ДНК, обеспечивающих индивидуализацию.

Целью работы является рассмотрение некоторых криминалистических аспектов, связанных с использованием генетических данных, получаемых в ходе расследования детоубийств.

Исследовалась одна из основополагающих категорий криминалистики – криминалистическая характеристика (КХ), под которой понимают систему закономерно связанных между собой криминалистически значимых признаков преступления, знание которых способствует расследованию. Выявление существующих между отдельными элементами КХ взаимосвязей имеет большое криминалистическое значение. В качестве элементов КХ, как правило, выделяют способ, механизм и обстановку преступления, типологические черты личности субъекта преступления и потерпевшего, иногда некоторые другие элементы.

Основные результаты. В большинстве случаев между элементами КХ существует лишь вероятная связь. Что касается детоубийства, то здесь мы имеем дело с тем редким случаем, когда связь между субъектом преступления (матерью) и потерпевшим (ребенком), в силу их генетического родства, однозначна. Данное обстоятельство, которое до настоящего времени не нашло отражения в криминалистической литературе, имеет существенное значение как для расследования преступления, так и для последующего доказывания. Оно тем более важно, что в данном случае биологическая связь является практически единственной связью между субъектом преступления и потерпевшим: иные связи (межличностные и др.), которые при других убийствах могут иметь место и нести криминалистически значимую информацию, в случае детоубийства отсутствуют.

Существенность указанной взаимосвязи предъявляет высокие требования к качеству информации, на основе которой происходит установление данного факта, к достоверности заключения эксперта. Это касается всех этапов выполнения экспертного генетического исследования, включая интерпретацию результатов. Особое место здесь занимает оценка идентификационного значения данных, полученных на основе вероятностно-статистического анализа, поскольку вопрос о критериях идентификации априори уязвим в силу их конвенционального характера. Это требует максимально взвешенного подхода к выбору таких критериев.

Однако действующий в настоящее время методический документ – Приказ Минздравсоцразвития РФ № 346н от 12 мая 2010 г. [2], которым регламентирован уровень доказательности установления отцовства, материнства при проведении судебно-медицинской экспертизы, страдает серьезными недостатками. Ранее [3] была обоснована ошибочность ряда положений главы VII «Молекулярно-генетические экспертные исследования» Приказа Минздрава РФ № 161 от 24 апреля 2003 г. [4]. Так, возражения в этом документе вызвала нелогичная по самой своей сути регламентация разных критериев достоверности идентификации для «трио» (мать – ребенок – предполагаемый отец) и «дуэта» (ребенок – предполагаемый отец [мать]). Неприемлемой является категоричность регламентации научно не обоснованного и очевидно низкого уровня доказательности установления отцовства, материнства, который для «трио» и «дуэта» указан в Приказе как 99,90% и 99,75% соответственно. Обеим указанным величинам соответствует недопустимо большая для правоприменения ошибка идентификации (а следовательно – экспертного вывода). В особенности это касается последней величины (в случаях детоубийств в идентификации участвует, как правило, «дуэт» – в терминах Приказа), когда ошибка возможна в среднем в 1 случае из 400. Понятно, что при указанном уровне рассматривать экспертное заключение как достоверное судебное доказательство нельзя. Был отмечен также ряд других важных аспектов, вызывающих серьезные критические замечания.

К сожалению, после отмены Приказа № 161 данные положения перешли без изменений в Приказ Минздравсоцразвития РФ № 346н от 12 мая 2010 г., действующий по настоящее время. Поскольку следование регламентациям указанного документа, ввиду их научной необоснованности, может привести к ошибочным экспертным выводам, необходима его серьезная переработка.

Заключение/выводы. Анализ элементов КХ детоубийств, а также их взаимосвязей свидетельствует о тесной связи таких элементов, как личность субъекта преступления (матери) и потерпевшего (ребенка), имеющей, в силу генетического родства, однозначный характер. Это делает данную взаимосвязь ключевым аспектом в КХ, обусловливая определяющее значение этой взаимосвязи для расследования и последующего доказыва-

ния. Это диктует необходимость предъявления высоких требований к уровню и качеству экспертного исследования, в ходе которого устанавливается наличие такой взаимосвязи. Указанные требования должны касаться не только практической реализации (конкретных судебных экспертиз), но и, прежде всего, методических документов, которыми регламентируется проведение данных исследований. Действующий в настоящее время Приказ Минздравсоцразвития РФ № 346н от 12 мая 2010 г. в части молекулярно-генетических экспертных исследований нуждается в существенной переработке.

Список использованной литературы

1. Официальный сайт Судебного департамента при Верховном Суде России: URL: http://www.cdep.ru // СПС «КонсультантПлюс» (дата обращения: 02.02.2017 г.).

2. Об утверждении Порядка организации и производства судебно-медицинских экспертиз в государственных судебно-экспертных учреждениях Российской Федерации. Приказ Минздравсоцразвития РФ № 346н от 12 мая 2010 г. // СПС «КонсультантПлюс».

3. Перепечина И.О., Животовский Л.А. Оценка идентификационного значения генетических данных при судебно-медицинском установлении отцовства (материнства) // «Криминалистические средства и методы в раскрытии и расследовании преступлений». Часть III. ЭКЦ МВД РФ. Москва, 2004. – С. 23-26.

4. Об утверждении инструкции по организации и производству экспертных исследований в бюро судебно-медицинской экспертизы. Приказ Минздрава РФ № 161 от 24 апреля 2003 г. (утратил силу).

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ В ПРАКТИКЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ

Пехов В.М.[1], Игнашкин М.А.[1], Кол Н.В.[1], Павлов А.Е.[2], Пильщикова Н.С.[2]

[1] Отдел медико-биологических исследований управления организации экспертно-криминалистической деятельности Главного управления криминалистики СК России, Москва

[2] ООО «Парсек Лаб», Санкт-Петербург (www.parseq.ru)

На сегодняшний день основным методом исследования ДНК в криминалистической генетической экспертизе является анализ полиморфизма длин амплифицированных фрагментов (ПДАФ) микросателлитных тандемных повторов (STR-локусов). Современные криминалистические ДНК-лаборатории как в России, так и в мире оснащены капиллярными генетическими анализаторами, которые позволяют выполнять одновременное определение аллельных вариантов до 25 STR-локусов. Для идентификации личности и разрешения вопросов родства на уровне «родитель-ребенок» такой метод в значительном количестве случаев вполне успешен и достаточен.

Однако бурное развитие инструментов и методов масштабного исследования генома, в первую очередь высокопроизводительного секвенирования (MPS, massive parallel sequencing), которое происходит в последнее десятилетие, открывает новые возможности и для криминалистической ДНК-экспертизы.

Высокопроизводительное секвенирование ДНК позволяет анализировать не только длину STR-локусов, но и их последовательность; совмещать в рамках одного анализа STR и однонуклеотидные полиморфизмы (SNP-локусы), анализируя параллельно от десятков до сотен и даже тысяч маркеров. Применение высокопроизводительного секвенирования существенно расширяет возможности ДНК-экспертизы – становится возможным получить ДНК-профиль при работе с высокодеградированной ДНК, увеличить идентификационную значимость результатов, анализировать сложные смешанные следы, определять фенотипические характеристики и этногеографическое происхождение, устанавливать дальнее родство и др.

Поэтому в отделе медико-биологических исследований управления организации экспертно-криминалистической деятельности Главного управления криминалистики СК России с 2015 года проводится работа по внедрению высокопроизводительного секвенирования в экспертную практику: в 2015-16 гг. выполнено несколько разноплановых экспертиз. В работе было использовано комплексное решение VariFind™ HID solution, разработанное российской компанией ООО «Парсек Лаб» (г. Санкт-Петербург) и включающее наборы реагентов и специальное программное обеспечение для хранения и анализа получаемых данных.

В состав VariFind™ HID solution входит несколько различных наборов, в том числе VariFind™ Identity assay, предназначенный для идентификации личности и определения родства, и VariFind™ Phenotype assay, разработанный для определения отдельных фенотипических признаков. В состав VariFind™ Identity assay на момент проведения описанных ниже экспертиз входило две панели маркеров – VariFind™ ID-L и VariFind™ ID-S, включающие 538 и 508 локусов и предназначенные для работы с нормальной и сильнодеградированной ДНК соответственно.

Типирование полиморфных локусов, входящих в наборы VariFind™ HID solution (ООО «Парсек Лаб», Россия), проводили с использованием технологии таргетного обогащения Ion AmpliSeq™ (Life Technologies), с последующим секвенированием полученных ампликонов на приборе Ion PGM™ (Life Technologies).

Так, в рамках повторной молекулярно-генетической экспертизы по уголовному делу, возбужденному по факту совершения насильственных действий сексуального характера (далее – НДСХ) в отношении малолетней Т., на исследование был предоставлен сухой абортивный материал. В этом материале выявлена сильнодеградированная ДНК, содержащая преобладающее количество ДНК потерпевшей Т. и незначительное количество ДНК мужской принадлежности (соотношение мужской и женской ДНК – 1:70), каковым является эмбрион. Достоверно

выявить аутосомные генетические признаки мужского компонента в смеси не представилось возможным ни традиционным методом, ни методом высокопроизводительного секвенирования. Однако секвенирование позволило дополнительно определить генетические варианты 31 SNP-локуса Y-хромосомы, что в совокупности с традиционным анализом 25 STR-локусов Y-хромосомы выявило полное совпадение гаплотипов неродившегося ребенка и обвиняемого Б., позволив существенно повысить идентификационную значимость полученных результатов.

В рамках молекулярно-генетической экспертизы по уголовному делу, возбужденному по факту убийства Т.Ю, на исследование были предоставлены костные останки и образец сравнения от дочери Т.Ю. – Т.Е. Из костных останков была выделена ДНК с очень высокой степенью деградации, что при использовании стандартных методов ДНК-анализа не позволило получить полный STR-профиль (выявлено 15 из 23 исследуемых локусов). Выявленные 15 локусов не позволили однозначно ответить на вопрос экспертизы. Применение VariFind™ HID solution позволило выявить 45 локусов с несовпадающими между генотипом Т.Е. и представленными костными останками аллелями. Полученные данные позволили исключить родство Т.Е. и неустановленного мужчины, чьи костные останки представлены на исследование.

В рамках производства молекулярно-генетической экспертизы по уголовному делу, возбужденному по резонансному убийству, на представленных предметах одежды были обнаружены биологические следы неустановленного мужчины. ДНК, выделенная из следов, была исследована с использованием набора реагентов VariFind™ Phenotype v1.1 (ООО «Парсек Лаб», Россия) с целью определения фенотипических признаков мужчины. Проведен анализ 24 аутосомных SNP-локусов, входящих в модель HIrisPlex, для определения цвета глаз и волос. В результате исследования установлено, что мужчина имеет голубой, серый или серо-голубой цвет глаз (общая точность модели по литературным данным – 84%) и вариант русого цвета волос (общая точность модели по литературным данным – 73%). Полученная информация применяется в оперативной работе.

Таким образом, высокопроизводительное секвенирование является важным методом, который позволяет получать дополнительную информацию в случаях, которые не могут быть разрешены традиционными подходами, существенно расширяя возможности криминалистической ДНК-экспертизы.

ПРИМЕНЕНИЕ КОМПЛЕКСА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ПРИ РЕШЕНИИ ЗАДАЧИ ИДЕНТИФИКАЦИИ ЛИЧНОСТИ В НЕТРИВИАЛЬНОЙ СИТУАЦИИ

Смоляницкий А.Г., Смоляницкая А.И.

ГКУЗ Ленинградской области «Бюро судебно-медицинской экспертизы», С.-Петербург, Россия

Введение. В статье рассмотрен случай непрямой идентификации без вести пропавшего мужчины, считавшегося похищенным вместе с сыном и криминально погибшим. Через несколько лет в правоохранительные структуры по почте стали поступать заявления от гр-на А. с жалобами на действия правоохранительных органов. В одном из писем были вложены образцы крови и образцы волос заявителя. Из заявления следовало, что гр-н А. вынужден скрываться от криминальных структур и от правоохранительных органов. В случае подлинности заявления и образцов уголовное дело приобретало новое направление. Прямые образцы сравнения отсутствовали. Непрямая идентификация могла быть проведена только по генотипу брата гр-на А. – гр-ну М., образец крови которого был предоставлен следствием.

Цель и задачи. Принципиально важным было доказать, что именно от гр-на А., а не от возможных других представителей семейной группы происходят присланные биологические материалы.

Материалы и методы. Типирование полиморфных STR-локусов ядерной ДНК из объектов и образцов для сравнительного исследования проводили с помощью наборов реагентов AmpFℓSTR™ Identifiler Plus PCR Amplification Kit производства фирмы Applied Biosystems, США. Для генетического типирования применяли также набор реагентов AmpF/STR® Yfiler™ PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, США). В состав набора входят 17 систем анализа коротких тандемных повторов, локализованных на Y-хромосоме человека. Разделение и детекцию флюоресцентно меченных амплифицированных фрагментов проводили с использованием прибора ABI PRISM® 310 и программного обеспечения производства фирмы Applied Biosystems, США. Длину амплифицированных фрагментов определяли по отношению к внутренним стандартам (Size Standard GeneScan 500LIZ), которые входят в состав наборов, с помощью программного обеспечения GeneMapper™ Software v.3.2.1. Генетический анализ полиморфизма митохондриальной ДНК (мтДНК) проводили с использованием специфических праймеров для энзиматической амплификации полиморфных локусов ГВС 1 и ГВС 2 на матрице мтДНК. Применяли набор праймеров Mito*Plex (ООО «ГОРДИЗ», Россия). ПЦР вели в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Очистка ПЦР-фрагментов проводилась на специальных колонках с силиконовой мембраной, входящих в состав набора. Далее ставили реакции секвенирования, то есть установления последовательности нуклеотидов полученных фрагментов мтДНК. Эта процедура была выполнена с использованием набора реагентов BigDye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) и в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Считывание первичной нуклеотидной последовательности проводили с использованием автоматизированного анализатора ДНК – модель ABI Prism® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Регистрируемые данные обработаны с использованием встроенных программных

средств (DNA Sequencing Analysis Software v.5.1.1), которые на выходе обеспечивают расшифровку нуклеотидной последовательности анализируемого фрагмента мтДНК в гипервариабельной области.

Основные результаты. В экспертизе был применен набор аутосомных систем анализа для установления происхождения присланных биологических материалов от одного или нескольких лиц, а также исключения принадлежности крови и волос брату гр-на А. [1]. После получения доказательств принадлежности образца крови и образцов волос одному мужчине и исключения их принадлежности брату гр-на А. использовали блок систем, локализованных на Y-хромосоме, наследуемой исключительно по мужской линии [2]. В результате были получены доказательства родственной связи по мужской линии между мужчиной, образцы крови и волос которого поступили на экспертизу, и братом гр-на А. Однако однозначно высказаться о принадлежности образца крови и образцов волос гр-ну А. проведенные исследования не позволяли. Происхождение образцов от безвестно отсутствующего сына гр-на А., его внука, а также потомков гр-на М. по мужской линии формально не исключалось на данном этапе идентификации. Необходимо было исключить или подтвердить достаточно отдаленные степени родства, при этом, когда генетическая дистанция, разделяющая родственников по вертикали, превышает одно поколение, а также при исследовании горизонтальной схемы родства типа «брат-брат» верификация родственных связей с помощью анализа одной лишь хромосомной ДНК оказывается малоинформативной. Необходимым дополнением к проведенным традиционным идентификационным исследованиям, а в данном случае решающим этапом стало типирование митохондриальной ДНК [3, 4]. Анализ полиморфных последовательностей мтДНК гр-на М., доставленных в отделение образца крови и образцов волос выявил один и тот же митотип, что указывает на родство по материнской линии гр-на М. и мужчины, образцы биологического материала которого исследованы.

Выводы. В рассматриваемом нетривиальном случае установления родственных связей между братьями по матери и отцу были задействованы комплексы систем генетического анализа, основанные на трех различных типах наследования. В результате было доказано единое происхождение образца крови и образцов волос, по исходной версии принадлежащих гр-ну А. (блок аутосомных локусов), наличие родственных связей по мужской линии между мужчиной, образцы которого проанализированы, и гр-ном М., братом гр-на А. (блок локусов на Y-хромосоме). Наконец, вывод о родстве по материнской линии был сделан после установления митотипа мужчины, образцы которого доставлены для исследования, и митотипа гр-на М. Таким образом, применение комплексного подхода при проведении генетического анализа позволило максимально конкретизировать ответ на вопрос следствия о принадлежности предоставленных биологических образцов брату по матери и отцу гр-на М.

Список используемой литературы

1. Иванов П.Л. Использование индивидуализирующих систем на основе полиморфизма длины амплифицированных фрагментов (ПДАФ) ДНК в судебно-медицинской экспертизе идентификации личности и установления родства. Судебно-медицинская экспертиза. 1999. № 4.

2. Budowle B., Sinha S.K., Lee H.S., and Chakraborty R. Utility of Y-chromosome short tandem repeat haplotypes in forensic applications. Forensic Science Review. 2003; 15: 153–162.

3. Иванов П.Л. Применение молекулярно-генетической индивидуализирующей системы на основе полиморфизма нуклеотидных последовательностей митохондриальной ДНК в судебно-медицинской экспертизе идентификации личности и установления биологического родства. Методические указания. М., 2001.

4. Parsons T.J., Holland M.M. Mitochondrial DNA sequence analysis – validation and use in forensic casework. Forensic Science Review. 1999; 11: 21-50.

ОБ ЭКСПЕРТНОЙ ОЦЕНКЕ ОБЪЕКТОВ, СОДЕРЖАЩИХ ДНК ДВУХ ИЛИ БОЛЕЕ ЛИЦ

Культин А.Ю.

ФГКУ «Экспертно-криминалистический центр Министерства внутренних дел Российской Федерации», Москва, Россия

В экспертной практике нередки случаи, когда исследуемый объект представляет собой смесь биологических следов разных лиц. На «смешанный» характер происхождения объекта могут указывать обстоятельства дела; внешний вид биологических следов и объектов исследования; результаты цитологического исследования; выявление специфичного аллельного профиля, содержащего более двух аллелей.

Разделение ДНК следов, содержащих биологические следы различного вида (например, сперму и кровь), принципиально возможно, но часто на практике полного разделения не происходит и получаемый аллельный профиль содержит смесь аллельных профилей нескольких лиц. Разделить ДНК следов одного вида, произошедших от разных лиц, не представляется возможным.

Актуальность рассмотрения темы экспертной оценки объектов, содержащих ДНК двух или более лиц, обусловлена большим количеством экспертных ошибок, возникающих при анализе таких объектов, а также имеющимися различиями в подходах к анализу данных объектов у разных исследователей.

Основные проблемы эксперта при анализе объектов, содержащих ДНК двух или более лиц, можно свести к следующим.

Во-первых, это определение достоверности полученного профиля, т.е. оценка его пригодности для дачи заключения эксперта.

Во-вторых, это выбор верного алгоритма вероятностно-статистической оценки идентификационной зна-

чимости установленного профиля с учетом известных обстоятельств дела.

В-третьих, это определение критерия достаточности идентификационной значимости установленного профиля для дачи категорического вывода.

В связи с такими сложностями некоторые исследователи считают «смешанный» объект вообще непригодным для интерпретации. В результате значительное количество объектов, которые могли бы являться доказательствами, исключаются из материалов дела и в ряде случаев лицо, причастное к совершению преступления, может избежать наказания. Другим, аналогичным подходом является учет лишь преобладающего компонента «смешанного» объекта и исключение всех остальных его составляющих. Такой подход приводит к неверным и ложным экспертным выводам об исключении происхождения объекта от лица, генетические признаки которого присутствуют в смеси, но не в преобладающем количестве.

Другой крайностью является, наоборот, учет всех сигналов, вне зависимости от тех или иных свойств полученного профиля. В этом случае возникает эффект теоретического привлечения в качестве подозреваемых большого круга лиц, которые фактически в данной смеси отсутствуют. Это приводит к практической непригодности полученного профиля для поиска из широкого круга лиц, что, в свою очередь, ведет к масштабным, неэффективным и экономически затратным скринингам.

При решении вопроса о принятии полученного профиля в качестве достоверного следует учитывать его интенсивность (высоту), количество и соотношение компонентов смеси.

Высота полученного профиля является одной из важнейших характеристик полученной электрофореграммы. Только достаточная высота сигналов может обеспечить выявление полного профиля по исследованным локусам и внутри исследованных локусов. При низкой высоте существенным становится эффект преимущественной амплификации, что приводит как к невозможности выявления полного профиля, так и к более вероятному выявлению различных неспецифических сигналов, и в результате – к ложному генотипированию. Конкретные значения высот сигналов, позволяющие интерпретировать профиль как достоверный, зависят от применяемого оборудования и могут быть экспериментально установлены при проведении соответствующих валидационных исследований.

Следующий параметр – это количество компонентов смеси. Чем меньше компонентов, тем выше вероятность достоверного установления профиля. Как правило, пригодными оказываются только объекты, содержащие ДНК двух или трех лиц. При большем количестве лиц, составляющих профиль смешанного объекта, их достоверная идентификация практически невозможна.

Соотношение компонентов смеси оказывает влияние на возможность учета минорных компонентов. При соотношениях компонентов более чем 1:4 или 1:5 наблюдаются выпадения аллелей минорного компонента, что не позволяет его достоверно учитывать. При таких соотношениях возможен учет только преобладающего компонента.

Таким образом, только после учета параметров полученного профиля принимается решение о его допустимости для вероятностно-статистической оценки.

При оценке следует учитывать, что отличием профиля «смешанного» объекта от профиля объекта, содержащего ДНК одного человека, является то, что профиль, выявляемый при исследовании объекта, содержащего ДНК двух или более лиц, может отличаться от составляющих его аллельных профилей. Любое попарное сочетание выявленных аллелей будет соответствовать генотипу лица, от которого не исключается происхождение исследуемого объекта. Критерием исключения является отсутствие в профиле объекта аллелей, имеющихся у проверяемого лица.

Оценка идентификационной значимости генетических признаков, выявляемых в «смешанных» объектах, проводится одним из двух основных способов.

Первый способ заключается в оценке величины вероятности события: лицо, проходящее по делу, к этому делу не причастно, а его генетические признаки случайно совпадают с профилем исследуемого объекта, т.е. в оценке значения вероятности случайного совпадения генетических признаков. Чем меньше величина этой вероятности, тем меньше вероятность того, что это лицо является случайным лицом, и тем выше идентификационная значимость генетических признаков.

Во втором способе оценивается величина отношения правдоподобия (*likelihood ratio, LR*) двух альтернативных событий или, иначе говоря, двух противоположных гипотез, объясняющих происхождение исследуемого объекта, имеющего профиль (*E*): $LR = P(E|C1) / P(E|C2)$. Первая из этих гипотез (*C1*) заключается в том, что исследуемый объект, имеющий профиль *E*, действительно произошел от лица (или лиц), проходящего по делу. Вторая гипотеза (*C2*), противоположная первой, заключается в том, что этот объект произошел от неизвестного лица (или лиц), а генетические признаки лица (или лиц), проходящего по делу, случайно совпадают с профилем *E*.

В простых экспертных случаях методы оценки совпадают. В более сложных, когда выполнение гипотезы *C1* может быть связано с каким-либо условием, метод оценки с помощью отношения правдоподобия имеет преимущества, так как позволяет наиболее полно учитывать все обстоятельства дела.

Определение критерия достаточности идентификационной значимости установленного профиля для дачи категорического вывода может быть решено путем сравнения полученного значения с эталонным числом, основой для которого может являться численность населения Земли.

Литература

1. Перепечина И.О., Гришечкин С.А. Экспертная оценка и математическая обработка результатов исследования объектов, содержащих ДНК двух и более лиц: Методические рекомендации – М.: ЭКЦ МВД России, 1997.

2. Пименов М.Г., Культин А.Ю., Кондрашов С.А. Научные и практические аспекты криминалистического ДНК-анализа: Учебное пособие. – М: ГУ ЭКЦ МВД России, 2001.

3. Культин А.Ю., Стороженко И.В. Применение частот встречаемости аллелей аутосомных STR-локусов для повышения идентификационной значимости результатов исследования ДНК: Методические рекомендации. – М.: ЭКЦ МВД России, 2013.

4. Кузнецов С.В. Судебно-медицинская статистическая оценка происхождения смешанных следов крови // Вестн. Сев.-Зап. гос. мед. ун-та им. И.И. Мечникова. 2016. Т. 8, № 1. 2016. С. 79-86.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ «НОВЫХ» SNP, ОБЛАДАЮЩИХ ДИФФЕРЕНЦИРУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТЬЮ ДЛЯ РАЗЛИЧЕНИЯ ОСОБЕЙ *SUS SCROFA DOMESTICUS* И *SUS SCROFA SCROFA*

Кипень В.Н.[1], Снытков Е.В.[2]

[1] ГУ «Научно-практический центр Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь», Минск, Республика Беларусь

[2] УО «Международный государственный экологический институт им. А.Д. Сахарова» БГУ, Минск, Республика Беларусь

Введение. Кабан европейский (*Sus scrofa scrofa*) является наиболее распространенным объектом, в отношении которого фиксируются факты незаконной охоты на территории Республики Беларусь. В ГУ «Научно-практический центр Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь» (Минск, Республика Беларусь) с 2015 г. проводятся экспертные исследования по фактам браконьерства в отношении вида *Sus scrofa scrofa* с использованием метода ПДРФ-ПЦР. По состоянию на конец 2016 г. решение задачи по дифференциации дикого кабана от домашней свиньи осуществляется посредством анализа двух SNP: c.367G>A (*MC1R*) и g.299084751C>T (*NR6A1*). Точность дифференциации в этом случае составляет не менее 98,3%.

В то же время, как было первоначально показано в исследовании [1] и впоследствии подтверждено нами [2] с помощью биоинформатического анализа данных полногеномных проектов по секвенированию образцов вида *Sus scrofa*, существует достаточно большое количество альтернативных SNP, пригодных для решения той же задачи. Исследование полиморфных вариантов c.367G>A (*MC1R*) и g.299084751C>T (*NR6A1*) нашло свое развитие, в первую очередь, в контексте того факта, что эффект от нуклеотидных замен в данных локусах ассоциирован с фенотипическим проявлением: для *MC1R* – окрас кожи и волосяного покрова [3], для *NR6A1* – различное количество позвонков [4]. Однако значимые (т.е. пригодные для решения конкретной задачи, в нашем случае – дифференциация дикого кабана от домашней свиньи) миссенс-замены встречаются значительно реже, чем замены в интронных областях. Основное внимание при поиске «новых» SNP как раз и было сосредоточено на них, тем более что в существующих коммерческих чипах средней и высокой плотности (Pig_GSeek80K, Pig_Affy650k, Pig_Illu60Kv1, Pig_Illu60Kv2) они также количественно превалируют.

Цель и задачи. С учетом ранее полученных результатов [2] по анализу полиморфных вариантов из чипа Pig_Illu60K (Illumina) для образцов дикого кабана (24 шт.) и домашней свиньи (породы крупная белая, ландрас, дюрок, пьетрен, мейшань – 91 шт.) оценить дифференцирующий потенциал 25 SNP, расположенных на X-хромосоме в диапазоне 56716179-63109515.

Материалы и методы. Анализ был выполнен с помощью алгоритма SRA Nucleotide BLAST и программы BioEdit v.7.2.5. Количество включенных в анализ SNP – 25 (rs80801780, A/T, X:56716179; rs80817425, G/T, X:56777155; rs81473227, G/T, X:56808512; rs80903635, A/G, X:57672455; rs80891217, G/T, X:58094394; rs321949235, C/T, X:58412329; rs80924261, A/C, X:58568494; rs80985865, C/T, X:58594054; rs80987186, C/T, X:58828801; rs81473228, C/T, X:58911107; rs330095107, A/G, X:59339614; rs80936726, X:59374460; rs81473257, A/C, X:59411403; rs80803330, G/T, X:60471958; rs80981028, C/T, X:60656889; rs80998473, A/C, X:62086511; rs80979282, C/T, X:62216010; rs321294367, G/T, X:62342620; rs80925206, A/G, X:62429427; rs339458440, G/T, X:62454725; rs331950236, A/C, X:62473840; rs80980235, G/T, X:62629920; rs80843461, C/T, X:62650052; rs80862185, A/G, X:62675407; rs81473281, C/T, X:63109515); число полногеномных прочтений для дикого кабана – 24, для коммерческих пород домашней свиньи – 91 (крупная белая – 19, ландрас – 23, пьетрен – 6, дюрок – 28, мейшань – 15). Общее количество проанализированных сиквенсов >16,0 млрд.

Основные результаты. Из 25 проанализированных SNP только для двух – rs81473228 (H3GA0051811) и rs80981028 (H3GA0051814) – была показана строгая специфичность: частота специфической аллели для дикого кабана составила 82,6% и 87,5% соответственно. Для всех коммерческих пород в рамках данного исследования было показано наличие только одного генотипа.

Дополнительный анализ с использованием алгоритма MDR (Multifactor dimensionality reduction, [5]), направленный на оценку возможного совместного наследования, выявил наличие строгой сцепленности между локусами (вероятность рекомбинации локусов в мейозе составляет менее 2%).

Полиморфный вариант rs81473228 (H3GA0051811) расположен в интронной области гена *HEPH* (Gene ID: 100512938). Функция ортолога *HEPH* у человека схожа с функцией церулоплазмина, белок гефестин содержит гомологичный церулоплазмину активный центр и участки связывания меди. Гефестин участвует в метаболизме железа – он окисляет Fe^{2+} в Fe^{3+}, является ферментом ферроксидазой и содержит 6 ионов меди.

Выводы. Таким образом, используя современные алгоритмы анализа «сырых» данных (SRA) проектов полногеномного секвенирования, нам удалось описать

новые SNP – rs81473228 (H3GA0051811) и rs80981028 (H3GA0051814), – которые отличаются высокой частотой специфической для дикого кабана аллели (более 80%). Анализ данных SNP может быть использован при решении задачи по дифференциации дикого кабана от домашней свиньи.

Список используемой литературы

1. Ramos, A.M. Identification of high utility SNPs for population assignment and traceability purposes in the pig using high-throughput sequencing / Ramos A.M., Megens H.J., Crooijmans R.P. [et al.] // Anim Genet. 2011 Dec; 42(6): 613-20. doi: 10.1111/j.1365-2052.2011.02198.x. Epub 2011 Apr 25.

2. Кипень, В.Н. Анализ полногеномных SRA-данных проектов NGS для решения криминалистической задачи дифференциации диких кабанов и домашних свиней на основе уникальных SNP / Кипень В.Н., Котова С.А. // 4-я Всероссийская научно-практическая конференция по геномному секвенированию «Геномное секвенирование – 2016», Москва, 2016, с. 21.

3. Fajardo, V. Differentiation of European wild boar (Sus scrofa scrofa) and domestic swine (Sus scrofa domestica) meats by PCR analysis targeting the mitochondrial D-loop and the nuclear melanocortin receptor 1 (MC1R) genes / Fajardo V., González I., Martín I. [et al.] // Meat Sci. 2008 Mar; 78(3): 314-22. doi: 10.1016/j.meatsci.2007.06.018. Epub 2007 Jul 5.

4. Fontanesi, L. Differentiation of meat from European wild boars and domestic pigs using polymorphisms in the MC1R and NR6A1 genes / Fontanesi L., Ribani A., Scotti E. [et al.] // Meat Sci. 2014 Dec; 98(4): 781-4. doi: 10.1016/j.meatsci.2014.07.026. Epub 2014 Aug 5.

5. Moore, J.H. A flexible computational framework for detecting, characterizing, and interpreting statistical patterns of epistasis in genetic studies of human disease susceptibility // J Theor Biol. 2006, p. 252-61.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ДНК В ПОТОЖИРОВОМ ВЕЩЕСТВЕ НА КОЖЕ РУК ЧЕЛОВЕКА (ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Фалеева Т.Г.[1,2], Иванов И.Н.[1], Мишин Е.С.[1], Корниенко И.В.[2,3]

[1] ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

[2] Филиал № 2 ФГКУ «111 Главный государственный центр судебно-медицинских и криминалистических экспертиз» Минобороны России, Ростов-на-Дону, Россия

[3] ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет», Ростов-на-Дону, Россия

Введение. Высокоинформативным и доказательным методом исследования биологических объектов является ДНК-идентификация. Потожировые следы человека (ПЖС) – один из наиболее распространенных и сложных объектов молекулярно-генетических исследований. Вывод о том, что следы на том или ином предмете оставлены определенным лицом, имеет важное, а часто решающее значение для изобличения преступника, так как устанавливается факт пребывания конкретного лица на месте преступления, его непосредственный контакт с конкретным предметом [1]. Наиболее часто с жертвой и (или) орудиями преступлений контактируют руки человека. Перспектива обнаружения ПЖС преступника на теле жертвы особенно актуальна и в то же время сложна, поскольку требует специального подхода к исследованию и интерпретации результатов генотипирования.

Цель и задачи. Целью работы стало определение количества ДНК в потожировом веществе на коже рук человека. Для реализации указанной цели были поставлены следующие задачи: получить потожировое вещество с поверхности подушечек пальцев, ладоней и передней поверхности предплечий, экстрагировать ДНК из потожировых выделений и оценить концентрацию ДНК в полученных препаратах.

Материалы и методы. Объектом данного исследования явилась ДНК потожировых выделений на коже рук десяти мужчин в возрасте от 24 до 47 лет. У каждого мужчины были отобраны образцы потожирового вещества с поверхности подушечек десяти пальцев рук, центра обеих ладоней, центра передней поверхности обоих предплечий при помощи клейкой ленты размером 1 х 1 см путем однократной аппликации. Экстракцию ДНК осуществляли при помощи набора реагентов PrepFiler™ User Guide согласно инструкции производителя [2]. Оценку количества выделенной ДНК производили на термоциклере с мультиканальным детектором для оценки продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме «реального времени» (РВ-ПЦР) iQ5 (США) Bio-Rad. Для энзиматической амплификации локуса гена HBG (Human beta globin) длиной 120 нуклеотидных пар использовали следующую пару праймеров [3]:

HBG1: 5'-GCTTCTGACACAACTGTGTTCACTAGC-3'

HBG2: 5'-CACCAACTTCATCCACGTTCACC-3'

Регистрацию накопления ампликонов в «реальном времени» и построение калибровочных кривых проводили по технологии выполнения РВ-ПЦР, основанной на связывании фрагментов двухцепочечной ДНК с интеркалирующим красителем EVA Green. Для этого использовали базовый набор реактивов для проведения РВ-ПЦР в присутствии интеркалирующего красителя EVA Green (Синтол). Проводили амплификацию в режиме, описанном в таблице 1.

Эффективность РВ-ПЦР, вычисленная по стандартной кривой, составила 92,3% (R^2=0,988). Анализ данных РВ-ПЦР проводили с помощью программы «iQ5 Optical System Software» (версия 2.0). Температура плавления ПЦР-продукта составляла 84,5±0,5 °С. Учитывая, что мы работали с очень низкими концентрациями ДНК-матриц,

Таблица 1. Режим амплификации исследуемых препаратов ДНК

95 °C	3 мин	
95 °C	10 сек	45 циклов
55 °C	30 сек	
55-95 °C	15 сек	Плавление с шагом 0,5 °C (81 цикл)

нередко, помимо специфичных ПЦР-продуктов, наблюдали появление неспецифичных ампликонов, о которых судили по температурам плавления, отличным от 84,5±0,5 °C. Концентрацию ДНК в таких случаях определяли по следующей формуле:

$C = C_{общ} \times P$,

где $P = C_{сп} / (C_{сп} + C_{несп})$

Обозначения:

C – концентрация ДНК в препарате;

$C_{общ}$ – суммарная концентрация всех ампликонов;

P – доля ампликонов с температурой плавления 84,5±0,5 °C;

$C_{сп}$ – концентрация ампликонов с температурой плавления 84,5±0,5 °C;

$C_{несп}$ – концентрация неспецифичных ампликонов.

Долю специфичных ампликонов определяли по высоте пиков, соответствующих температуре плавления 84,5±0,5 °C. Долю неспецифичных ампликонов определяли по высоте пиков, соответствующих иным температурам плавления.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием программы STADIA [4]. О достоверности отличий показателей судили по величине t-критерия Стьюдента. Статистически достоверными считали отличия, соответствующие оценке ошибки вероятности $p<0,05$. Наличие линейной корреляции между признаками оценивали с использованием коэффициентов корреляции, достоверность которых проверяли с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты. По результатам проведенных исследований установлена средняя концентрация ДНК в потожировом веществе на подушечках пальцев рук (0,04636 нг/мкл), на ладонях (0,1281 нг/мкл) и на передней поверхности предплечий (0,01975 нг/мкл) десяти мужчин.

Таким образом, нормированное количество ДНК на 1 $см^2$ кожи составило, для подушечек пальцев рук – 2,318 нг; для ладоней – 6,405 нг; для передней поверхности предплечий – 0,988 нг.

Выводы. Наибольшая концентрация ДНК отмечается в потожировом веществе ладоней, наименьшая – на передней поверхности предплечий. Промежуточное значение концентрации ДНК в потожировом веществе отмечено на подушечках пальцев рук.

Список литературы

1. Моисеева Т.Ф. Методология комплексного криминалистического исследования потожировых следов человека: Дисс. … докт. юрид. наук. – М. – 2002. – 307 с.

2. PrepFiler Express™ and PrepFiler Express BTA™ Forensic DNA Extraction Kits User Guide. Applied Biosystems. Life Technologies Corporation. Grand Island. – 2010.

3. Cawthon R.M. Telomere measurement by quantitative PCR / R.M. Cawthon // Nucleic Acids Research. – 2002. – Vol. 30. – № 10. – P. 47.

4. Кулайчев А.П. Методы и средства анализа данных в среде Windows. Stadia 6.0. / А.П. Кулайчев. – М.: Информатика и компьютеры. – 1996. – 257 с.

ТЕХНОЛОГИЯ СОЗДАНИЯ СУДЕБНОЙ РЕФЕРЕНТНОЙ БАЗЫ ДАННЫХ ПО 18 STR ДЛЯ ДНК-ИДЕНТИФИКАЦИИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Удина И.Г.[1], Веремейчик В.М.[2], Котова С.А.[2], Цыбовский И.С.[2]

[1] ФБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова», Москва, Россия

[2] Государственное учреждение «Научно-практический центр Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь», Минск, Республика Беларусь

Введение. В судебной медицине и криминалистике ДНК-идентификация применяется для установления отцовства и биологического родства, установления личности жертв терактов, различных стихийных бедствий, таких как цунами и землетрясения, катастроф, крушений, а также погибших в различных войнах и преступников. Для проведения статистических расчетов при проведении ДНК-идентификации необходимо создание популяционных баз данных по судебным аутосомным микросателлитам (STR), которые используются как референтные базы данных (reference data bases). Формирование судебных баз ДНК-данных для судебной экспертизы требует сбора образцов, проведенного с учетом структуры популяции.

Цель и задачи. Разработка технологии по созданию судебной референтной базы данных для ДНК-идентификации в Республике Беларусь по 18 судебным аутосомным STR на основе популяционного, «семейного» и криминалистического массива генотипов.

Материалы и методы. Для населения Республики Беларусь описано создание судебной референтной базы данных на основе 18 аутосомных микросателлитов (STR) с использованием популяционных данных (N=1040) из 11 локальных выборок (1), «семейного» массива генотипов (N=2550) (2,3), полученного при проведении экспертиз по установлению отцовства, и массива генотипов из базы криминалистического учета (N=8756) (4). По данным ан-

кетирования, изученные популяционные выборки состоят на 80% из этнических белорусов и на 20% из лиц другой национальности или смешанных по происхождению. Объединенная база данных включает генотипы 12346 жителей Республики Беларусь из 118 региональных выборок, изученных по 18 аутосомным микросателлитам: 16 тетрануклеотидных STR (D2S1338, TPOX, D3S1358, CSF1PO, D5S818, D8S1179, D7S820, THO1, vWA, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, F13B и FGA) и два пентануклеотидных STR (Penta D и Penta E) (5).

Основные результаты. По распределению генотипов 18 судебных STR исследованные выборки находятся в равновесии Харди – Вайнберга. Достоверные отличия не выявлены как между отдельными популяциями, так и между выборками из различных историко-этнографических регионов Республики Беларусь (Западное и Восточное Полесье, Поднепровье, Понеманье, Поозерье и Центр), что указывает на отсутствие выраженной генетической подразделенности. Достоверных различий между изученными тремя массивами генотипов также не выявлено, что позволило их объединить и рассматривать суммарную выборку как единую судебную референтную базу данных для 18 судебных STR-локусов. Отличия между референтной базой Республики Беларусь и русскими и украинцами по распределению спектра аутосомных STR также не выявлены, что соответствует близкому генетическому родству трех восточнославянских народов, обусловленному общим происхождением и интенсивными взаимными миграциями. По отдельным STR-локусам установлены достоверные различия между референтной базой Республики Беларусь и популяциями южных и западных славян.

Заключение. Представлена технология создания судебной референтной базы данных для Республики Беларусь на основе популяционного, «семейного» и криминалистического массива генотипов по 18 судебным аутосомным STR. Для обеспечения судебно-экспертной практики в Республике Беларусь показана необходимость использования собственной референтной базы данных, так как обнаружено несколько достоверных различий между частотами судебных микросателлитов в Республике Беларусь и частотами, рекомендованными производителями стандартных наборов для ДНК-идентификации – фирмами «Promega» и «Applied Biosystems». Предложено использование отдельных судебных баз данных для столицы Республики Беларусь – Минска как мегаполиса с характерными генетико-демографическими процессами, а также для районов с компактным проживанием этнических меньшинств, особенно для меньшинств неславянского происхождения, например, цыган.

Благодарности. Работа частично поддержана Программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Живая природа: Современное состояние и проблемы развития» (Подпрограмма «Динамика и сохранение генофондов»).

Список используемой литературы

1. Zhivotovsky L.A., Veremeichyk V.M., Mikulich C.A. et al. A comprehensive population survey on the distribution of STR frequencies in Belarus // Forensic Sci. Int. 2007. V. 172. № 2–3. P. 156–160.

2. Zhivotovsky L.A., Veremeichyk V.M., Kuzub N.N. et al. A reference data base on STR allele frequencies in the Belarus population developed from paternity cases // Forensic Sci. Int. Genet. 2009. V. 3. № 3. e107–e109.

3. Веремейчик В.М., Кузуб Н.Н., Котова С.А. и др. Полиморфизм 18 аутосомных ДНК-маркеров генома человека у населения Беларуси // Весці Нац. акад. навук Беларусі. Сер. Біялагіч. навук. 2009. № 1. С. 56–62.

4. Цыбовский И.С., Веремейчик В.М., Крицкая С.В. и др. Референтная база данных аутосомных ДНК-маркеров: возможности анализа больших массивов генотипов современного населения Беларуси // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. 2009. Т. 53. № 6. С. 94–99.

5. Цыбовский И.С., Веремейчик В.М., Котова С.А. и др. Создание судебной референтной базы данных по 18 аутосомным STR для ДНК-идентификации в Республике Беларусь. Генетика. 2017. № 2. В печати.

МАРКЕРЫ Y-ХРОМОСОМЫ В ДНК-ИДЕНТИФИКАЦИИ: ДОСТИЖЕНИЯ, ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Харьков В.Н., Степанов В.А.

Научно-исследовательский институт медицинской генетики федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», Томск, Россия

Введение. Для ДНК-маркеров Y-хромосомы показан наибольший уровень генетической дифференциации между популяциями в сравнении с любыми другими генетическими системами [1]. В результате специфичности наследования и отсутствия рекомбинации Y-хромосомы этническая специфичность различных линий (гаплотипов и субгаплогрупп) при достаточном числе используемых маркеров позволяет проводить определение этнотерриториального происхождения индивида. В настоящее время разработаны и применяются коммерческие наборы ДНК-маркеров Y-хромосомы на основе STR, которые рутинно используются для ДНК-идентификации. К сожалению, их использование малоинформативно для определения этнической принадлежности индивида, поскольку для повышения идентификационного потенциала в состав наборов входят STR, имеющие высокий темп мутирования. Получаемые гаплотипы хорошо дифференцируют разные образцы, но относительно слабо дифференцируют образцы, принадлежащие представителям разных этнических групп. Дополнительный анализ гаплотипов Y-хромосомы в настоящее время наиболее эффективен в случаях биологических образцов со

смесью мужской и женской ДНК, а также при непрямой идентификации личности, когда сравнительный материал представлен в основном родственниками по мужской линии.

В последние годы произошел настоящий прорыв в популяционной генетике, связанный с широким внедрением методов NGS-секвенирования, как для полногеномного генотипирования образцов, так и для поиска новых информативных SNP-маркеров в различных гаплогруппах Y-хромосомы. Использование новых высокоинформативных специфичных SNP-маркеров Y-хромосомы является одним из наиболее перспективных инструментов для разработки методов ДНК-идентификации личности. Развитие методов массового параллельного секвенирования вывело анализ генофондов популяций на максимально возможный уровень разрешения. Обнаружение огромного числа новых информативных маркеров позволяет исследовать филогенетические взаимосвязи отдельных линий внутри гаплогрупп с невозможной ранее точностью [2]. Генотипирование новых SNP-маркеров может служить не только дополнением, но и альтернативой ДНК-идентификации по аутосомным локусам. При этом возможно создание эффективных тест-систем для определения наиболее вероятного этнического (этнотерриториального) происхождения индивида.

Цель и задачи. Оценка возможности и точности определения этнотерриториального происхождения индивида с помощью комплексного анализа гаплотипов Y-хромосомы на основе генотипирования YSTR- и SNP-маркеров.

Материал и методы. Материалом исследования послужили образцы ДНК индивидов, не состоящих в родстве, без метисации, принадлежащих к популяциям РФ и сопредельных государств (Банк ДНК «НИИ медицинской генетики»). Генотипирование SNP проводили с помощью ПЦР и последующего анализа различными методами. Генотипирование YSTR проводили с помощью капиллярного гель-электрофореза на генетических анализаторах ABI Prism 3130xl и 3730. Статистическая обработка проводилась стандартными методами.

Основные результаты. Формирование перечня потенциально высокоинформативных SNP-маркеров проводилось на основе работы с генетическими базами данных и литературой. Если 10-15 лет тому назад генотипирование новых SNP и YSTR далеко не всегда приводило к значительному увеличению информативности выбранной тест-системы, то сейчас можно отбирать ДНК-маркеры, широкий полиморфизм которых уже подтвержден. Более того, можно выбирать как быстро мутирующие STR, для подробного анализа относительно молодых сублиний, так и маркеры с гораздо более медленным темпом мутирования, выделяющие в пределах отдельных гаплогрупп региональные и этноспецифичные кластеры гаплотипов. К сожалению, для большинства новых SNP-маркеров отсутствует информация об их популяционных частотах. Мы выбрали недавно обнаруженные в различных гаплогруппах Y-хромосомы SNP, потенциально информативные для молекулярно-филогенетического анализа гаплогрупп и этнической идентификации в популяциях европейской части России, Сибири и Дагестана. После отбора SNP был проведен подбор условий генотипирования, преимущественно с помощью ПДРФ-анализа, выполнен подбор соответствующих ферментов и олигонуклеотидных праймеров.

Показано, что большая часть новых SNP, в сочетании с YSTR-гаплотипами, обладает большой этнической специфичностью. В большинстве случаев сравнительный анализ случайно выбранных образцов позволяет провести этнотерриториальную привязку образца с точностью до этноса или субэтноса. Это означает возможность эффективно использовать SNP- и YSTR-маркеры для разработки тест-систем и ДНК-идентификации. Точность определения зависит от принадлежности образца к конкретной гаплогруппе, особенностей ее распространения в популяциях, частоты SNP у различных этносов и специфичности YSTR-гаплотипа.

Генотипирование новых высокоинформативных маркеров показывает, что в пределах большинства гаплогрупп Y-хромосомы наблюдается разделение не только на этноспецифические линии, но и на более узкие сублинии и кластеры гаплотипов. Большинство этнических генофондов характеризуются преобладанием или даже полным доминированием специфичных SNP по всем основным гаплогруппам. Степень детализации зависит практически лишь от количества SNP- и STR-маркеров, используемых для построения гаплотипа.

Заключение. SNP-маркеры, в большом количестве обнаруживаемые с помощью методов массового параллельного секвенирования, имеют огромный потенциал для использования в этнической идентификации биологических образцов мужчин. К сожалению, для подавляющего большинства из них отсутствуют систематические сведения о частотах аллелей и гаплотипов в популяциях России, которые можно было бы использовать в качестве референсных. Для разработки новых эффективных тест-систем на основе Y-хромосомных маркеров для определения популяционной принадлежности неизвестного индивида необходимо проведение массового популяционного скрининга, отбор информативных SNP, дифференцирующих генофонды различных популяций, разработка методов их совместного генотипирования и создание референсных баз данных частот генотипов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-60222 мол_а_дк.

Список литературы

1. Jobling M.A., Tyler-Smith C. The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age // Nat. Rev. Genet. 2003. V. 4. P. 598-612.

2. Ilumae A-M., Reidla M., Chukhryaeva M., et al. Human Y Chromosome Haplogroup N: A Non-trivial Time-Resolved Phylogeography that Cuts across Language Families // AJHG. 2016. V. 99. P. 16-173.

Раздел 10. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА В ГЕНЕТИКЕ МОНОГЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

ОПЫТ МЕДИКО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОНСУЛЬТИРОВАНИЯ И ДНК-ДИАГНОСТИКИ У ДЕТЕЙ С ПОКАЗАНИЯМИ К ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПЕЧЕНИ

Поляк М.Е., Филин А.В., Ховалыг А.Б., Метелин А.В., Букаева А.А., Семенков А.В., Заклязьминская Е.В.

ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского», Москва, Россия

Введение. Развитие цирроза в исходе неустановленного заболевания печени у пациентов детского возраста часто диктует необходимость трансплантации печени. Как правило, такие семьи нуждаются не только в хирургическом лечении и последующем наблюдении, но и в медико-генетическом консультировании, ДНК-диагностике и помощи в планировании семьи.

Цель. Целью нашего исследования было изучение спектра заболеваний у российских пациентов с подозрением на моногенные заболевания печени, требующие проведения трансплантации печени в раннем возрасте (до 17 лет включительно).

Материалы и методы. Во всех семьях было проведено первичное и повторное медико-генетического консультирование, определения тактики ДНК-диагностики. Информированное согласие на забор и хранение биологического материала (венозной крови) было получено от родителей и/или законных представителей пациентов. Геномная ДНК была выделена стандартными методами. ДНК-диагностика проводилась методами ПЦР-ПДРФ (частые мутации в гене *ABCB11*), прямого двунаправленного секвенирования по Сэнгеру отдельных генов либо методом секвенирования нового поколения фрагментных библиотек на платформе IonTorrent с последующим подтверждением выявленных генетических вариантов методом секвенирования по Сэнгеру.

Результаты. За период 2013-2016 гг. в лаборатории медицинской генетики ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского» медико-генетическое консультирование и/или ДНК-диагностика были выполнены для 45 семей пациентов с поражением печени. В ходе обследования были исключены вторичные причины поражения печени (вирусные гепатиты, аутоиммунный гепатит, токсическое поражение печени), наследственные болезни обмена и болезнь Вильсона – Коновалова. В группу пациентов с идиопатическим поражением печени вошло 34 человека, в 8 семьях родители планировали следующую беременность. Средний возраст пациентов составил 5,6 года (минимальный – 3 месяца, максимальный – 17 лет). В группе пациентов преобладал предполагаемый диагноз «синдром Алажилля/порок развития желчевыводящих путей» – 13 пациентов (38%), вторым по частоте был предполагаемый диагноз «прогрессирующий семейный внутрипеченочный холестаз (ПСВХ)» – 6 пациентов (17,6%). Это согласуется с литературными данными – билиарная атрезия и синдром Алажилля названы одной из частых причин холестаза среди детей. У 5 (14,7%) пациентов был диагностирован гепатит/жировой гепатоз/фиброз печени неясной этиологии. Для 24 пациентов была проведена ДНК-диагностика в различном объеме, мутации были выявлены в 11/24 (45,8%) случаев. В группе пациентов с направляющим диагнозом «синдром Алажилля/порок развития желчевыводящих путей» мутации в гене *JAG1* были выявлены в 5/9 случаев (55,5%). В группе пациентов с диагнозом «ПСВХ» в 4/6 случаев были выявлены две мутации в генах *ABCB11* и *ATP8B1*, что соответствует аутосомно-рецессивному характеру заболевания, в 2/6 случаев была выявлена одна мутация.

Заключение. Поиск мутаций в отдельных генах в такой гетерогенной группе пациентов, как пациенты детского возраста с показаниями к трансплантации печени, может быть эффективен для пациентов с отдельными направляющими диагнозами, такими как «синдром Алажилля» или «ПСВХ». Общая частота обнаружения мутаций при таком подходе составила 45,8%. Для увеличения эффективности стратегии ДНК-диагностики была разработана расширенная диагностическая панель генов, ответственных за наследственные поражения печени, трудно диагностируемые биохимически.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТКА ГЕРМИНАЛЬНЫХ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ APC

Ефимова И.Ю., Тимошкина Н.Н., Солдаткина Н.В., Геворкян Ю.А., Водолажский Д.И.

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия

Введение. Рак толстой кишки (РТК) относится к наиболее распространенным онкологическим заболеваниям. Для РТК характерны высокие темпы роста заболеваемости и смертности, сохраняющиеся на протяжении последних десятилетий [1]. В большинстве случаев рак толстой кишки носит спорадический характер. Генетические факторы оказываются значимыми в 15-30% случаев [2]. Одной из основных наследственных причин РТК является семейный аденоматозный полипоз (САП). Клинически САП проявляется возникновением сотен и тысяч полипов толстой кишки, некоторые из которых неминуемо трансформируются в злокачественную опухоль [3]. Без

лечения к 40 годам обычно развивается РТК [4]. САП – аутосомно-доминантный синдром, развивающийся вследствие герминальных мутаций в гене *APC*. Ген *APC* является геном-супрессором опухолевого роста и играет существенную роль в контроле клеточного цикла, межклеточной адгезии и регуляции клеточной миграции. Мутации, инактивирующие функции APC, индуцируют усиление клеточного роста и подавление клеточной адгезии, что вызывает появление и рост полипов. Как правило, мутация в гене *APC* наследуется, но в 30% случаев она возникает *de novo*, и человек становится родоначальником заболевания в семье.

Целью настоящего исследования стало определение спектра мутаций гена APC у пациентов, проживающих на юге России и проходивших диагностику и лечение на базе ФГБУ «РНИОИ».

Материалы и методы. В исследование вошли 9 пациентов с клинической картиной аденоматозного полипоза. Два пациента не имели семейного отягощенного анамнеза по САП. Для молекулярно-генетического анализа спектра мутаций в гене APC использовали ДНК, выделенную из лейкоцитов периферической крови с помощью фенол-хлороформной экстракции. Постановку реакции ПЦР-амплификации в присутствии праймеров оригинального дизайна проводили на программируемом термоциклере Maxy Gene Gradient (Axygen, USA). Прямое секвенирование по методу Сэнгера полученных ампликонов проводили с использованием генетического анализатора ABI Prism 3500 («Life Technologies», USA).

Результаты. Средний возраст постановки диагноза составил 31,3 года. Диагноз САП был подтвержден гистологически у всех пробандов.

В исследуемой группе больных было выявлено пять пациентов с герминальной мутацией в гене *APC*, что составило 56%. Обнаружены следующие мутации: три вида нонсенс-мутаций – 847C>T (p.Arg283Term), c.2362A>T (p.Lys788Term) и c.2365C>T (p.Gln789Term), мутация сайта сплайсинга – c.1744-2A>G, делеция – 1309del5 (c.3927_3931delAAAGA). Повторяющихся вариантов обнаружено не было. Отметим, что в других популяциях мутация 1309del5 (c.3927_3931delAAAGA) наиболее часто встречается у пациентов с диагнозом САП [5]. Проведено медико-генетическое консультирование родственников пациентов с установленным диагнозом САП, даны рекомендации. Молекулярно-генетическое исследование выполнили у семи кровных родственников пациентов с семейным аденоматозным полипозом. Наследственные мутации обнаружены у трёх обследованных лиц.

Заключение. Молекулярно-генетическое исследование наследственных форм колоректального рака необходимо для индивидуализации лечения. Также немаловажным аспектом является проведение ДНК-диагностики у всех кровных родственников пациента для выяснения оценок риска развития у них рака толстой кишки.

Список литературы

1. Mogoantă S.S., Vasile I., Totolici B. Colorectal cancer - clinical and morphological aspects. // Rom J MorpholEmbryol. – 2014. – T. 55, № 1. – P. 103-110. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. / GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. - 2014.

2. Lodewijk A.A. Brosens, G. Johan A. Offerhaus, Francis M. Giardiello. Hereditary Colorectal Cancer: Genetics and Screening // Surg Clin North Am. 2015. 95(5): 1067-80. doi: 10.1016.

3. Kastrinosand F., Syngal S. Inherited Colorectal Cancer Syndromes. Cancer J. – 2011. – 17 (6). – p. 405-415.

4. Шелыгин Ю.А., Кашников В.Н., Фролов С.А., Кузьминов А.М., Сачков И.Ю., Порхаева А.А., Завадский С.В., Шубин В.П., Поспехова Н.И., Цуканов А.С. Молекулярно-генетическое исследование наследственной предрасположенности к разным формам полипоза толстой кишки // Колопроктология, 2013 - Т.1 (43) – с. 9-15.

5. Музаффарова Т.А., Карпухин А.В. Особенности мутаций в гене APC// UNIVERSUM: Медицина и Фармакология, 2016 - №11 (33) – с. 4-10.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПАТОГЕННОСТИ ЗАМЕНЫ c.2956G>A (rs112287730) ГЕНА *FBN1* ПРИ СИНДРОМЕ МАРФАНА

Адян Т.А.[1], Миронович О.Л.[1], Семячкина А.Н.[2], Румянцева В.А.[3], Рогожина Ю.А.[3], Поляков А.В.[1]

[1] ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва, Россия

[2] ГБОУ «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» МЗ РФ, обособленное структурное подразделение – научно-исследовательский клинический институт педиатрии, Москва, Россия

[3] ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

Определение патогенности выявляемых вариантов нуклеотидной последовательности генов всегда являлось одной из важных задач молекулярной и медицинской генетики. В настоящее время это стало особенно актуально, когда количество найденных вариантов резко увеличилось благодаря достижениям в области секвенирования нового (следующего) поколения. Наиболее сложна эта задача для однонуклеотидных полиморфизмов (Single nucleotide polymorphism – SNP), приводящих к аминокислотным заменам, особенно для тех, аллельная частота которых весьма мала (<0,5%), что создает большие трудности при установлении их клинического значения.

В настоящей работе представлен случай определения клинического значения замены c.2956A>G (p.Ala986Thr) в гене *FBN1*, ранее выявленной у больных с синдромом Марфана (СМ). Замена c.2956G>A в экзоне 25 гена *FBN1* описана в базе SNP NCBI под номером rs112287730 с аллельной частотой 0,02%. По литератур-

ным данным имеются противоречивые сведения о клинической значимости указанного варианта нуклеотидной последовательности.

Среди российских больных с клиническим диагнозом СМ, обследованных на наличие мутаций в гене *FBN1*, замена c.2956G>A выявлена у четырех пробандов, трое из которых имели семейную историю заболевания. Проведен сегрегационный анализ в двух доступных для обследования семьях: в первом случае наблюдалась сегрегация замены с заболеванием в семье; однако во втором случае сегрегация отсутствовала – замена c.2956G>A обнаружена у клинически здорового отца пробанда и не выявлена ни у одного из обследованных больных членов семьи. Проведено исследование популяционной выборки из 110 неродственных необследованных жителей РФ: популяционная частота замены c.2956G>A составила 0,9% (обнаружено два гетерозиготных носителя), что статистически не отличается от аллельной частоты данной замены среди больных с СМ (1,5%).

С помощью биоинформатических ресурсов MutationTester, PolyPhen2, PROVEAN и SIFT проведена оценка патогенности анализируемой замены. По результатам ресурса PolyPhen2 замена оказалась возможно патогенной, по результатам MutationTester – патогенной. Однако по результатам прогноза ресурсов PROVEAN и SIFT она оказалась потенциально нейтральной. Согласно результатам множественного выравнивания, выполненного с помощью ресурса PolyPhen2, замена затрагивает не консервативную область белка фибриллина-1.

Таким образом, замена c.2956G>A в гене *FBN1* является полиморфизмом, не имеющим клинического значения (т.е. нормальным вариантом нуклеотидной последовательности), и не является причиной СМ.

Данная работа показывает, что, несмотря на существование множества методов определения патогенности, ни один из них не является универсальным. Оценка патогенности должна включать в себя изучение различных баз данных, медицинской литературы, использование биоинформатических ресурсов по определению патогенности, популяционные исследования и семейный анализ. Однако даже при совокупности всех методов не всегда удается однозначно определить патогенность выявленной замены. В таких случаях необходимо проводить их функциональный анализ.

ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПРИРОДЫ ФЕНИЛКЕТОНУРИИ В РЕСПУБЛИКАХ БАШКОРТОСТАН, СЕВЕРНОГО КАВКАЗА И КАЗАХСТАН

Ахметова В.Л.[1], Хусаинова Р.И.[1,2], Бермишева М.А.[1], Валиев Р.Р.[2], Кузнецов Д.Ю.[1,2], Хуснутдинова Э.К.[1,2]

[1] ФГБУН «Институт биохимии и генетики» Уфимского научного центра РАН, Россия
[2] ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет», Россия

Фенилкетонурия (ФКУ) – тяжелое распространенное аутосомно-рецессивное заболевание, обусловленное нарушением обмена незаменимой аминокислоты фенилаланина (ФА) вследствие дефицита фермента фенилаланингидроксилазы (ФАГ), вызванного мутациями в кодирующем его гене – *PAH*, локализованном в области 12q22-24.1 (Trunzo et al., 2013). Основным клиническим симптомом ФКУ является слабоумие, ведущее к тяжелой психической инвалидности без своевременно начатой диетотерапии. Частота ФКУ существенно варьирует в различных регионах и этнических группах, составляя в среднем 1 на 15000 новорожденных (Mitchell et al., 2011), в том числе в России – в среднем 1:6971 (Новиков, 2008), в Республике Казахстан – 1:16627 (Кирикбаева с соавт., 2015). Высокая частота ФКУ в популяциях и тяжесть ее клинических проявлений без своевременно начатого лечения диктуют необходимость определения генетической природы данной патологии в каждом конкретном регионе с определением мутаций и ДНК-гаплотипов полиморфных локусов гена *PAH*, что в комплексе повысит уровень медико-генетической консультации, позволит выявлять гетерозиготных носителей и осуществлять эффективную пренатальную диагностику ФКУ в пораженных семьях, в том числе и с неидентифицированными мутациями.

Целью данной работы являлось изучение молекулярно-генетических основ ФКУ и разработка эффективных подходов ее ДНК-диагностики в трех регионах Евразии.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи: 1) провести поиск мутаций в гене *PAH*, приводящих к ФКУ, и определить их спектр и частоту; 2) выполнить гаплотипический анализ полиморфных локусов *Bgl*II, *Pvu*II(a), STR, *Pvu*II(b), *Msp*I(a), *Xmn*I и VNTR гена *PAH* и оценить степень сцепления их аллелей и гаплотипов с мутациями; 3) разработать на основе полученных данных оптимальные схемы ДНК-диагностики ФКУ в изученных регионах.

Материалом для исследования послужили образцы ДНК 218 больных с клиническим диагнозом «фенилкетонурия» из трех регионов Евразии: Республики Башкортостан (РБ) (N=159), республик Северного Кавказа (РСК) (N=39), Республики Казахстан (РК) (N=20) и 387 членов их семей.

В работе были использованы стандартные молекулярно-генетические: выделение ДНК, различные модификации ПЦР, ПДРФ-, ACRS- и SSCP-анализа, секвенирование и статистические методы исследования.

Результаты проведенного исследования еще раз подтвердили разнообразие мутаций в гене *PAH*. На 94,57% мутантных хромосом выявлено 47 различных мутаций в 12 экзонах гена *PAH*: 28 миссенс-мутаций, 5 нонсенс-мутаций, 9 делеций и 5 мутаций сайта сплайсинга, из которых 4 ранее не описаны в базах данных (http://data.mch.mcgill.ca, http://www.hgmd.org) – c.116delT, p.Arg252Pro, p.His264Arg и c.1315+del4 у больных ФКУ из РБ. Для каждой республики был характерен свой спектр

мутаций гена *PAH*: в РБ и РК наиболее распространенной оказалась мутация p.Arg408Trp гена *PAH*, частота которой составила в среднем 44,95% с преобладанием в РБ (52,18%), у больных из РСК преобладала мутация p.Arg261X гена *PAH* (34,62%), обнаруженная только в этом регионе, тогда как мутация p.Arg408Trp гена *PAH* в данном регионе выявлена с частотой 12,83%. Другие мутации гена *PAH* определены с частотой от 8,94 до 0,23%. в среднем. Проведенный анализ показал, что 89,64% изученных ФКУ-семей в общей выборке оказались полностью информативными для ДНК-диагностики прямым методом, 9,91% – частично информативными, а 0,45% – абсолютно неинформативными.

В результате изучения полиморфных локусов *Bgl*II, *Pvu*II(a), STR, *Pvu*II(b), *Msp*I(a), *Xmn*I и VNTR гена *PAH* в семьях с ФКУ определены аллели и гаплотипы, неравновесно сцепленные с мутациями гена *PAH*, установлены достоверные различия в распределении частот аллелей и гаплотипов всех изученных локусов между нормальными и мутантными хромосомами ($p<0.05$), определена информативность изученных семей по данным локусам. Показано, что величина стандартного коэффициента неравновесия Δst, выражающего степень аллельной ассоциации, была достаточно высока для аллелей VNTR*380 и STR*240 (0.309 и 0.402 соответственно), тогда как для аллелей изученных диаллельных локусов она была ниже 0.250. Характер распределения частот гаплотипов BglII-PvuII(a)-STR-PvuII(b)-MspI(a)-XmnI-VNTR полиморфных локусов гена *PAH* в зависимости от региона оказался своеобразным, что подтвердилось и в статистически достоверных различиях как между мутантными и нормальными хромосомами, так и между ФКУ-хромосомами из разных выборок ($p<0.001$). Выявлено 53 гаплотипа на мутантных хромосомах и 126 – на нормальных. Степень гаплотипического разнообразия была выше на нормальных хромосомах по сравнению с мутантными ($h=0.982$ и 0.774 соответственно). Обнаружено, что основным гаплотипом по изученным полиморфным локусам, ассоциированным с мутациями гена *PAH,* оказался PvuII(a)-STR-PvuII(b)-MspI(a)-XmnI-VNTR*CC240TCA380 в общей выборке (Δst=0.516) и в РБ (Δst=0.584), в РК – *CC236TCA380 (Δst=0.466), в РСК - *CC240TCA500 (Δst=0.525). Кроме того, гаплотип *CC240TCA380 показал тесное сцепление с мутацией p.Arg408Trp, как в общей выборке (Δst=0.777), так и в РБ (Δst=0.803), гаплотип *CC240TCA500 – с мутацией p.Arg261X (Δst=0.827) у больных ФКУ из РСК, а гаплотипы *CC236TCA380 и CC240TCA380 – с мутацией p.Arg408Trp (Δst=0.535 и 0.447, соответственно) в РК. Показано, что общая информативность семей с ФКУ по выявленным мутациям и изученным полиморфным локусам гена *PAH* составляет 100%, что свидетельствует о целесообразности их использования в практике медико-генетического консультирования ФКУ.

Таким образом, получены данные о спектре и частоте мутаций в гене *PAH*, выявлены аллели и гаплотипы по локусам *Bgl*II, *Pvu*II(a), STR, *Pvu*II(b), *Msp*I(a), *Xmn*I и VNTR гена *PAH*, неравновесно сцепленные с мутациями гена *PAH*, определена высокая информативность изученных семей с ФКУ по исследованным полиморфным системам, подтверждающая целесообразность их использования для проведения косвенными методами пренатальной ДНК-диагностики и определения гетерозиготного носительства мутаций гена *PAH* в отягощенных семьях. На основе полученных данных разработаны схемы молекулярно-генетической диагностики ФКУ в изученных регионах.

Список литературы

1. Trunzo R., Santacroce R., D'Andrea G et al. Mutation analysis in hyperphenylalaninemia patients from South Italy //Clinical Biochemistry. 2013. V.46. P.1896–1898.

2. Mitchell J., Trakadis Y., Scriver C. Phenylalanine hydroxylase deficiency //Genet Med. 2011. V.13. P.697–707.

3. Новиков П.В. Наследственная патология в структуре болезней детского возраста и организация медико-генетической помощи детям в Российской Федерации //Медицинская генетика. 2008. Т.7. №12. С.3-7.

4. Кирикбаева М., Салимбаева Д., Святова Г. Неонатальный скрининг в Республике Казахстан: итоги 8 лет // Материалы VII Съезда Российского общества медицинских генетиков. Санкт-Петербург. Медицинская генетика. 2015. №4. С.12.

АНАЛИЗ ЧИСЛА КОПИЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДНК В ЛОКУСЕ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ТУГОУХОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТИПА DFNB1

Близнец Е.А.*, Канивец И.В., Поляков А.В.

Медико-генетический научный центр, Москва, Россия
**bliznetzelena@mail.ru*

Рецессивные мутации гена *GJB2*, а также протяженные делеции cis-регулирующего элемента данного гена являются главной причиной врожденного двустороннего несиндромального сенсоневрального нарушения слуха во многих странах, в том числе России. Протяженные делеции составляют 0,3-10% всех аллелей локуса тугоухости DFNB1 в разных популяциях, как правило, встречаются в компаунд-гетерозиготном состоянии с внутригенными мутациями или редко – в гомозиготном или компаунд-гетерозиготном состоянии с другой протяженной делецией. В литературе описаны шесть протяженных делеций, три из которых считаются частыми, del(*GJB6*-D13S1830), del(*GJB6*-D13S1854) и del(*GJB2*-D13S175), и три – обнаружены в единичных случаях. В данной работе выполнена оценка числа копий в области регуляторного элемента гена *GJB2* для выявления неописанных делеций у пациентов с одной рецессивной внутригенной мутацией в гетерозиготном состоянии. Дополнительно проведено количественное исследование последовательности генов *GJB2* и *GJB6* у гомозиготных носителей мутации в гене *GJB2*, для которых не исключено наличие гемизиготности по мутации.

Для выполнения указанных исследований разработана система для количественного анализа области регуляторного элемента гена *GJB2* на основе метода MLPA®, также использовался коммерческий набор реактивов для определения числа копий в генах *GJB2* и *GJB6* тем же методом. В результате проведенного анализа изменения числа копий в исследованных областях не обнаружены. Сравнительный анализ показал отсутствие различия частоты гетерозиготных носителей мутации среди пациентов с нарушением слуха и в контрольной выборке. Очевидно, среди российских пациентов если и есть мутации в еще не идентифицированных регуляторных или других регионах локуса DFNB1, то частота таких мутаций чрезвычайно низка.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ В ГЕНЕ *CYP17A1*, АССОЦИИРОВАННЫЙ С ОЧАГОВОЙ АЛОПЕЦИЕЙ (ALOPECIA AREATA)

Ундрицов В.М.[1], Ундрицов И.М.[2], Орлов Е.Н.[3]

[1] Международный трихологический центр, Москва, Россия
[2] НП «Институт эффективного долголетия», Москва, Россия
[3] Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН, Москва, Россия

Ген цитохрома Р-450с17а (*CYP17A1*) кодирует фермент Р-450с17а, который функционирует в ключевой точке разветвления путей биосинтеза стероидных гормонов.

По полиморфизму в промоторной области гена *CYP17A1* в положении минус 34 (-34) известны две аллели (А1 и А2) [1-3]. Различие между двумя аллелями заключается в наличии Т- (аллель А1) или С-нуклеотида (аллель А2) в положении -34 промоторной области. Замена Т на С в этом положении создает сайт расщепления рестриктазой MspA1I. Поэтому аллели (и генотип, соответственно) идентифицируются с использованием RLFP-PCR подхода.

С другой стороны, наличие нуклеотида С в положении -34 приводит к появлению дополнительного сайта узнавания для фактора транскрипции Sp-1 [3], что приводит к повышению уровня экспрессии аллели А2 по сравнению с аллелью А1. Следствием этого является повышение уровня андрогенов в системной циркуляции у людей с генотипами А2/А2 и А1/А2.

Очаговая алопеция (alopecia areata) – заболевание, проявляющееся в частичной (очагами) или полной потере волос всего тела (универсальная алопеция – alopecia areata universalis). Данное заболевание поражает людей независимо от пола и возраста. Хотя генетическая предрасположенность и полигенная природа данного заболевания была очевидна клиницистам, до сих пор не был найден ни один генетический маркер, ассоциированный с очаговой алопецией.

Нами было проведено генотипирование пациентов с очаговой алопецией по данному полиморфизму.

Исследовано 47 пациентов и 61 здоровый человек в качестве контроля.

Среди больных с очаговой алопецией не оказалось ни одного человека с генотипом А1/А1. Все больные были носителями аллели А2 в гомо- или гетерозиготном варианте.

Таким образом, нами выявлен пока единственный на сегодняшний день генетический полиморфизм, ассоциированный с очаговой алопецией – аллель А2 гена *CYP17A1*.

Литература

1. Hamajima N., Takezaki T., Tajima K. Allele Frequencies of 25 Polymorphisms Pertaining to Cancer Risk for Japanese, Koreans and Chinese.

Asian Pac J Cancer Prev. 2002;3(3):197-206.

2. Duell E.J., Holly E.A., Kelsey K.T., Bracci P.M. Genetic variation in CYP17A1 and pancreatic cancer in a population-based case-control study in the San Francisco Bay Area, California.

Int J Cancer. 2010 Feb 1;126(3):790-5. doi: 10.1002/ijc.24792.

3. Kulik-Rechberger B., Skorupski P., Bogusiewicz M., Miotła P., Rechberger T. Polimorfizm genu CYP17 a wiek menarche. Ginekologia Polska. 2007;78(12):929-32.

ДИАГНОСТИКА ХОРЕИ ГЕНТИНГТОНА МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Кривенцова Н.В.[1], Шокарев Р.А.[1], Фомина-Чертоусова Н.А.[2], Кривенцова А.А.[1]

[1] ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский институт акушерства и педиатрии», Ростов-на-Дону, Россия
[2] ФГБУ «Ростовский государственный медицинский университет», Ростов-на-Дону, Россия

Введение. С 2001 года в лаборатории медицинской генетики РНИИАП осуществляется молекулярно-генетическая диагностика частых наследственных заболеваний, таких как: муковисцидоз, спинальная мышечная атрофия, миодистрофия Дюшенна – Беккера, нейросенсорная тугоухость, болезнь Шарко – Мари – Тутта, хорея Гентингтона. С 2010 года пренатальная инвазивная диагностика частых анеуплоидий осуществляется с использованием количественной флуоресцентной полимеразной цепной реакции и капиллярного электрофореза на ДНК-анализаторе ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems). Использование капиллярного электрофореза для фрагментного анализа открывает новые возможности для точного определения длин фрагментов, полученных при ПЦР, и более точной диагностики при таких заболеваниях, как хорея Гентингтона (HD).

Хорея Гентингтона – наследственное заболевание нервной системы, характеризующееся постепенным на-

чалом обычно в возрасте 30–50 лет и сочетанием прогрессирующего хореического гиперкинеза и психических расстройств. Нарушение, приводящее к развитию HD, заключается в увеличении числа (экспансии) тринуклеотидных CAG-повторов в гене IT-15. Открытие гена HD и обнаружение ассоциации длины CAG-повторов с риском развития заболевания сделали возможным молекулярно-генетическое тестирование данного заболевания. Точное определение числа CAG-повторов в гене HD является технически сложным и трудным для интерпретации, особенно если они находятся в так называемой серой зоне (между 27 и 39 повторами). Также при обнаружении гомозиготной аллели нормальной длины необходимо исключить вероятность того, что увеличенная аллель не была идентифицирована с помощью ПЦР. Решением этой проблемы является использование праймеров, один из которых флуоресцентно-мечен и содержит пять CAG-повторов. При использовании такого праймера в результате ПЦР получаются разного размера ампликоны из-за множественных сайтов отжига.

Целью настоящего исследования явилась оценка возможности определения истинной гомозиготы по отсутствию повторяющихся пиков и возможности использования повторяющихся пиков в качестве аллельной лестницы для точного определения количества CAG-повторов.

Материалы и методы. Исследуемую группу составили 50 пациентов с ранее проведенной молекулярно-генетической диагностикой методом ПЦР и визуализацией результатов в акриламидном геле в лаборатории медицинской генетики ФГБУ «Ростовский НИИ акушерства и педиатрии» с 2002 по 2016 г. В качестве биологического материала для исследования использовалась геномная ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови. Во всех образцах проводили амплификацию участка гена IT15 с использованием пары праймеров (Синтол, Москва), один из которых флуоресцентно-мечен (FAM), а другой содержал 5 CAG-повторов. Продукты ПЦР разделяли с помощью капиллярного электрофореза на ДНК-анализаторе ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems). В качестве размерного стандарта использовали S-550 (ГОРДИС, Россия).

Результаты. Во всех электрофорезах присутствовали повторяющиеся пики с разницей в 3 п.н., что дает возможность использовать их в качестве аллельной лестницы для точного определения количества CAG-повторов. Первый пик наблюдался в районе 58 п.н., что соответствовало 6 CAG-повторам. Гомозигота определялась по наличию одного пика и отсутствию после него повторяющихся пиков. Было уточнено количество CAG-повторов во всех образцах (разница составила до трех повторов). В 5 случаях была подтверждена нормальная гомозигота. В одном случае было установлено 15 и 19 повторов, когда с помощью акриламидного геля была определена гомозигота. Количество патологичных CAG-повторов изменялось от 34 до 61. Таким образом, использование данного метода повышает точность диагностики хореи Гентингтона.

РАЗРАБОТКА И ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ПАНЕЛИ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПРЕКОНЦЕПЦИОННОГО ГЕНЕТИЧЕСКОГО СКРИНИНГА

Широкова Н.А., Жикривецкая С.О., Биканов Р.А., Ветрова Н.В., Померанцева Е.А.

ООО «ЦГРМ «ГЕНЕТИКО», Москва, Россия

Скрининг носительства моногенных генетических заболеваний в семьях высокого риска является рутинной практикой врачей-генетиков. Для людей с неотягощенным анамнезом обычно рекомендуют исследование частых мутаций в генах 4 аутосомно-рецессивных заболеваний – фенилкетонурии, муковисцидоза, нейросенсорной тугоухости и спинальной мышечной атрофии. Основанием для исследования этих заболеваний послужила высокая распространенность, а также частота гетерозиготного носительства на территории Российской Федерации, подтвержденная большим количеством популяционных исследований и данными неонатального скрининга [1, 2, 3]. Однако развитие вспомогательных репродуктивных технологий, использование донорских гамет и просто озабоченность потенциальных родителей здоровьем будущего ребенка выдвигают задачи разработки скрининговых тестов, выявляющих носителей на как можно большее количество моногенных заболеваний. Для этой цели была разработана диагностическая панель, которая позволяет анализировать 39 мутаций, ассоциированных с развитием более 20 тяжелых и/или несовместимых с жизнью наследственных патологий.

В задачи исследования входило отобрать наиболее частые мутации в генах тяжелых моногенных заболеваний, характерных для европейской и российской популяций. Валидировать диагностическую панель на образцах синтетической и контрольной ДНК с известным генотипом и провести исследование информативности предложенной диагностической панели в выборке людей без моногенной патологии.

На носительство мутаций было проанализировано 465 образцов ДНК (398 от клиентов клиник ЭКО, 58 от доноров спермы и 9 от здоровых добровольцев), из них 65,6% образцов от женщин. У обследованных в анамнезе не отмечалось наличие какой-либо наследственной патологии. ДНК была амплифицирована с использованием TaqMan проб в микрофлюидных планшетах. Детекция продуктов ПЦР проводилась по конечной точке.

Критериями включения мутаций в набор являлись достоверная высокая патогенность мутации и частота встречаемости в европейской и российской популяции. Изначально в панель входило 48 мутаций. На этапе валидации использовались образцы контрольной ДНК и смеси синтетической ДНК, имитирующие дикий тип, гетерозиготу и мутацию по всем точкам, входящим в панель. Мутации, для которых показатели специфичности, чувствительности и точности составили менее 98%, были удалены из панели. Также из панели были удалены мутации в генах c.7093G>A (ABCA12), c.2492A>G (POLG), c.976G>A (ACAD9) в связи с пересмотром клинического

статуса. В ходе исследования мутации были обнаружены у 25 человек, из них у 1 установлены мутации в 2 генах. Были выявлены c.1521_1523delCTT, c.1545_1546delTA (CFTR), c.3207C>A (ATP7B), c.452G>A (DHCR7), c.1903C>T (LAMB3), c.657_661delACAAA (NBN), c.1062+5G>A (FAH), c.206C>T (IDUA), c.422G>A (PMM2), c.563A>G (GALT), c.1423C>T (ADAMTS13). Общая частота встречаемости мутаций в выборке совпадала с частотами баз данных NCBI и ExAc, достоверные различия могут объясняться небольшим размером выборки. В результате скрининга был выявлен пациент с болезнью Вильсона – Коновалова, которому на момент прохождения анализа диагноз не был установлен.

Спектр и частота выявленных мутаций

Ген	Rs	Мутация (НТ)	Частота мутации (ExAC, NCBI)	n, гет	n, гом	Частота
CFTR	rs113993960	c.1521_1523delCTT	0,0061	3	0	0,003
CFTR	rs121908776	c.1545_1546delTA		1		0,001
ATP7B	rs76151636	c.3207C>A	0,0016	4	1	0,006
DHCR7	rs11555217	c.452G>A	0,0010	5	0	0,005
NBN	rs587776650	c.657_661delACAAA	0,0056	2	0	0,002
LAMB3	rs80356682	c.1903C>T	0,0013	2	0	0,002
IDUA	rs121965020	c.208C>T	0,0008	2	0	0,002
PMM2	rs28936415	c.422G>A	0,01	2	0	0,002
GALT	rs75391579	c.563A>G	0,002	1	0	0,001
ADAMTS13	rs11575933	c.1423C>T	0,002	1	0	0,001
FAH	rs80338901	c.1062+5G>A	0,0010	2	0	0,0027

Гет – гетерозиготы, гом – гомозиготы

Таким образом, исключив случай диагностированного наследственного заболевания, можно говорить о том, что носительство хотя бы одной патологической мутации выявлено у 5,2% обследуемых. Это несколько меньше ожидаемой вероятности 5,9%, рассчитанной из данных по частотам мутаций. Предложенная панель может быть использована для скрининга носительства тяжелых наследственных заболеваний и рекомендована будущим родителям и донорам в программах ВРТ. Корректная интерпретация, конкретные рекомендации и оценка репродуктивных рисков, индивидуальных и семейных, приведет к увеличению вероятности рождения здорового ребенка.

Список литературы

1. Гинтер Е.К., Зинченко Р.А. Наследственные болезни в российских популяциях // Вестник ВОГиС, 2006. Т.10. №1. С.106-125.

2. Капранов Н.И. Муковисцидоз – современное состояние проблемы // Пульмонология 2006. Приложение по муковисцидозу. С.5-11.

3. Матулевич С.А. Массовый скрининг новорожденных на наследственные болезни обмена как часть системы медико-генетической помощи населению: Автореф. дис. д-ра мед.наук – М., 2009. 211 с.

РЕЗУЛЬТАТЫ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ ДЮШЕННА/БЕККЕРА В УЗБЕКИСТАНЕ

Омонова У.Т.[1], Каримов Х.Я.[2], Маджидова Е.Н.[1], Бобоев К.Т.[2], Шамсиддинова М.А.[3]

[1] Кафедра неврологии, детской неврологии и медицинской генетики Ташкентского педиатрического медицинского института
[2] НИИ гематологии и переливания крови МЗ РУз
[3] Республиканский центр скрининга матери и ребенка

Введение. В группу дистрофинопатий включены прогрессирующие мышечные дистрофии Дюшенна и Беккера (МДД/Б), которые представляют собой аллельные варианты, обусловленные различными мутациями в гене белка дистрофина. Приблизительно 55-65% всех случаев МДД/Б обусловлены делециями гена дистрофина различной протяжённости, 5-10% случаев – дупликациями части гена, у остальных имеют место точковые мутации. В настоящее время накоплены обширные данные в отношении делеционных спектров в гене дистрофина в различных популяциях мира, установлены определенные популяционные различия. До настоящего времени молекулярно-генетическое исследование МДД/Б в Республике Узбекистан не проводилось, поэтому для разработки подходов пренатальной, дифференциальной, пресимптоматической диагностики и определения носительства мутантного гена актуальным является изучение молекулярно-генетической природы МДД/Б в Узбекистане.

Цель исследования. Изучение генетического полиморфизма гена дистрофина среди больных с мышечной дистрофией Дюшенна/Беккера и определение частоты носительства мутации гена дистрофина у родственниц в семьях больных с МДД/Б в популяции Узбекистана.

Материалы и методы. Молекулярно-генетические исследования проводились по двум направлениям: мультиплексная ПЦР-диагностика для выявления мажорных делеций у больных с МДД/Б и проведение косвенной ДНК-диагностики для определения носительства мутантного гена дистрофина у родственниц больного с МДД/Б. Геномную ДНК из образцов периферической крови (Vacutainer Becton Dickinson International с ЭДТА) выделяли с использованием набора для выделения ДНК DIAtom™ DNA Prep100 ООО «Центр молекулярной генетики» (Москва) в соответствии с инструкцией. Амплификацию проводили с помощью термоциклеров GeneAmp PCR-system 2720 (Applied Biosystems, США) с использованием наборов DMD-del и DMD-CA (ООО «Центр молекулярной генетики», Москва).

Прямая ДНК-диагностика проведена 91 пациенту с МДД/Б из 81 семьи: 84 (92,3%) пациентам с мышечной дистрофией Дюшенна, 7 (8,6%) пациентам – с мышечной дистрофией Беккера. Анализ проводился по 20 экзонам гена дистрофина – промоторная область, 3, 4, 6, 8, 13, 17, 19, 32, 42, 43, 44, 45, 47, 48, 50, 51, 52, 53, 60 экзоны. Косвенная диагностика проведена в 21 семье, отягощённой МДД/Б, с применением внутригенных высокополиморфных маркеров, расположенных в 45-м (STR-45), 49-м (STR-49), 50-м (STR-50) интронах гена.

Основные результаты и обсуждения. По результатам молекулярной диагностики у 33 пациентов (36,3%) из 32 семей (39,5%) делеции не обнаружены, а у 58 пациентов (63,7%) из 49 семей (60,5%) были выявлены мажорные делеции гена дистрофина различной длины – от одного до девяти экзонов: в 65,3% семей верифицировались протяжённые делеции, делеции одного экзона встречались в 34,7% семей. Основной делеционный спектр располагался в дистальной части гена дистрофина – 3′-конце (делеции 40-60 экзонов), что составило 81,6% (40 семей, 47 пациентов).

Проксимальные делеции гена дистрофина в 5′-конце (делеции 3-19 экзонов) встречались чаще при семейных формах болезни МДД/Б, а при спорадических случаях болезни чаще выявлялись делеции в дистальной части гена дистрофина – 3′-конце (делеция 40-60 экзонов).

При дистальных мутациях чаще встречались делеции следующих экзонов: 50 экзон – в 24 случаях, 51 экзон – в 24 случаях, 52 экзон – в 21 случае, 48 экзон – в 16 случаях, 53 экзон – в 14 случаях; делеций промоторной зоны, 32, 42 и 60 экзона не было выявлено.

При проксимальных мутациях чаще встречались делеции 19 (в 8 случаях) и 17 (в 6 случаях) экзонов.

Косвенная диагностика проведена в 21 семье, отягощённой прогрессирующей мышечной дистрофией Дюшенна/Беккера, с применением внутригенных высокополиморфных маркеров, расположенных в 45-м (STR-45), 49-м (STR-49), 50-м (STR-50) интронах гена. Из 21 семьи в 33,3% (7 семей) при проведении прямой ДНК-диагностики «мажорные» делеции в гене дистрофина не были выявлены, в 14,3% (3 семьи) – были выявлены делеции в 5′-конце, в 52,4% (11 семей) – были выявлены делеции в 3′-конце. Из обследованных семей 8 (38,1%) не были информативны по STR-45, STR-49, STR-50; в 13 (61,9%) семьях у родственниц пробанда с МДД/Б был подтверждён статус носительства мутации гена дистрофина.

На базе Республиканского центра скрининга матери и ребёнка внедрён метод пренатальной инвазивной диагностики МДД/Б. Было обследовано 6 семей высокого риска по данной патологии. Из них в 5 случаях проведен кордоцентез и в 1 случае амниоцентез.

По результатам ДНК-диагностики выявлено 3 плода мужского пола с идентифицированными делециями в гене дистрофина и рекомендовано прерывание беременности по медико-генетическим показаниям. В остальных семьях беременность была пролонгирована и впоследствии было проведено постанальное обследование рождённых детей с целью подтверждения отсутствия поражения в гене дистрофина.

Выводы

1. По данным мультиплексной ПЦР пациентов с мышечной дистрофией Дюшенна выявлены мутации в 16 экзонах из 20 исследованных, что даёт основание для использования набора DMD-del для прямой ПЦР-диагностики «мажорных» делеций в гене дистрофина в популяции Узбекистана.

2. По результатам косвенной ДНК-диагностики в семьях высокого риска в популяции Узбекистана наиболее информативными являются внутригенные высокополиморфные маркеры STR-45 и STR-49.

РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ СКРИНИНГА ГАЛАКТОЗЕМИИ У НОВОРОЖДЕННЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ МЕТОДОМ В СУХИХ ПЯТНАХ КРОВИ «ГАЛАКТОЗА-НЕОСКРИН»

Помелова В.Г., Быченкова Т.А., Осин Н.С.

ФГУП «Государственный НИИ биологического приборостроения» ФМБА РФ, Москва, Россия
ЗАО «ИММУНОСКРИН», Москва, Россия

Введение. Галактоземия – наследственное моногенное заболевание, обусловленное снижением или отсутствием активности одного из ферментов, участвующих в метаболизме галактозы, которая наряду с глюкозой образуется в кишечнике при гидролизе лактозы. Это приводит к повышению концентрации галактозы и ее метаболитов в крови до токсического уровня, что оказывает повреждающее воздействие на печень, почки, центральную нервную систему, обусловливает снижение бактерицидной активности лейкоцитов может приводить к развитию катаракты. Частота галактоземии (классический тип) в популяции составляет примерно 1 случай на

60000 новорожденных (от 1:18000 до 1:187000; в странах Европы – в среднем 1:40000). Без лечения смертность детей грудного возраста составляет около 75%. Выявление новорожденных с галактоземией осуществляется в соответствии с приказом Минздрава Российской Федерации № 185 от 22 марта 2006 г. «О массовом обследовании новорожденных детей на наследственные заболевания» в рамках национального проекта «Здоровье». На начальном этапе неонатального скрининга на галактоземию определяют уровень общей галактозы в сухом пятне крови новорожденного. Концентрация галактозы, превышающая пороговое значение, указывает на патологию, требующую дополнительного лабораторного исследования. Для измерения уровня общей галактозы используют исключительно зарубежные наборы реагентов. Это обусловливает актуальность разработки их отечественных аналогов с целью экономии бюджетных средств в рамках импортозамещения.

Цель и задачи. Цель работы состояла в создании отечественного набора реагентов для количественного определения уровня общей галактозы (галактозы и галактоза-1-фосфата) в сухом пятне крови новорожденного. Задачи исследования включали оценку технических и эксплуатационных характеристик разработанного медицинского изделия, возможность его применения для анализа реальных клинических образцов, а также сравнение по этим параметрам с зарубежным набором реагентов.

Материалы и методы. Разработанный набор включает все необходимые для проведения анализа реагенты (калибровочные и контрольные пробы, цинк-сульфатный и стоп-реагенты, буфер-восстановитель, галактозо-оксидазный реагент, флуорогенный субстрат, планшеты). Калибровочные и контрольные пробы приготовлены на основе эритроцитарной массы крови человека с гематокритом 50-55% на фильтровальной бумаге №903 Whatman. Калибровочные пробы содержат галактозу; контрольные пробы – галактозу и галактоза-1-фосфат. Выпуск набора предполагается в двух комплектациях: на 192 определения и на 960 определений. Принцип работы основан на образовании флуоресцирующего продукта под воздействием фермента галактозооксидазы. В ходе анализа измеряется общий уровень галактозы и галактоза-1-фосфата. Регистрация сигнала осуществляется на флуориметре с временным разрешением в режиме флуоресценции при длине волны возбуждения 315-340 нм и регистрации на длине волны 405 нм. Интенсивность сигнала прямо пропорциональна общему количеству галактозы в образце. В качестве референтной методики использован набор Neonatal Total Galactose производства «Валлак Ой», Финляндия. Клинические исследования выполнены в лабораторных условиях с применением 810 образцов биоматериала пациентов, взятых в ходе лечебно-диагностического процесса.

Основные результаты. Основные технические и эксплуатационные характеристики (динамический диапазон измерений, чувствительность, длительность анализа и т.п.) разработанного набора реагентов «ГАЛАКТОЗА-НЕОСКРИН» и референтной методики были сопоставимы. Возможность его применения для анализа клинических образцов оценивали в лабораторных условиях с применением 810 образцов биологического материала (сухих пятен крови), в том числе 252 образцов с известным содержанием галактозы (приготовлены на основе эритроцитарной массы человека с добавлением галактозы до определенной конечной концентрации); 514 образцов от новорожденных, полученных при проведении первичного скрининга; 44 образцов от новорожденных с подозрением на врожденную галактоземию, имевших повышенный уровень галактозы при первичном скрининге (получены при повторном заборе крови от этих детей через 2-3 недели после первого скринингового образца). Биологический материал от новорожденных был получен в ходе проведения процедуры массового (безвыборочного) скрининга новорожденных на галактоземию, предусматривающего повторное исследование (ретестирование) образцов от новорожденных, у которых при первичном скрининговом обследовании был выявлен повышенный уровень галактозы (≥ 390 мкмоль/л). Всего было выполнено 2474 лабораторных теста.

Воспроизводимость результатов измерений концентрации галактозы (в диапазоне концентраций от 255 до 2035 мкмоль/л) составила от 6,8 до 13,5% или от 5,6 до 11,7% при постановке анализа тремя операторами или одним и тем же оператором соответственно. В целом значение этого показателя не превышало 15%, что соответствует требованиям ГОСТ к методам исследования сухих пятен крови.

Продемонстрирована равная эффективность двух методик постановки анализа, которые в настоящее время используются в медико-генетических центрах: с извлечением дисков из реакционной смеси с помощью иголки (методика 1) и с переносом реакционной смеси из V-образного планшета, в котором проходит инкубация на первом этапе анализа, в другой планшет, в котором осуществляются последующие этапы анализа (методика 2). Степень корреляции (r) между результатами анализа образцов новорожденных составила 0.984639, 0.874201 или 0.958317 соответственно, при использовании методики 1 и методики 2 (n=56), методики 1 и референтного набора (n=308), методики 2 и референтного набора (n=224).

Выявленные при первичном скрининге положительные результаты (n=44) были подтверждены при повторном исследовании (ретесте) у 40 (90,9%) новорожденных. Из этого числа лишь у 5 детей был подтвержден диагноз «галактоземия» при последующем клиническом наблюдении (с привлечением дополнительных генетических тестов). Уровни общей галактозы у этих детей, измеренные референтным набором и испытуемым набором (с использованием обеих методик), четко коррелировали между собой, существенно превышая cut off.

Заключение/выводы. Разработанное медицинское изделие – набор реагентов «ГАЛАКТОЗА-НЕОСКРИН» – соответствует по своим техническим, эксплуатационным характеристикам и клинической эффективности зарубежному аналогу и может быть рекомендовано для количественного определения концентрации общей галактозы в образцах крови, высушенной на фильтровальной бумаге, при проведении скрининга новорожденных на галактоземию. В настоящее время набор находится на стадии государственной регистрации.

АНАЛИЗ ЧАСТОТЫ И СПЕКТРА МУТАЦИЙ ГЕНА *GJB2* У БОЛЬНЫХ НАСЛЕДСТВЕННОЙ НЕСИНДРОМАЛЬНОЙ НЕЙРОСЕНСОРНОЙ ТУГОУХОСТЬЮ В КАРАЧАЕВО-ЧЕРКЕССКОЙ РЕСПУБЛИКЕ

Петрина Н.Е.[1], Макаов А.Х.-М.[2], Зинченко Р.А.[1,3], Близнец Е.А.[1], Поляков А.В.[1], Петрова Н.В.[1], Васильева Т.А.[1], Чудакова Л.В.[1], Петрин А.Н.[4], Гинтер Е.К.[1]

[1] Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр»
[2] Муниципальное бюджетное лечебно-профилактическое учреждение «Хабезская центральная районная больница», Хабез Карачаево-Черкесской Республики
[3] Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации
[4] Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Несиндромальная нейросенсорная тугоухость (ННТ; OMIM#220290) – заболевание, при котором происходит снижение слуха из-за поражения органов внутреннего уха, слухового нерва или центра в головном мозге, который отвечает за восприятие звука. По данным литературы, частота врожденной тугоухости и глухоты составляет 1 на 1000 новорожденных, из которых более 50% относятся к наследственным нарушениям слуха. Около 75% всех случаев ННТ имеют аутосомно-рецессивный (АР) тип наследования. Наиболее частой причиной АР ННТ в европейских популяциях и в России являются мутации гена коннексина 26 (*GJB2*; 13q12.11).

Целью исследования явилось определение спектра мутаций в кодирующем экзоне гена *GJB2* у пациентов с ННТ, проживающих в г. Черкесске и восьми районах Карачаево-Черкесской Республики (Усть-Джегутинском, Карачаевском, Малокарачаевском, Абазинском, Прикубанском, Хабезском, Адыге-Хабльском и Ногайском).

Все пациенты обследованы сурдологом, имели прелингвальную нейросенсорную тугоухость 3-4-й степени либо полную глухоту. В анамнезе пациентов отсутствовали возможные внешнесредовые факторы риска развития тугоухости. Пациенты осмотрены врачом генетиком с целью исключения синдромальных форм нейросенсорной тугоухости.

ННТ выявлена в 156 семьях (205 больных). Распространенность заболевания составила 6,45±0,45/10000 (1:1551 человека). Подтверждающая ДНК-диагностика проведена 132 пациентам (28 семей и 63 спорадических случая). Исследование выполнено в несколько последовательных этапов. На первом этапе осуществлен поиск частой мутации c.35delG гена *GJB2* методом ПЦР. Второй этап – поиск частой мутации сайта сплайсинга в интроне 1 c.-23+1G>A(IVS1+1G>A) методом ПДРФ-анализа. После двух этапов поиска мутаций оставались 97 пациентов без изменений в гене *GJB2* или с мутацией только в одной *GJB2*-аллели. Этим больным было проведено секвенирование по Сэнгеру кодирующего экзона гена *GJB2* (третий этап исследования). На четвертом этапе выполняли поиск частой протяженной делеции 309 kb(*delGJB6_D13S1830*) у пациентов с мутацией в одной *GJB2*-аллели (делеции ни у кого не обнаружено). Сравнение популяционных частот мутации c.35delG проводили, используя точный критерий Фишера.

Частота мутации c.35delG составила 28,79% (34 гомозиготы, 8 гетерозигот). У русских пациентов частота мутации c.35delG составила 44,55% (49/110), у карачаевцев 6,94% (5/72), у черкесов 38,89% (7/18), у абазин 18,75% (3/16). Таким образом, мутация c.35delG в гене *GJB2* характерна для русского населения региона и реже выявляется у титульной нации республики – карачаевцев, что необходимо учитывать при проведении ДНК-анализа пациентам с ННТ и медико-генетическом консультировании.

В результате проведенного исследования в выборке пациентов с тугоухостью было выявлено 13 изменений в гене *GJB2*. Выявленные изменения можно разделить на три группы: 8 патологических мутаций (c.35delG, c.313_326del14, c.235delC, c.358_360delGAG, c.269T>C, c.-23+1G>A, c.101T>C, c.224A>G), 4 нейтральные полиморфные замены, не имеющие клинического значения (c.79G>A, c.341A>G, c.457G>A) и 1 замена с неизвестной патогенностью (c.196G>A). У 89 пациентов с ННТ 14 национальностей мутации в гене *GJB2* не выявлены либо есть изменение только в одной аллели.

Особенностью спектра мутаций, выявленных у черкесских пациентов с ННТ, оказалось наличие четырех патогенных мутаций (c.35delG, c.358_360 delGAG, c.101T>C, c.-23+1G>A) в гене *GJB2*. У карачаевцев определены только две патогенные мутации гена *GJB2* – c.35delG и c.358_360 delGAG. У абазин – c.35delG и c.235delC. У русских, живущих в КЧР, выявлены патогенные изменения – c.35delG, c.-23+1G>A, c.313_326del14, c.269T>C.

Оценены популяционные частоты мутации c.35delG в гене *GJB2* среди 507 (1014 хромосом) здоровых индивидов трех этнических групп КЧР: карачаевцы (N=370 человек/740 хромосом), русские (N=35/70), черкесы (N=102/204).

В результате проведенного скрининга здоровых индивидов в выборке русских выявлен один носитель (1/70 хромосом) мутации c.35delG в гене *GJB2*. Частота мутации c.35delG у русского населения КЧР составила 1,43% (гетерозиготное носительство 1:35), что соответствует литературным данным и результатам генетико-эпидемиологических исследований лаборатории генетической эпидемиологии ФГБНУ «МГНЦ».

В выборке карачаевцев выявлен один гетерозиготный носитель мутации c.35delG, популяционная частота

мутации c.35delG среди карачаевцев оказалась низкой 0,135% (гетерозиготное носительство 1:370). Популяционная частота мутации c.35delG среди карачаевцев схожа по своим значениям с другими тюркоязычными народами России: башкирами, чувашами, якутами.

Частота мутации c.35delG у здоровых черкесов составила 0,98% – выявлено два носителя мутации (гетерозиготное носительство 1:51). Выявленные значения частоты (0,98%) мутации оказались по своим значениям схожи с таковыми у русского населения, что предполагает более тесное взаимодействие черкесов с русскими, и в меньшей степени с карачаевцами в процессе этногенеза.

При сравнении частот мутации c.35delG между проанализированными популяционными выборками не выявлено статистически значимых различий (p>0,05; P=88,46; P=88,00; P=16,25), что обусловлено, скорее всего, малочисленностью выборок.

Несиндромальная аутосомно-рецессивная глухота – наиболее частая форма наследственной тугоухости и глухоты, характеризующаяся клиническим полиморфизмом и генетической гетерогенностью. В мире уже известно свыше 70 генных локусов, ассоциированных с ННТ, среди которых преобладают формы с АР типом наследования. Учитывая, что в нашем исследовании у 89 пациентов с ННТ мутации в гене *GJB2* не были выявлены либо есть изменение только в одной аллели, целесообразен расширенный поиск мутаций и в других генах, вызывающих ННТ.

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов № 15-04-01859, 17-04-00288, РНФ 17-15-01051.

АНАЛИЗ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ *SOD1* У ПАЦИЕНТОВ С КЕРАТОКОНУСОМ

Титоян К.Х.[4], Хасанова Р.Р.[1], Лобов С.Л.[2], Джемилева Л.У.[2,3], Усубов Э.Л.[4], Бикбов М.М.[4], Хуснутдинова Э.К.[1,2]

[1] ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет», Уфа, Россия
[2] ФГБУН «Институт биохимии и генетики» УНЦ РАН, Уфа, Россия
[3] ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет», Уфа, Россия
[4] ГБУ «Уфимский НИИ глазных болезней» АН РБ, Уфа, Россия

Введение. Кератоконус – невоспалительное дегенеративное заболевание роговицы, характеризующееся прогрессирующим истончением и изменением ее формы. Он носит двусторонний характер и приводит к значительному снижению зрения, манифестируя во второй и третьей декадах жизни [1-4]. Высокая социальная значимость данной группы заболеваний обусловлена прогрессирующим течением и ранней инвалидизацией пациентов. Данные о частоте встречаемости кератоконуса значительно варьируют – от 0,3 на 100000 населения в России до 2300 на 100000 в Центральной Индии (0,0003%-2,3%). Наследственные формы кератоконуса, по данным разных авторов, встречаются в 6,0-21,7% случаев [5-6]. Многими учеными показана роль оксидативного стресса в развитии кератоконуса [7]. Роговица подвержена воздействию света различного спектра, в том числе ультрафиолетового. Ультрафиолетовое излучение является пусковым фактором в развитии оксидативного стресса, под действием которого высвобождаются свободные радикалы. Однако в здоровой роговице присутствует ряд ферментов с антиоксидативной активностью, в частности супероксиддисмутаза, глутатион-редуктаза, глутатион-пероксидаза, предотвращающих свободнорадикальное разрушение мембраны и митохондрий кератоцитов. Ген *SOD1,* включающий 5 экзонов, кодирует большую группу антиоксидантных ферментов. Эти антиоксиданты в условиях нормального обмена поддерживают стационарную концентрацию супероксидных радикалов на определенном уровне, защищая тем самым клеточные структуры от повреждающего действия как самих радикалов кислорода, так и от появления гидроксильных радикалов, которые могут образовываться из кислорода и гидроксида [8]. Описаны свыше 50 мутаций, распределенных по всем экзонам гена *SOD1* (они в основном представлены точковыми мутациями, реже – вставками и делециями) [9, 10], ассоциированных с развитием бокового амиотрофического склероза. Некоторые из мутаций описаны лишь в отдельных семьях, другие являются мажорными в определенных популяциях. Поэтому изучение этиопатогенеза и особенностей клинических проявлений кератоконуса является одной из наиболее актуальных проблем офтальмологии.

Цель и задачи. Целью данного исследования явился анализ мутаций в гене *SOD1* у пациентов со спорадической и наследственными формами кератоконуса в Республике Башкортостан.

Материалы и методы. Исследовано 66 семей (66 больных КК и 115 их родственников, различной этнической принадлежности, проживающих в Республике Башкортостан. Контрольную выборку составили 48 здоровых индивидов, прошедших полное офтальмологическое обследование. По этническому составу контрольная группа соответствует группе больных с КК. Диагноз КК выставлялся на основании комплекса обследований, включающего визометрию, биомикроскопию, рефрактометрию, кератотопографию (OPD-scan, Nidek, Япония), пахиметрию (Visante, Carle Zeiss, Германия), проекционную сканирующую топографию (Orbscan II, Baush & Lomb), исследование корнеального гистерезиса (Ocular Response Analyzer ORA, Reichert, США). Выделение ДНК осуществлялось методом фенольно-хлороформной экстракции из цельной венозной крови. Оценка нуклеотидной последовательности кодирующего региона и прилегающих областей в гене *SOD1* у пациентов с КК и членов их семей проводилась

методом анализа кривых плавления с высокой разрешающей способностью (HRM) (CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System) с использованием флуоресцентного красителя EvaGreen (Biotium Inc, Hayward, CA). Образцы с измененными кривыми плавления были секвенированы на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems, США).

Результаты. Во втором интроне гена *SOD1* у трех пациентов с кератоконусом и у одного индивида из контрольной группы выявлена однонуклеотидная замена c.73-108T>A (rs16988404) в гетерозиготном состоянии. По этнической принадлежности 1 пациент русский, 1 татарин, 1 метис (узбек/татарин) и 1 индивид татарин из контрольной группы. Впервые rs16988404 описана в 2007 году Pantelidou M. при амиотрофическом боковом склерозе. Кроме того, у одного из пациентов (метис) полиморфный вариант rs16988404 выявлен в сочетании с изменением нуклеотидной последовательности c.70+34A>C в третьем интроне гена *SOD1*. Однонуклеотидные варианты c.73-108T>A и c.70+34A>C в гене *SOD1* не были описаны при кератоконусе, поэтому необходимо проведение дальнейших исследований, касающихся функциональной значимости данных вариантов.

Таким образом, частота найденных однонуклеотидных вариантов c.73-108T>A и c.70+34A>C у пациентов с кератоконусом из Республики Башкортостан составляет 0,05% и 0,02% соответственно.

Список используемой литературы

1. Бикбов, М.М., Бикбова Г.М. Эктазии роговицы (патогенез, патоморфология, клиника, диагностика, лечение) // М.: Офтальмология. - 2011. - С.168.

2. Оганисян, К.Х. Генетические аспекты кератоконуса (обзор литературы) // Сборник науч. трудов международной науч.-практ. конф. по офтальмохирургии «Восток-Запад». - 2013.

3. Romero-Jimenez, M. Keratoconus: a review / M. Romero-Jimenez, J. Santodomingo-Rubido, J. S. Wolffsohn / Cont. Lens. Anterior Eye. – 2010. – №33. – P.157-166.

4. Edwards, M. The genetics of keratoconus // Clin. Exp. Ophthalmol. - 2001. - V.29. - №6. - P.345 - 351.

5. Millodot, M., Shneor E., Albou S. et al. Prevalence and associated factors of keratoconus in Jerusalem: a cross-sectional study // Ophthalmic. Epidemiol. - 2011. - V.18. - № 2. - P.91-97.

6. Owens, H., Gamble G. A profile of keratoconus in New Zealand // Cornea. - 2003. - V.22. - №2. - P.122-125.

7. Kenney, M.C. Increased levels of catalase and cathepsin V/L2 but decreased TIMP-1 in keratoconus corneas: evidence that oxidative stress plays a role in this disorder // Invest Ophthalmol Vis Sci. – 2005. – V.46. – P.823–832.

8. Noor, R. Superoxide dismutase–applications and relevance to human diseases // Medical Science Monitor. – 2002. – V.8(9). – P.RA210–RA215.

9. Lewis, P. Amyotrophic lateral sclerosis // N. Engl. J. Med. – 2001. – V.344. - №22. – P.1688-1700.

10. Majoor-Krakauer, D. Genetic epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis // Clin. Genet. – 2003. – V.63(2). – P.83-101.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕНОВ *CYP1B1* И *PITX2* У ПАЦИЕНТОВ С ПЕРВИЧНОЙ ВРОЖДЕННОЙ И ПЕРВИЧНОЙ ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМОЙ

Хасанова Р.Р.[1], Джемилева Л.У.[2], Лобов С.Л.[2], Загидуллина А.Ш.[3], Зайдуллин И.С.[4], Гарипова Э.З.[1], Савельева О.Н.[1], Хуснутдинова Э.К.[1,2]

[1] ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет», Уфа, Россия
[2] ФГБУН «Институт биохимии и генетики» УНЦ РАН, Уфа, Россия
[3] ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет», Уфа, Россия
[4] ГБУ «Уфимский НИИ глазных болезней» АН РБ, Уфа, Россия

Введение. Глаукома является причиной необратимой слепоты и слабовидения, занимая одно из ведущих мест в перечне инвалидизирующих заболеваний органа зрения [Аничков, 2012]. По данным Всемирной организации здравоохранения, в настоящее время в мире насчитывается около 1,5 млн детей с тяжелыми расстройствами зрения и полностью слепых. Нозологическая структура детской офтальмопатологии представлена преимущественно врожденными наследственными заболеваниями. Из них на долю врожденной глаукомы приходится в среднем до 0,1% всей глазной патологии [Т.А. Бирич, 2002; Э.И.Сайдашева с соавт., 2006; М.М. Бикбов с соавт., 2007]. Тем не менее как причина слепоты она выступает в 2,5–7% случаев [Сомов Е.Е., 2005; Сайдашева, 2006]. В связи с этим изучение этиопатогенеза и особенностей клинических проявлений различных нозологических вариантов глауком является одной из наиболее актуальных проблем офтальмологии. Значительная доля случаев врожденной глаукомы обусловлена наследуемыми мутациями, преимущественно локализующимися в гене цитохрома P450B1 (*CYP1B1*), а также мутации в этом гене выявлены при первичной ювенильной глаукоме и первичной открытоугольной глаукоме взрослых. Имеющиеся к настоящему времени экспериментальные данные свидетельствуют о том, что дифференцировка клеток нейромезенхимы, участвующих в формировании тканей переднего сегмента глаза, находится под контролем транскрипционных факторов PITX2, FOXC1 и сигнальных молекул семейства TGFb, FGF, WNT. Мутации в генах транскрипционных факторов *FOXC1* (ген ДНК-связывающего домена в виде вилки), *PITX2* (ген парноподобного гомеодомена) и *PAX6* (ген окуломбина) ответственны за развитие от 2 до 20% случаев врожденной глаукомы.

Цель. Целью исследования являлось изучение структурных особенностей гена цитохрома P450 (*CYP1B1*) у пациентов с первичной врожденной глаукомой и пер-

вичной открытоугольной глаукомой из Республики Башкортостан.

Материалы и методы. В качестве исследуемого материала нами были использованы 215 образцов ДНК пациентов с клиническим диагнозом «Первичная открытоугольная глаукома (ПОУГ)», предположительно наследственной этиологии, не связанных родством, и 14 образцов ДНК пациентов (14 семей) с установленным диагнозом «Первичная врожденная глаукома (ПВГ)» и 40 образцов ДНК членов их семей, проживающих в Республике Башкортостан. Контрольную группу составили 250 образцов ДНК здоровых индивидов, не имеющих диагноз ПВГ, ПОУГ и других сопутствующих заболеваний глаз. Выборки пациентов и здоровых индивидов состоят преимущественно из трех этнических групп (русские, татары, башкиры), преобладающих на территории Республики Башкортостан. Забор материала проводился на базе Центра лазерного восстановления зрения «Оптимед», МБУЗ «Городская клиническая больница №10», ГБУ «Уфимский научно-исследовательский институт глазных болезней АН РБ» с информированного согласия пациентов и членов их семей.

Основные результаты. Оценка нуклеотидной последовательности генов *CYP1B1* и *PITX2* проведена методом анализа конформационного полиморфизма однонитевой ДНК (SSCP) с последующим секвенированием на автоматическом анализаторе ABI PRISM 310 (Aplied Biosistems). Амплификация экзонов проводилась с использованием олигонуклеотидных праймеров, описанных Kumar A. в 2007 году.

В третьем экзоне гена *CYP1B1* у пациента с ПОУГ, русского по этнической принадлежности, обнаружена инсерция c.1105_1106insCTC (g.9853_9854insCTC, p.Arg368_Leu369insPro). Данная инсерция зарегистрирована в геномном браузере Ensembl, но литературные данные отсутствуют. Поэтому сделать какое-либо предположение о функциональной значимости данного изменения достаточно сложно.

Полиморфный вариант rs1056836 (c.1294C>G, p.Leu432Val) был выявлен в гомозиготном состоянии у одного пациента с ПОУГ, русского по этнической принадлежности, также в гомозиготном состоянии обнаружены два одонуклеотидных варианта c.1347T>C (rs1056837, p.Asp449Glu), rs1800440 (c.1358A>G, p.Asn453Ser) у двух не родственных пациентов, татар по этнической принадлежности, соответственно.

У 2 пациентов обнаружено сочетание в гомозиготном состоянии rs1056837 и rs1800440, один из пациентов с ПОУГ, татарин по этнической принадлежности, другой с ПВГ, башкир по этнической принадлежности. Также выявлено сочетание в гетерозиготном состоянии rs1056836 и rs1056837 у одного пациента, русского по этнической принадлежности, с диагнозом «первичная открытоугольная глаукома», у шести пациентов, также с ПОУГ, обнаружено сочетание трех полиморфных вариантов в гетерозиготном состоянии rs1056836, rs1056837 и rs1800440.

При анализе 4-го экзона гена *PITX2* у пациентов с ПОУГ было выявлено изменение нуклеотидной последовательности c.46+8delCinsGTT (rs72554074), приводящее к потере одного нуклеотида и одновременной вставке трех нуклеотидов. Тогда как у пациентов с ПВГ данное изменение не обнаружено. Вариант нуклеотидной последовательности c.46+8delCinsGTT был выявлен у 14 не родственных пациентов с первичной открытоугольной глаукомой. У 6 пациентов из 14 rs72554074 сочетается с полиморфными вариантами rs1056836, rs1056837, rs1800440, одновременно найденными в гене *CYP1B1*.

Таким образом, генетические влияния, обуславливающие возникновение первичной глаукомы, как показывают исследования, носят сложный характер. Поэтому необходимо дальнейшее изучение генетических факторов, приводящих к заболеванию первичной врожденной и первичной открытоугольной глаукомой.

Список используемой литературы

1. Аничков, Н.М. Головной мозг и открытоугольная глаукома // Практическая медицина.– 2012. – №4(59). – Т.1. – С.157.

2. Бирич, Т.А. Глаукома как социальная проблема в Беларуси // X съезд офтальмологов Украины: Тез. докл. – 2002. – С.171-172.

3. Сайдашева, Э.И. Врожденная глаукома // Избранные лекции по неонатальной офтальмологии. – 2006.

4. Бикбов, М.М. Детская офтальмологическая служба в республике Башкортостан: итоги и перспективы развития // Рос. педиатрическая офтальмол. – 2007. – №.3. – С.4.

5. Сомов, Е.Е. Клиническая офтальмология. – МЕДпресс-информ. – 2005.

6. Kumar, A. Role of *CYP1B1, MYOC, OPTN, and OPTC* genes in adult-onset primary open-angle glaucoma: predominance of *CYP1B1* mutations in Indian patients // Mol Vis. – 2007. – V.13. – P.667-676.

СОЗДАНИЕ ЭФФЕКТИВНЫХ СИСТЕМ ДЕТЕКЦИИ ЧАСТЫХ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ *ATP7B* ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ БОЛЕЗНИ ВИЛЬСОНА-КОНОВАЛОВА

Баязутдинова Г.М.[1], Щагина О.А.[1], Поляков А.В.[1], Федотов В.П.[2], Проскокова Т.Н.[3], Федорова Т.Ф.[4]

[1]ФГБНУ «МГНЦ», Москва, Россия
[2] БУЗ ВО «ВОКБ № 1», Воронеж, Россия
[3]Дальневосточный государственный медицинский университет, Хабаровск, Россия
[4]Санкт-Петербургская клиническая больница Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Болезнь Вильсона-Коновалова (БВК) – тяжелое аутосомно-рецессивное заболевание, обусловленное избыточным накоплением в организме и токсическим воздействием меди, характеризующееся сочетанным поражением внутренних органов и мозга [1]. К возникновению БВК приводят мутации в гене *ATP7B*, локализованном

в области 13q14.3. Для данного заболевания существует этиотропная специфическая терапия [2].

Цель работы. Целью работы явилось создание высокоэффективных диагностических тест-систем для повышения эффективности диагностики БВК.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили образцы ДНК 457 пробандов с направляющим диагнозом «болезнь Вильсона – Коновалова». Поиск частых мутаций в гене *ATP7B* осуществлен методом мультиплексной проба-зависимой лигазной реакции с последующей амплификацией (MLPA), мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) и массового параллельного секвенирования всей кодирующей последовательности и областей экзон-интронных соединений гена *ATP7B*.

Результаты и обсуждение. На основании данных о частотах встречаемости мутаций [3; 4] были отобраны следующие мутации в гене *ATP7B*: c.1340_1343del4, c.1770insT, c.2304insC, c.2532delA, , c.3029insT, c.3031insC, c.3036insC, c.3036_3038delTCA, c.3207C>A, c.3402delC, c.3627_3630del4, c.3649_3654del6, c.[3942delCA;3947delG]. Был проведен поиск данных мутаций в выборке пробандов. Были обнаружены: две мутации у 87 человек, одна мутация у 85 человек. Далее была создана система исследования всей кодирующей последовательности и областей экзон-интронных соединений гена *ATP7B* на основе метода массового параллельного секвенирования. Пригодные по качеству образцы ДНК пробандов с одной найденной мутацией (50 образцов) были исследованы с помощью данной системы, в результате вторая мутация была найдена у 36 человек.

В результате обнаружены мутации: c.3207C>A на 145 хромосомах, c.2304insC – на 21 хромосоме, c. 3036insC – на 11, c.3402delC – на 10, c.[3942delCA;3947delG] – на 8 хромосомах, c.3190G>A – на 6, c.1770insT – на 4, c.3659C>T и c.2532delA – на 3 хромосомах, c.1847G>A, c.2998G>A, c.3121C>T и c.3649_3654del6 – на 2 хромосомах; мутации c.1340_1343del4, c.3029insT, c.3031insC, c.3036_3038delTCA, c.3627_3630del4 не встретились ни разу. На основании полученных молекулярно-генетических данных были созданы две системы поиска частых мутаций в гене *ATP7B*. Одна система включает 12 мутаций (ins/del), информативность системы составила 15,8%. Вторая система включает 6 частых точковых мутаций, информативность системы – 55,2%. Общая информативность систем поиска частых мутаций в гене *ATP7B* у российских больных составила 71%.

Список литературы

1. Anjali B. Shah et al., Identification and analysis of mutations in the Wilson Disease gene (*ATP7B*): Population frequencies, genotype-phenotype correlation, and functional analyses. – Am. J. Hum. Genet. 61:317-328, 1997.

2. Асанов А.Ю. и др. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению болезни Вильсона-Коновалова (гепатолентикулярная дегенерация). – Москва, 2015.

3. www.hgmd.cf.ac.uk

4. www.wilsondisease.med.ualberta.ca

СЕМЕЙНЫЙ СЛУЧАЙ ДВУХ БРАТЬЕВ С ЛЕГКОЙ ФОРМОЙ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ РАЗЛИЧНОЙ ЭТИОЛОГИИ И МАТЕРИ С МОЗАИЧНОЙ ФОРМОЙ АНЕУПЛОИДИИ ПО Х-ХРОМОСОМЕ

Екатерина Галанина, Андрей Тулупов, Наталья Лемская, Юлия Максимова, Асия Шорина, Ирина Сергеева, Дмитрий Юдкин

Сектор хромосомных патологий, Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия

Интеллектуальная недостаточность (ИН) на сегодняшний день встречается в популяции с частотой приблизительно 1%. Синдром ломкой Х-хромосомы является одной из основных причин генетически обусловленной ИН. В основе данного синдрома лежит экспансия нуклеотидного повтора $(ЦГГ)_n$ в 5′-нетранслируемом участке гена FMR1 на Х-хромосоме. Анеуплоидии по Х-хромосоме, как правило, не оказывают влияния на носителя, но в 25% случаев женщины с трисомией по Х-хромосоме также имеют ИН. В медицинский диагностический центр обратилась семья: мать с двумя сыновьями. У детей предполагался диагноз интеллектуальной недостаточности. Целью нашего исследования было определение этиологии интеллектуальной недостаточности, представленной у этих пациентов. Перед нами были поставлены следующие задачи: исследование кариотипа всех членов семьи и проведение молекулярно-генетического исследование на наличие синдрома ломкой Х-хромосомы.

Клинические исследования включали консультацию следующих специалистов: клинического психолога, невролога и логопеда. Материалом для молекулярно-цитогенетического исследования послужили В-лимфоциты, полученные из периферической крови пациентов. FISH-анализ был проведен с использованием пэйтинг-проб Х-хромосомы и BAC-клонов, содержащих гены FMR1 и GPR50.

Семья: 44-летняя женщина (CPG 10 в базе ИМКБ СО РАН) и два сына в возрасте 25 и 20 лет (CPG9 и CPG11) были проконсультированы. Обоим сыновьям был выставлен диагноз легкой интеллектуальной недостаточности. У CPG11 был подтвержден диагноз синдрома ломкой Х-хромосомы, так как было выявлено наличие ломкого сайта FRAXA на 14% Х-хромосом (N=100), а также было показано, что промотор гена FMR1 метилирован. У CPG9 был выявлен нормальный ген FMR1 (30 ЦГГ триплетов, промотор не метилирован) без ломкого сайта FRAXA (N=51). У CPG10 была показана премутация в гене FMR1, содержащая 160 ЦГГ триплетов, а также было выявлено наличие ломкого сайта FRAXA на 5% Х-хромосом (N=124). Помимо этого, было обнаружено, что 5,1% метафаз CPG10 (N=369)

содержат различные вариации числа Х-хромосом и дополнительные маркерные дериваты Х-хромосомы. Большинство аномальных метафаз (3,3%) были 47, XXX, 1,6% метафаз были 48 XX+2 der(X) и 0,2 % 50XXXXX.

Женщина с различными вариациями числа Х-хромосом, вплоть до пентаплоидии, и одной аномальной Х-хромосомой с ломким сайтом FRAXA имеет детей с ИН различной этиологии. У одного сына подтвержден синдром ломкой Х-хромосомы, у второго выявлен нормальный ген FMR1 и выставлен диагноз недифференцированной интеллектуальной недостаточности. В итоге мы можем сделать вывод, что симптомы представленной семьи связаны с ассоциированными с ломкой Х-хромосомой расстройствами, которые были спровоцированы какими-либо дополнительными генетическими, экологическими или социальными факторами, приводящими к ИН.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 15-15-10001.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ВРОЖДЕННЫХ ФОРМ АНИРИДИИ

Васильева Т.А.[1], Хлебникова О.В.[1], Марахонов А.В.[1,2], Петрова Н.В.[1], Воскресенская А.А.[3], Поздеева Н.А.[3], Крынская И.А.[1], Козлова Ю.О.[1], Ряднинская Н.В.[1], Чухрова А.Л.[1], Шилова Н.В.[1], Кадышев В.В.[1], Зинченко Р.А.[1,4]

[1] Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр»
[2] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (государственный университет)»
[3] Чебоксарский филиал федерального государственного автономного учреждения «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации
[4] Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Введение. Доля моногенных врожденных пороков (ВПР) органа зрения среди наследственной патологии глаз в различных популяциях РФ составляет от 14 до 55% случаев. Одна из частых форм ВПР органа зрения – врожденная аниридия – наследственный моногенный или хромосомный множественный порок развития, затрагивающий в большинстве случаев все структуры глаза, поджелудочную железу, гипоталамо-гипофизарную систему, а иногда и другие системы (менее 10%). С 2003 года в России зарегистрировано около 300 случаев врожденной аниридии (неопубликованные данные ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» и Межрегиональной общественной организации «Межрегиональный центр помощи больным аниридией "Радужка"»).

Врожденная аниридия в 75% случаев встречается как изолированный порок развития глаза без очевидного визуализированного вовлечения других органов и систем, в 10% ВПР радужки осложнен дополнительными поражениями. В обоих случаях врожденная аниридия наследуется аутосомно-доминантно и обусловлена мутациями в гене *PAX6*, в том числе хромосомными перестройками, вовлекающими регион 11p13. В 13% случаев аниридия является составной частью синдрома WAGR. Синдром WAGR обусловлен делецией региона 11p13, захватывающей локусы гена *PAX6* и гена предрасположенности к развитию опухоли Вильмса *WT1*. WAGR встречается в основном в виде спорадических случаев. Во всех спорадических случаях до установления генетической причины больной аниридией имеет 50%-ный риск развития нефробластомы до 8 лет жизни. Высокий риск и злокачественность карциномы почки, составляющей синдром WAGR, – определяют важность дифференциального диагноза.

В 2–5% случаев аниридия ассоциирована с другими моногенными и хромосомными синдромами, более редкими по частоте. Среди них в международной базе данных OMIM выделено 25 различных синдромов. В редких случаях (от 4 до 10%) врожденная аниридия может быть ассоциирована с мутациями в генах *FOXC1* (OMIM*601090), *PITX2* (OMIM*601542), *PITX3* (OMIM*602669) и других. При этом в подавляющем большинстве случаев мутации в генах *FOXC1* и *PITX2* ассоциированы с синдромом Аксенфельда – Ригера (OMIM #180500, OMIM #602482) и аномалией Петерса (OMIM #604229). Учитывая схожесть фенотипов, необходимо проводить дифференциальную диагностику аниридии с этими заболеваниями. Аномалии Петерса и Аксенфельда генетически гетерогенны и обычно ассоциированы с мутациями в одном из генов: *PITX2, FOXC1*, *CYP1B1, PAX6* и другими.

Значительную сложность в молекулярном подтверждении диагноза врожденной аниридии представляет гетерогенность молекулярных механизмов повреждения гена *PAX6*. Они включают в себя не только точковые мутации, но и крупные хромосомные перестройки с вовлечением области p13 хромосомы 11. При этом данные хромосомные перестройки в ряде случаев могут затрагивать не кодирующую часть гена *PAX6*, а дистальный *цис*-регуляторный район, находящийся на расстоянии 150 тыс. п.н. от гена. Кроме того, как и при других аутосомно-доминантных состояниях, при врожденной аниридии довольно высока частота соматического мозаицизма по патогенной мутации, оцениваемая в 17,5% спорадических случаев. Изучение спектра и частот мутаций в гене *PAX6* в разных популяциях мира показало наличие региональных особенностей. Высокая гетерогенность нарушений гена *PAX6* и вариабельность спектра и частот

мутаций при врожденной аниридии приводит к необходимости разработки различных методических подходов к диагностике и дифференциальной диагностике заболевания для РФ.

Цель и задачи. Изучить уже существующие рекомендации и алгоритмы для молекулярной диагностики аниридии, на основе чего разработать протокол для диагностики врожденной аниридии с учетом особенностей спектра мутаций больных врожденной аниридией на выборке больных из России.

Материалы и методы. Тридцати четырем пациентам из двадцати семи неродственных семей проведено офтальмологическое обследование и ДНК-диагностика, включающая секвенирование кодирующих экзонов гена *PAX6* с последующим анализом крупных хромосомных перестроек локуса 11p13.

Основные результаты. Проанализировано двадцать два больных без отягощенной семейной истории и двенадцать семейных случаев врожденной аниридии. У двух пациентов определена протяженная делеция региона 11p13, позволившая установить предположительный диагноз синдрома WAGR. Среди оставшихся пациентов мутации были определены во всех случаях. У двадцати трех пациентов были обнаружены точковые мутации гена *PAX6*: семь новых и восемь различных ранее описанных мутаций. Крупные делеции определены у одиннадцати пациентов. Проанализированный спектр мутаций позволил определить особенности генетических причин врожденной аниридии у российских больных и разработать протокол диагностики врожденной аниридии, включающий поиск протяженных делеций с последующим их подтверждением методами FISH в случае с WAGR-делециями или анализом потери гетерозиготности полиморфных маркеров региона 11p13, в случае отсутствия таковых проводится поиск внутригенных мутаций в гене *PAX6* методом секвенирования по Сэнгеру.

Выводы. Определены мутации у 100% проанализированных больных. Разработан протокол диагностики врожденной аниридии с учетом генетических особенностей спектра наследственных изменений, приводящих к этому заболеванию, в российской популяции.

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов № 17-04-00288, РНФ 17-15-01051.

ДНК-ДИАГНОСТИКА ИНВЕРСИЙ ИНТРОНОВ 1 И 22 ГЕНА *F8* У БОЛЬНЫХ С ГЕМОФИЛИЕЙ А ИЗ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Бескоровайная Т.С., Миловидова Т.Б., Щагина О.А., Поляков А.В.

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва, Россия

Введение. Гемофилия А – генетически обусловленное заболевание, вызванное нарушением коагуляции крови вследствие дефекта или отсутствия фактора свертывания крови VIII, кодируемого геном *F8*. Заболевание наследуется по Х-сцепленному рецессивному типу, его частота составляет 1:5000 новорожденных мальчиков. В гене описаны две частые мутации - инверсия интрона 22 и инверсия интрона 1, на долю которых у больных с тяжелой формой заболевания (активность фактора VIII <1%) приходится 40-50% и 2-5% [1, 2] соответственно.

Цель и задачи. Целью данного исследования являлись: разработка эффективной диагностической системы для выявления инверсий интронов 1 и 22 гена *F8* и определение доли данных инверсий в семьях с гемофилией А из Российской Федерации.

Материалы и методы. Для поиска указанных инверсий гена *F8* из архива лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ» было отобрано 94 семьи с входящим диагнозом «гемофилия А». В 55 семьях для анализа были пригодны образцы ДНК пробандов, в 39 семьях исследование проводилось на биологическом материале вероятных носительниц: матерей и дочерей пробандов. Тяжесть течения заболевания у пробандов в выбранных семьях неизвестна. Поиск мутаций проводили методом Inverse Shifting-PCR (IS-PCR), предложенным Rossetti L.C. [3, 4, 5].

Результаты и обсуждение. Инверсия интрона 22 была выявлена в 36,2% российских семей. Матери пробандов с мутацией из 8 семей, чей материал был доступен, являлись гетерозиготными носительницами данной инверсии.

В двух семьях были выявлены фрагменты, длина которых не соответствовала ни норме, ни инверсии интрона 22. Нуклеотидная последовательность этих фрагментов была установлена методом автоматического секвенирования по Сэнгеру. В результате были получены последовательности интронов 14 и 21 гена *F8*. Далее у пробандов было выявлено отсутствие ПЦР-продуктов, соответствовавших экзонам с 15 по 21. Таким образом, причиной гемофилии А в данных семьях является протяженная перестройка гена *F8* с делецией экзонов с 15 по 21.

Стандартная инверсия интрона 1 в нашей выборке не обнаружена. Однако был выявлен аномальный вариант инверсии, при котором у пробанда в результате неизвестной перестройки при проведении IS-PCR исчез фрагмент, соответствующий как нормальному, так и инвертированному интрону 1. Методом количественного MLPA-анализа установлено, что причиной заболевания в данной семье является дупликация экзонов со 2 по 13.

Заключение. Разработанная система детекции позволяет быстро, точно и относительно недорого выявлять в одной пробирке инверсии интронов 1 и 22 гена *F8*. Полученные результаты о частотах указанных инверсий согласуются с мировыми данными. В Российской Федерации, как и во всем мире, доля инверсии интрона 22 весьма высока. Поэтому молекулярно-генетическое обследование семей с гемофилией А целесообразно начинать с поиска данных инверсий. Система IS-PCR предназначена для выявления стандартных инверсий интронов 1 и 22, однако при проведении рутинных исследований возможно обнаружение каких-либо иных сложных пере-

строек. Таким образом, данная методика обладает более широкими диагностическими возможностями, однако для уточнения характера таких перестроек необходимо проведение дополнительных исследований.

Список литературы

1. Lakich D., Kazazian H.H., Antonarakis S.E., Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are common cause of severe Haemophilia A. Nat Genet 1993; 5: 236–41.

2. Bagnall R.D., Waseem N., Green P.M., Giannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe Hemophilia A. Blood 2002; 99: 168–74.

3. Rossetti L.C., Radic P., Larripa I.B , De Brasi C.D. Genotyping the hemophilia inversion hotspot by use of inverse PCR. Clin Chem 2005; 51: 154–8.

4. Rossetti L.C., Radic C.P., Larripa I.B., De Brasi C.D. Developing a new generation of tests for genotyping hemophilia causative rearrangements involving int22h and int1h hotspots in the factor VIII gene. J Thromb Haemost 2008; 6: 830–836.

5. Бескоровайная Т.С., Миловидова Т.Б., Щагина О.А., Поляков А.В. ДНК-диагностика гемофилии А с использованием новой медицинской технологии «Система детекции инверсии интрона 22 гена *F8*» в группе больных из Российской Федерации. Медицинская генетика 2016; 15, 3 (165): 23-29.

СПЕКТР МУТАЦИЙ В ГЕНАХ КРИСТАЛЛИНОВ *CRYAA, CRYAB* И *CRYGD* У БОЛЬНЫХ С ВРОЖДЕННОЙ ИЗОЛИРОВАННОЙ КАТАРАКТОЙ ИЗ РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН

Хидиятова И.И.[1], Хидиятова И.М.[1], Азнабаев М.Т.[2], Хуснутдинова Э.К.[1]

[1] ФГБУН «Институт биохимии и генетики» УНЦ РАН, Уфа, Россия

[2] ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Уфа, Россия

Введение. Наследственная несиндромальная катаракта (ННК) – фенотипически и генетически гетерогенная группа заболеваний. Их общая частота в среднем в мире составляет 1-6 случаев на 10000 детей (Francis et al., 2000). На сегодняшний день картировано 60 генных локусов, сцепленных с ННК, идентифицировано 22 гена (Kumar et al., 2011). К частым причинам развития ННК относятся мутации в генах кристаллинов, кодирующих основные белки хрусталика, составляющие до 90% всех его белков. Кристаллины – высокостабильные водорастворимые белки, обеспечивающие прозрачность хрусталика и его высокий показатель преломления. В хрусталике глаз позвоночных экспрессируются 3 типа кристаллинов: α-кристаллины (40%), β-кристаллины (35%) и γ-кристаллины (25%) (Horwitz, 2003). Мутации в генах, кодирующих кристаллины, приводят к образованию белков с неправильной структурой, нарушая их упаковку, а также понижают растворимость кристаллиновых белков, приводя к различным помутнениям (Yi et al., 2011). Клинический полиморфизм заболевания, связанный с разнообразием его генетических причин, популяционная неоднородность по распространенности ННК, по спектру и частоте мутаций в соответствующих генах обусловливают необходимость анализа всех этих характеристик в конкретных регионах и отдельных этнических группах. В Республике Башкортостан (РБ) – одном из многонациональных регионов Волго-Уральского региона России, характеризующемся значительным своеобразием генофонда населения, – исследования генетических основ наследственной катаракты начаты в последние годы. В частности, определены спектр и частота мутаций в генах коннексинов 46 (*GJA3*) и 50 (*GJA8*) (Хидиятова и др., 2014; 2016).

Цель и задачи. Общей целью исследования является изучение молекулярно-генетических основ наследственных форм катаракты у больных из РБ, направленное на познание их этиопатогенеза и дальнейшую разработку новых методов профилактики и лечения данного заболевания. В задачи настоящего исследования входил анализ генов кристаллина альфа А (*CRYAA*), кристаллина альфа В (*CRYAB*) и кристаллина гамма D (*CRYGD*) у больных с врожденной изолированной формой катаракты (ВИК) из РБ.

Материалы и методы. Объектом молекулярно-генетического исследования послужили образцы ДНК больных, членов их семей (40 неродственных семей) и контрольных выборок (здоровых жителей РБ различной этнической принадлежности: русской (60 чел.), татарской (65 чел.) и башкирской (60 чел.)). У всех обследуемых лиц кровь для ДНК-анализа была получена с их информированного согласия. Анализ структурных особенностей кодирующих последовательностей генов *CRYAA*, *CRYAB* и *CRYGD* проведен методом прямого секвенирования на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3130 XL (Applied Biosystems). Функциональная значимость выявленных миссенс-мутаций, помимо их скрининга в группах здоровых лиц, была оценена с помощью компьютерных программ PoliPhen2 (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/) и SIFT (http://sift.bii.a-star.edu.sg/).

Основные результаты. На сегодняшний день в гене *CRYAA* у больных с наследственной врожденной катарактой описано более 10 различных мутаций (www//hgmd.org). В результате проведенного нами исследования в гене *CRYAA* у 3 неродственных больных с наследственной врожденной катарактой выявлены две новые, ранее не описанные миссенс-мутации: c.253C>T (p.Leu85Phe) – идентифицирована в семье с аутосомно-доминантной врожденной ядерной катарактой, ассоциированной с микрофтальмом и микрокорнеа; c.291C>G (p.His97Gln) – обнаружена у двух неродственных пациентов с аутосомно-доминантной врожденной изолированной ядерной катарактой.

В гене *CRYAB* описано 17 различных мутаций (www//hgmd.org). В результате исследования гена *CRYAB* у обследованных нами пациентов было выявлено одно синонимичное изменение нуклеотидной последовательности - c.165G>A (p.Leu55Leu), оказавшееся известным нейтраль-

ным полиморфным вариантом rs2228387. Данный полиморфный вариант был обнаружен у пяти неродственных пациентов, 4 из которых – башкиры, один – метис (украинец/башкирка).

В гене *CRYGD* описано 24 различные мутации (www// hgmd.org). У пациентов из РБ в гене *CRYGD* идентифицированы две известные нуклеотидные замены: c.376G>A(p. Val126Met) (rs150318966) – миссенс-мутация, представленная в базе данных ClinVar (http://www.ncbi.nlm.nih.gav/clinvar) как вариант, имеющий патогенное значение, и c.130A>G(p.Met44Val)(rs140206746) – миссенс-вариант, характеризующийся, по данным предсказательных программ, как «доброкачественный» полиморфный вариант. Мутация c.376G>A(p.Val126Met) обнаружена нами у пациента русской этнической принадлежности с врожденной ядерной катарактой.

Заключение. У больных с врожденной изолированной катарактой из Республики Башкортостан патогенные мутации в генах кристаллинов *CRYAA* и *CRYGD* выявлены у 4 из 40 неродственных больных. Вклад наследственных форм изолированной катаракты, обусловленных мутациями в данных генах, в структуру врожденных изолированных катаракт в РБ составил 10%. У всех пациентов с выявленными мутациями в исследованных генах катаракта характеризуется как врожденная ядерная катаракта, наследуемая по аутосомно-доминантному типу. В гене *CRYAB* патогенных мутаций, приводящих к развитию заболевания, в исследованной выборке не обнаружено. Полученные сведения вносят вклад в познание патогенеза наследственных форм катаракты, их геногеографии и являются основой для разработки оптимальных для региона подходов ДНК-диагностики.

Список используемой литературы

1. Francis P., Berry V., Bhattacharya S., Moore A. The genetics of childhood cataract // J. Med. Genet. – 2000. – V.37. – P. 481–488.

2. Kumar M., Agarwal T., Khokhar S. et al. Mutation screening and genotype phenotype correlation of α-crystallin, γ- and GJA8 gene in congenital cataract //Moleclar Vision. – 2011. – V.17. – P.693-707.

3. Horwitz J. Alpha-crystallin // Exp. Eye Res. - 2003. – V.76. – P.145–153.

4. Yi J., Yun J., Li Z. K., Xu C.T. Epidemiology and molecular genetics of congenital cataractsnt// Int. Ophthalmol. – 2011; – V.4 (4). – P. 422-432.

5. Хидиятова И.И., Азнабаев М.Т., Хидиятова И.М., Авхадеева С.Р., Джемилева Л.У., Зинченко Р.А., Хуснутдинова Э.К. Анализ гена коннексина 50 (*GJA8*) у больных с наследственной врожденной катарактой из Республики Башкортостан // Медицинская генетика. – 2014. – Т.13. – №9. – С.37-42.

6. Хидиятова И.И., Азнабаев М.Т., Хидиятова И.М., Авхадеева С.Р, Джемилева Л.У., Хуснутдинова Э.К. Анализ гена коннексина 46 (GJA3) у больных с наследственной врожденной катарактой из Республики Башкортостан// Медицинский вестник Башкортостана – 2016. - №4 – С. 16-20.

АНАЛИЗ ЭКЗОМОВ У ДЕТЕЙ С MODY ДИАБЕТОМ

Глотов О.С.[1,2,5], Глотов А.С.[1,2], Серебрякова Е.А.[1,2,5], Башнина Е.Б.[4], Берсенева О.С.[4], Туркунова М.Е.[3], Полякова И.В.[1,5], Иващенко Т.Э.[2], Полев Д.Е.[1], Апалько С.В.[1,5], Федяков М.А.[5], Швед Н.Ю.[1,2,5], Шабанова Е.С.[2], Романова О.В.[2,5], Дубинина Т.А.[6], Тыртова Л.В.[4], Полянская М.А.[4], Лобанова Н.Н.[4], Оленев А.С.[4], Платонов В.В.[6], Корытко Т.Е.[4], Карпушкина А.В.[7], Предеус А.В.[8] , Барбитов Ю.А.[1,8], Дитковская Л.В.[3], Желенина Л.А.[3], Баранов В.С.[1,2]

[1] Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

[2] Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

[3] ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет», Санкт-Петербург, Россия

[4] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

[5] СПб ГБУЗ «Городская больница № 40», Сестрорецк, Санкт-Петербург, Россия

[6] Детская городская больница № 19 им. К.А. Раухфуса, Санкт-Петербург, Россия

[7] Фонд КАФ, Москва, Россия

[8] Институт биоинформатики, Санкт-Петербург, Россия

Одной из важнейших задач здравоохранения в России является совершенствование оказания медицинской помощи, используя современные высокотехнологические методы и подходы. Во многом они необходимы для обследования детей, а также членов их семей (уточнение выявленной мутации) на моногенные эндокринные заболевания.

Учитывая размеры генов, связь с патогенезом, нами разработаны NGS-диагностические панели для исследования кодирующих регионов генов следующих нозологий: гиперинсулинизм и MODY - *HNF1A, GCK, HNF4A, HNF1B, PDX1, NEUROD1, KLF11, CEL, PAX4, INS, BLK, EIF2AK3, RFX6, WFS1, ZFP57, FOXP3, KCNJ11, ABCC8, GLUD1, HADH (SCHAD), SLC16A1, UCP2, INSR, AKT2, GCG, GCGR, PPARG, PTF1A.*

Методом секвенирования нового поколения (NGS) на аппарате «HiSeq 2500» («Illumina», США) проведено исследование всех кодирующих регионов генов (экзома)

у 118 пациентов с гиперинсулинизмом и MODY: 72 пробанда-ребенка и 46 родственников (мать, отец, сиблинги).

Биоинформационный фильтеринг результатов секвенирования образцов ДНК проводился с помощью программ: «GeneTalk» (https://www.gene-talk.de/), «UGENE» (http://ugene.unipro.ru/), «Ion Reporter» (https://ionreporter.lifetechnologies.com/ir/), «SIFT» (http://sift.jcvi.org/), «PolyPhen2» (genetics.bwh.harvard.edu/pph2/), «PAPI» (http://papi.unipv.it/). Для ранжирования вариантов нами была использована разработанная нами метрика, учитывающая следующие данные: а) какой тип у данной замены (синонимичная, несинонимичная, нонсенс и др.); б) какой эффект данной замены предсказывается программами PROVEAN, SIFT и Polyphen2; в) какая частота встречаемости данной замены в базах «1000 геномов», ExAC (Exome Aggregation Consortium), ESP6500 и г) какая частота встречаемости данной замены в исследуемой когорте. Метрика разработана в соответствии с рекомендациями Американского колледжа медицинских генетиков (ACMG). Разработанный нами собственный протокол анализа данных способствовал существенному повышению качества анализа (исключает ошибки референса) и увеличению выявляемости.

Верификация полученных данных проводилась методом прямого секвенирования на приборе «Genetic Analyzer 3130» («Applied Biosystems», США).

Более чем в 40% случаев диагноз был подтвержден молекулярно-генетическими методами. В таблице представлены выявленные и подтвержденные мутации у пациентов.

Тип	Ген	Частота по литературе	Частота в нашей группе	Выявленные мутации
MODY 2	***GCK***	30-50%	48%	c.128C>T c.130G>A c.199C>A,.766C>G c.230A>G c.682T>C c.683C>T c.754A>G c.772C>A c.868C>G c.919G>A c.931delC (2раза) c.1348_1349delCG c.1349G>A
MODY 3	***HNF1A***	10%	17%	c.92G>A/// c.543_545delACG c.257T>A (c ***KCNJ11)*** p.Leu162Arg c.709A>G
MODY 9	***PAX4***	-		c.574C>A
MODY 10	***INS-IGF2***	>1%		c.98G>T
MODY 13	***KCNJ11***	-		c.406G>T (2 раза)
Другие	***ABCC8***	-		c.4139G>A c.4432G>A
	EIF2AK3	-		c.154G>A p.R638
	GATA6	-		c.1477C>T
	HADH	-		c.643C>A
	WFS1	-		c.2327A>T c.2452C>T

Таким образом, полученные нами данные на российской популяции показывают большую выявляемость, чем данные, полученные ранее для MODY на других популяциях. Возможно, это связано как с использованием полноэкзомного секвенирования для поиска мутаций, так и с предложенным нами биоинформационным алгоритмом.

Выявленные мутации будут способствовать уточнению молекулярной основы заболевания и иметь большое значение для понимания механизма развития патологии и перспектив ее лечения, в том числе и у детей.

Исследование было поддержано программой «Альфа-Эндо», Фонд КАФ, и грантом РНФ № 14-50-00069.

Раздел 11. НОВЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ВИЧ И ВИЧ-АССОЦИИРОВАННЫХ ИНФЕКЦИЙ

ВИРУСНАЯ НАГРУЗКА У ПАЦИЕНТОВ С ВПЕРВЫЕ ДИАГНОСТИРОВАННОЙ В 2016 ГОДУ ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ

Вехова Е.В.

ГБУЗ «Самарский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», Самара, Россия

Введение. При ВИЧ-инфекции одним из показателей, определяющих тактику ведения пациентов, является вирусная нагрузка (ВН). Исследование ВН входит в стандарт медицинской помощи *ВИЧ*-инфицированным. ВН является значимым параметром для эпидемиологических исследований. Самарская область с 2006 года является территорией с генерализованной стадией эпидемии *ВИЧ*-инфекции (среди беременных более 1% *ВИЧ*-позитивных). Заболеваемость в Самарской области за 2016 год составила 104,1 на 100 тысяч населения, распространенность на 01.01.2017 – 1978,8 на 100 тыс. населения.

Цель и задачи исследования. Провести ретроспективный анализ впервые диагностированной в 2016 году *ВИЧ*-инфекции среди жителей Промышленного района, относящихся к двум поликлиникам: городская поликлиника № 1 и МСЧ № 2 г.о. Самары, с учетом данных об уровне вирусной нагрузки. Изучать уровень ВН в зависимости от возраста пациентов и года выявления *ВИЧ*-инфекции.

Материалы и методы. Проведен ретроспективный анализ амбулаторных карт (форма № 025/у-04 «Медицинская карта амбулаторного больного») пациентов, которым в 2016 г. установлен диагноз *ВИЧ*-инфекции. Для анализа использовано наибольшее значение ВН, полученное течение 2016 года, так как исследования повторялись. В работе использованы методы описательной статистики: расчет среднего и среднеквадратического отклонения; расчет долей; расчет доверительных интервалов по методу Клоппера – Пирсона.

Основные результаты. Диагноз *ВИЧ*-инфекции в 2016 году установлен 173 пациентам (ГП № 1 – 63; МСЧ № 2 – 110): мужчин – 96 (55,5%; ДИ: 47,8-63,01%); женщин – 77 (44,5%; ДИ: 36,97-52,2%). Пациенты были в возрасте от 26 до 60 лет; средний возраст 38,5±*9,1* (M±SD) лет: мужчины – 39,7±9,9 лет; женщины – 36,9±7,8 лет. Пациенты, вставшие на диспансерный учет в 2016 году, были выявлены *ВИЧ*-положительными в иммунном блоттинге в период с 2000 года: 2000 г. – 2; 2001 г. – 4; 2002 г. – 1; 2003 г. – 2; 2004 г. – 2; 2005 г. – 1; 2006 г. – 1; 2007 г. – 3; 2008 – 4; 2009 г. – 5; 2010 г. – 1; 2011 г. – 5; 2012 г. – 1; 2013 г. – 5; 2014 г. – 8; 2015 г. – 39; 2016 г. – 89. На момент обращения в СОЦ СПИД и ИЗ пациентам установлены диагнозы: 2 Б – 3 (1,7%); 3 – 96 (55,5%); 4 А – 43 (24,9%); 4 Б – 29 (16,8%); 4В – 2 (1,2%). На конец года диагнозы были изменены: 3 – 82 (47,7%); 4 А – 48 (27,7%); 4 Б – 38 (22,0%); 4В – 5 (2,9%).

Вирусная нагрузка у пациентов с впервые установленным диагнозом *ВИЧ*-инфекции в 2016 году

Год первого иммунного блота	Вирусная нагрузка					
	ниже предела обнаружения	до 1 тыс.	от 1 тыс. до 50 тыс.	50–100 тыс.	более 100 тыс.	Всего
2000	0	0	0	0	2 (100%)	2
2001	0	0	1 (25%)	0	3 (75%)	4
2002	0	0	0	0	1 (100%)	1
2003	0	0	0	0	2 (100%)	2
2004	0	0	2 (100%)	0	0	2
2005	0	0	1 (100%)	0	0	1
2006	0	0	1 (100%)	0	0	1
2007	0	0	1 (25%)	0	2 (100%)	3
2008	0	0	0	1 (25%)	3 (75%)	4
2009	0	1 (20%)	2 (40%)	0	2 (40%)	5
2010	0	0	0	0	1 (100%)	1
2011	1 (20%)	0	0	1(20%)	3 (60%)	5
2012	0	0	1 (100%)	0	0	1
2013	0	0	3 (60%)	0	2 (40%)	5
2014	0	0	4 (50%)	1 (12,5%)	3 (37,5%)	8

Год первого иммунного блота	Вирусная нагрузка					
	ниже предела обнаружения	до 1 тыс.	от 1 тыс. до 50 тыс.	50–100 тыс.	более 100 тыс.	Всего
2015	1 (2,6%)	2 (5,1%)	19 (48,7%)	5 (12,8%)	12 (30,8%)	39
2016	3 (3,4%)	5 (6,7%)	43(48,9%)	9 (10,2%)	28 (31,8%)	88
Всего	5 (2,9%)	8 (4,7%)	78 (45,3%)	17 (9,9%)	64 (37,2%)	172

Анализ уровня ВН проведен у всех пациентов; один сдал однократно, однако результат ингибирован.

Максимально высокий уровень ВН среди всех наблюдений составил более 10000000 копий/мл. Уровень вирусной нагрузки менее 50 тыс. копий/мл зарегистрирован у 91 (52%; ДИ: 45,2-60,6%) пациента (из них у 5 ниже предела обнаружения; у 8 менее 1000 копий/мл); уровень выше 50 тыс. копий/мл – у 81 (47,1%; 95% ДИ: 39,5-54,8%). Проведен анализ уровня ВН у пациентов в зависимости от территории наблюдения. Распределение уровней ВН у 63 пациентов ГП № 1: ниже предела обнаружения – у 3 (4,8%; ДИ: 4,8-13,3%); с определяемого уровня до 1000 копий/мл у – 2 (3,2%; ДИ: 0,39-11%); от 1000 до 50 тыс. копий/мл у – 24 (38,1%; ДИ: 26,2-51,2%); от 50 тыс. до 100 тыс. копий/мл – у 7 (11,1%; ДИ: 4,56-21,6%); выше 100 тыс. копий/мл – у 27 (42,9%; ДИ: 30,5-55,9%). Распределение уровня ВН у 109 пациентов МСЧ № 2: ниже предела обнаружения – у 2 (1,8%; ДИ –0,2-6,5%); с определяемого уровня до 1000 копий/мл у – 6 (5,5%; ДИ: 2,1-11,6%); от 1000 до 50 тыс. копий/мл у 54 (49,5%; ДИ: 39,8-59,3%); от 50 тыс. копий/мл до 100 тыс. копий/мл – у 10 (9,2%; ДИ: 4,5-16,3%); выше 100 тыс. копий/мл – у 37 (33,9%; ДИ: 25,2-43,6%). Различия в уровнях ВН у пациентов, различных территорий не выявлено (p=0.436). Проведен анализ уровня ВН у пациентов, выявленных в течение 2016 года (год первого иммунного блотинга) и вставших на учет в этом же году. Диагноз острой ВИЧ-инфекции установлен у 3 человек, уровень ВН на момент обращения в СОЦ СПИД и ИЗ составлял: 96402 копий/мл; 245694 копий/мл; 6755030 копий/мл. При острой инфекции может быть очень высокий уровень ВН (миллионы копий). Повышение уровня ВН в других случаях связано с прогрессией болезни. Исследование высокого уровня ВН у пациентов по возрастным категориям показало: среди 25 пациентов в возрасте 24-29 лет ВН более 100 тыс. копий/мл зарегистрирована у 6 (24,5%; 95% ДИ: 9,4-45,1%); среди 83 пациентов в возрасте 30-39 лет – у 33 (39,8%; 95% ДИ: 29,2-51,1%); из 43 пациентов в возрасте 40-49 лет – у 19 (44,2%; 95% ДИ: 29,1-60,21%); среди 21 человека в возрасте 50 лет и старше – у 6 (28,6%; 95% ДИ: 11,3-52,2%). Среди 21 пациента 50 лет и старше первый положительный результат в иммунном блоттинге в течение 2015-2016 годов был зарегистрирован у 19 человек (90,5%) пациентов: в 2015 г. – 5; в 2016 г. – 14.

Заключение/выводы. Вирусная нагрузка (более 100 тысяч копий/мл) зарегистрирована у 64 (37,2; ДИ: 29,9-44,9%) пациентов. В 2016 году не выявлено более высокого уровня ВН у пациентов 50 лет и старше, однако пациенты этой группы вставали на диспансерный учет в более ранние сроки (вероятно, имели менее длительный анамнез по ВИЧ-инфекции). *Высокий* уровень ВН отражает не только прогрессию *ВИЧ*-инфекции, но и повышает вероятность передачи инфекции.

(ФИЛО)ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВИЧ-1 В РЕШЕНИИ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ ЗАДАЧ

Лукашов В.В.

Department of Medical Microbiology, Academic Medical Center, University of Amsterdam, The Netherlands

Мировая эпидемия ВИЧ/СПИД является комбинацией (суперпозицией) отдельных вспышек, определяемых социальными эпидемиологическими сетями, различающимися между собой географическими, поведенческими (группы риска), этническими, религиозными и др. факторами. Соответственно, динамика мировой эпидемии в значительной мере определяется характеристиками этих сетей – их структурой, динамикой, стабильностью, перекрыванием с другими сетями и т.д. Изучение этих характеристик является традиционной задачей эпидемиологии. Различные сети характеризуются различными циркулирующими вариантами ВИЧ-1, что открывает возможность использования генетических маркеров в качестве эпидемиологических маркеров для изучения традиционных – и новых – эпидемиологических вопросов. В нашем докладе мы рассмотрим возможности (фило)генетических методов в решении эпидемиологических задач.

В наших исследованиях, направленных на реконструкцию и прогнозирование развития эпидемии ВИЧ-1 в Западной Европе (в особенности в Нидерландах) и на территории бывшего СССР (в особенности в России), мы получили и проанализировали >10 000 последовательностей ВИЧ-1 за период наблюдений в >30 лет.

Мы показали, что, несмотря на географическое перекрывание двух основных групп риска в Нидерландах, ГБМ и ВВН, и циркуляцию вариантов одного субтипа ВИЧ-1 – субтипа В – в этих группах риска, начало эпидемии среди ВВН связано с независимым от ГБМ занесением специфичного варианта ВИЧ-1 в эту группу риска. Эти специфичные для ВВН варианты ВИЧ-1 в значительной мере определяли развитие эпидемии в Нидерландах до начала 2000-х гг. Программы снижения риска привели к резкому снижению числа новых случаев инфекции среди ВВН и устранению специфичных для них вариантов вируса из общей популяции.

В отличие от других стран (в т.ч. США и стран За-

падной Европы), где эпидемия ВИЧ-1 в начале, со второй половины 1970-х – начала 1980-х гг., имела лавинообразное развитие, эпидемия ВИЧ-1 на территории (бывшего) СССР до 1995-96 гг. была незначительной (+-1000 случаев инфекции за +-10 лет после выявления первого случая). Лавинообразный характер эпидемия приобрела после занесения двух вариантов ВИЧ-1 – субтипов А (вариант ВВН-А) и В – в группы риска на юге Украины. Из этих двух вирусов вариант ВВН-А получил распространение на территории бывшего СССР, обусловив +-90% всех инфекций в регионе (сотни тысяч инфекций в целом), и является доминирующим вариантом ВИЧ-1 в большинстве постсоветских государств. Факты того, что это распространение произошло и происходит уже после распада СССР и этот вариант практически отсутствует в других странах мира (единичные случаи), свидетельствуют о том, что территория бывшего СССР остается единым эпидемиологическим пространством.

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ ИММУНОГЛОБУЛИНЫ – НОВЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

Одинцова Е.С., Баранова С.В., Зубкова А.Д., Седых С.Е., Долгушин С.А., Бунева В.Н., Невинский Г.А.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Введение. Важной задачей современной медицины является поиск новых маркеров вирусных и аутоиммунных патологий. Выявление новых маркеров ВИЧ/СПИД позволит разработать новые подходы к диагностике и персонализованной терапии. В настоящей работе нами изучена корреляция клинических симптомов ВИЧ/СПИД с содержанием в крови пациентов антител против различных антигенов, а также каталитически активных антител.

Цель и задачи. Детальное исследование каталитических свойств протеолитических иммуноглобулинов против гистонов, а также основного белка миелина. Сравнение со свойствами классических протеаз и протеолитических иммуноглобулинов при других заболеваниях.

Материалы и методы. Выделение иммуноглобулинов; исследование ферментативных свойств иммуноглобулинов (pH-зависимость, металл-зависимость, кинетические параметры гидролиза гистонов); установление типа протеолитической активности; определение субстратной специфичности антител; выделение специфических фракций антител с различным сродством к антигенам; поиск корреляций между биохимическими показателями и характером течения ВИЧ-инфекции.

Основные результаты. Показано, что сыворотка крови пациентов с ВИЧ/СПИД содержит аутоантитела против гистонов. Известно, что каталитически активные иммуноглобулины являются отличительными особенностями аутоиммунных заболеваний. В связи с этим был проведен анализ способности иммуноглобулинов крови при ВИЧ-инфекции гидролизовать гистоны человека. Электрофоретически и иммунологически гомогенные IgG были получены из сыворотки ВИЧ-инфицированных пациентов хроматографией на нескольких аффинных сорбентах. Согласно полученным результатам, все препараты IgG, выделенные из крови 32 ВИЧ-инфицированных пациентов, гидролизуют от одного до пяти гистонов человека. Интересно, что относительная эффективность гидролиза гистонов H1, H2a, H2b, H3, H4 значительно различается между разными донорами. Иммуноглобулины класса G сыворотки некоторых здоровых доноров также гидролизуют гистоны, но в среднем в 16 раз менее эффективно, чем иммуноглобулины крови при ВИЧ/СПИД. Как и протеолитические иммуноглобулины сыворотки пациентов с некоторыми аутоиммунными заболеваниями, гистон-гидролизующие иммуноглобулины при ВИЧ/СПИД ингибируются специфичными ингибиторами сериновых и металлопротеаз, но не ингибиторами тиоловых протеаз.

Заключение. Так как иммуноглобулины крови при ВИЧ/СПИД могут эффективно гидролизовать гистоны, нельзя исключить их отрицательный эффект на патогенез заболевания. Дальнейший анализ корреляции клинических симптомов с биохимическими особенностями протеолитических иммуноглобулинов позволит разработать новые подходы к диагностике и персонализованной терапии ВИЧ/СПИД.

Работа поддержана грантами РФФИ 16-34-00079 мол_а, 15-04-03245-а, 16-04-00604_а, а также грантом Президента МК-6187.2016.4.

КЛИНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЗНАЧИМОСТИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ТОКСОПЛАЗМОЗА

Бездверная Н.А., Лексикова Т.В.

БУЗ ВО «Воронежский областной клинический центр по профилактике и борьбе со СПИД», Воронеж, Россия

Введение. *Toxoplasma gondii* является облигатным внутриклеточным простейшим паразитом и вызывает зоонозную инфекцию, распространенную по всему миру. У здоровых иммунокомпетентных лиц токсоплазмоз протекает в виде бессимптомной латентной инфекции. У ВИЧ-инфицированных лиц *токсоплазма* вызывает тяжелую оппортунистическую инфекцию, приводящую к физической и психологической инвалидности. У пациентов с иммуносупрессией происходит реактивация паразита, если число лимфоцитов CD4 опускается ниже 200 клеток/мкл. Токсоплазменный энцефалит встречается у 10%-50% больных СПИДом, у которых выявляются антитела классов M и G к *токсоплазме*. Диагноз может быть подтвержден с помощью клинических, серологических, радиологи-

ческих, гистологических или молекулярных методов или комбинацией из них. Диагностика токсоплазмоза имеет большое значение для предотвращения развития тяжелых осложнений в виде церебрального токсоплазмоза у пациентов с ВИЧ-инфекцией.

Цель и задачи исследования. Целью исследования являлись выявление реактивации токсоплазмоза методом ПЦР у серопозитивных пациентов, а также клиническая оценка значимости молекулярной диагностики токсоплазмоза.

Материалы и методы исследования. На базе лаборатории ПЦР-диагностики центра было проведено исследование 1182 образцов пациентов, серопозитивных к *токсоплазме*, методом ПЦР с учётом результатов в «режиме реального времени» для выявления ДНК *Toxoplasma gondii*. Использовалась тест-система «АмплиСенс *Toxoplasma gondii*-FL» ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора с чувствительностью 400 копий/мл или 4 клетки/мл *Toxoplasma gondii*, на оборудовании CFX-96 BIO-RAD. Пробоподготовка образцов проводилась на реагентах «АмплиСенс ДНК-сорб Б». Обследование проводилось в двух группах пациентов.

Первую группу составили 792 человека: пациенты с ВИЧ-инфекцией в стадии СПИДа и с клиническими проявлениями токсоплазмоза (поражением ЦНС, лимфоузлов, изменениями гемограммы) или без них. Амбулаторно было обследовано 695 человек, у которых для исследования забиралась цельная кровь, также 97 пациентов находилось в стационарном отделении центра по тяжести состояния, у них также была забрана цельная кровь – 97 образцов – и 11 образцов ликвора.

Вторую группу составили 390 человек, не инфицированных *ВИЧ*. Из них – 308 детей возрастом до 1 месяца из отделения патологии новорожденных, у которых была забрана цельная кровь при подозрении на врожденный токсоплазмоз и наличии антител к *токсоплазме* у матери. А также 82 взрослых пациента из нейрососудистых и реанимационных отделений больниц с патологией ЦНС для исключения церебрального токсоплазмоза, у которых также забиралась цельная кровь (75 образцов) и ликвор (7 образцов).

Основные результаты. В первой группе из 792 образцов пациентов с ВИЧ-инфекцией было выявлено 2 положительных результата ДНК *Toxoplasma gondii* с высокой копийностью в цельной крови. Это были пациенты амбулаторного приема инфекциониста и находились в тяжелом состоянии, закончившемся у одного пациента летальным исходом в пределах пяти суток после обращения и забора анализов.

Во второй группе из 390 человек был выявлен 1 положительный результат ДНК *Toxoplasma gondii* с высокой копийностью в цельной крови. Этот образец был от взрослого пациента из реанимационного отделения больницы с патологией ЦНС для исключения церебрального токсоплазмоза. В дальнейшем у этого пациента был диагностирован *ВИЧ* в стадии СПИДа.

Выводы. Вероятность реактивации *Toxoplasma gondii* у иммунокомпетентных лиц маловероятна. При подозрении на токсоплазмоз необходимо выяснить ВИЧ-статус пациента.

Появление определяемых концентраций ДНК *Toxoplasma gondii* в периферической крови у пациентов с ВИЧ-инфекцией происходит в стадии СПИДа. Выявление ДНК *Toxoplasma gondii* служит верификацией диагноза и позволяет изменить прогноз в случае адекватной терапии.

Цельная кровь не является оптимальным материалом для исследования ДНК *Toxoplasma gondii* с целью исключения реактивации токсоплазмоза или выявления врожденного токсоплазмоза новорожденных.

ОДНОВРЕМЕННОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ РНК И ДНК ВИЧ-1 – КЛЕТОЧНО-АССОЦИИРОВАННАЯ РНК ВИЧ-1 КАК ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ МАРКЕР ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

Беликова А.В., Петров В.В., Киреев Д.Е.

ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение. Обнаружение ВИЧ-инфекции проводится диагностическими скрининговыми (ИФА), подтверждающими (ИБ) и молекулярно-биологическими (ПЦР) тестами. Молекулярно-биологические тесты отвечают за выявление нуклеиновых кислот – ДНК и РНК – прямых маркеров инфекции. ДНК-диагностика ВИЧ означает обнаружение провирусной ДНК ВИЧ-1 в клетках крови пациента, РНК-диагностика применяется для определения вирусной нагрузки (ВН) в плазме крови. Выявление одного или обоих прямых маркеров может быть связано со многими факторами: давности заражения, стадии и характера протекания ВИЧ-инфекции, особенностями вируса и пациента, опыта и успешности применения антиретровирусной терапии. Единственным зарегистрированным набором для одновременного определения РНК/ДНК ВИЧ-1 в России является Abbott RealTime HIV-1 Qualitative (Abbott Molecular, США), но используется либо плазма (можно определить только РНК), либо сухое пятно крови (обнаруживаются оба маркера, но при использовании такого вида биоматериала значительно снижена аналитическая и диагностическая чувствительности). Помимо провирусной ДНК ВИЧ-1 или РНК ВИЧ-1, в крови также можно обнаружить так называемую клеточно-ассоциированную РНК ВИЧ-1 (cell-associated HIV RNA, CA HIV RNA). Данный маркер даже может рассматриваться как самостоятельный для диагностики ВИЧ-инфекции. Клеточно-ассоциированную РНК ВИЧ-1 можно детектировать у пациентов с неопределяемым уровнем ВН в плазме крови – это пациенты с опытом успешной терапии и элитные контроллеры.

Цели и задачи. Целями данного исследования были: 1) клиническая апробация разрабатываемой методики одновременного выявления РНК/ДНК ВИЧ в

цельной крови; 2) обнаружение клеточно-ассоциированной РНК у пациентов на терапии с неопределяемым уровнем ВН.

Материалы и методы. Для данного исследования применяли: 1) образцы цельной крови от 55 пациентов Федерального научно-методического центра СПИДа, информация о терапии и результатах исследований вирусной нагрузки в плазме крови; 2) разрабатываемый набор реагентов для одновременного определения РНК/ДНК ВИЧ-1; 3) комплект реагентов «АмплиСенс® РИБО-преп» для выделения нуклеиновых кислот из клинического материала. Для анализа использовали 250 мкл крови для определения РНК/ДНК ВИЧ-1, для выявления только провирусной ДНК ВИЧ-1 в ПЦР-смесь не добавляли обратную транскриптазу.

Основные результаты. Всего исследовали 55 образцов крови, по одному от каждого пациента. Из них у 15 человек была детектируемая ВН, среди которых пациенты: 1) без опыта терапии; 2) с опытом терапии, в т.ч. с несколькими схемами лечения. Оставшиеся 40 образцов крови от пациентов с недетектируемой ВН в плазме крови изучили на наличие РНК/ДНК ВИЧ-1 и ДНК ВИЧ-1 в цельной крови методом ПЦР в реальном времени. Все эти пациенты на момент тестирования находились на терапии. У всех образцов обнаружили оба маркера и определили значение порогового цикла реакции (Ct). Далее для каждого образца вычислили значение ΔCt = Ct(ДНК ВИЧ-1) – Ct(РНК/ДНК ВИЧ-1). Для 17 образцов (42,5%) эта разница составляла более 2 циклов (из них у 8 образцов (20%) ΔCt > 2,5 ц.). А поскольку ВН недетектируема, то эта разница может быть обусловлена наличием клеточно-ассоциированной РНК ВИЧ-1.

Выводы. С помощью наборов реагентов для одновременного определения РНК/ДНК ВИЧ-1 у пациентов, находящихся на эффективной терапии и имеющих недетектируемую ВН в плазме, в цельной крови можно обнаружить не только провирусную ДНК ВИЧ-1, но и в некоторых случаях клеточно-ассоциированную РНК ВИЧ-1, которую можно рассматривать в виде дополнительного маркера ВИЧ-инфекции.

АНАЛИЗ ГЕНОМА ВАРИАНТА A_{FSU} ВИЧ-1, ДОМИНИРУЮЩЕГО НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ И СТРАН СНГ, НА ОСНОВАНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Громов К.Б.[2], Казеннова Е.В.[2], Киреев Д.Е.[1], Лаповок И.А.[1,2], Лопатухин А.Э.[1], Мурзакова А.В.[1], Бобкова М.Р.[2]

[1] ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия
[2] ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Введение. Молекулярный мониторинг эпидемии ВИЧ-инфекции в России и соседних странах проводится на продолжении многих лет. За это время было установлено, что с момента начала массовой эпидемии в 1996-98 гг. по настоящее время на всех указанных территориях доминирует (90-95%) один и тот же вариант подтипа А ВИЧ-1, имеющий происхождение из Республики Конго и получивший название A_{FSU} (IDU-A).

Анализ генома вирусов этого варианта, сосредоточенный в первую очередь на изучении относительно коротких последовательностей структурных генов *gag, pol* и *env*, позволил выявить ряд особенностей, определяющих уникальность вирусов, характерных для большинства случаев заражения в указанном регионе. В частности, были обнаружены специфические мутации в гене *pol* в позициях, ассоциированных с лекарственной устойчивостью вируса, и проявляющиеся в виде полиморфизмов.

Анализ полного генома ВИЧ-1 в странах бывшего СССР также проводили, однако этот вид исследований был сопряжен с большими методологическими усилиями и временными затратами, так как производился с применением частичного популяционного секвенирования и последующим наложением перекрывающихся последовательностей.

В последние годы в распоряжении исследователей появились новые возможности, связанные с внедрением методологии секвенирования нового поколения (NGS), которая позволяет в короткие сроки анализировать практически полный геном ВИЧ-1, включая области, кодирующие неструктурные белки – Tat и Rev (регуляторные) и Vpr, Vpu, Vif и Nef (вспомогательные). В данной работе был выполнен пилотный проект, посвященный отработке метода NGS для одновременного анализа десятков образцов ВИЧ. Для исследования были отобраны образцы, заведомо принадлежащие подтипу А, с целью получения информации по ранее не исследованным регионам генома уникального вируса A_{FSU}.

Цели исследования. Целью настоящего исследования было выявление особенностей генома варианта A_{FSU} ВИЧ-1, доминирующего на всей территории стран бывшего СССР, в сравнении с вариантами подтипа А1 из других регионов мира, с применением методов секвенирования нового поколения.

Материалы и методы. Для анализа использовали плазму крови от ВИЧ-инфицированных пациентов из разных регионов России, ранее идентифицированных как A_{FSU}. Секвенирование проводили с использованием прибора MiSeq («Illumina», США) и наборов MiSeq Reagent Kits V2. Схема амплификации представляла собой получение четырех перекрывающихся фрагментов ДНК, размером от 2637 до 2927 пар нуклеотидов, с использованием совмещенной ОТ-ПЦР с последующей «гнездовой» ПЦР. Библиотеки готовили с использованием протокола Nextera.

В среднем на один образец пришлось 440977 (350485 – 697746) прочтений, средняя глубина покрытия для отдельных позиций составила 6855 (3251 – 11815). Обработку данных полногеномного секвенирования, сборку генома и картирование чтений осуществляли с по-

мощью программы Trimmomatic и специализированного сборщика вариабельных вирусных геномов собственной разработки.

В результате анализа было получено 47 полногеномных последовательностей. К сравнению были добавлены из Genbank 54 полногеномных последовательности генома вирусов подтипа A1 ВИЧ-1, циркулирующих в странах бывшего СССР, а также последовательность EU861977, ранее позиционированная как родительский вариант для A_{FSU}, для более достоверной статистики, 36 последовательностей подтипа A1 из других стран мира и 22 последовательности подтипа B для формирования филогенетического древа. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью метода «ближайших соседей» с использованием пакета программ MEGA 6.06 (http://www.megasoftware.net). Предварительный анализ несовпадающих позиций генома ВИЧ-1 проводили с применением программы SimPlot, v. 3.5.1 (http://sray.med.som.jhmi.edu/SCRoftware/simplot/). Поиск единичных замен в составе генома ВИЧ-1 проводили с использованием интернет-ресурса HIV mutation browser (http://hivmut.org).

Основные результаты. На первом этапе исследования был выполнен филогенетический анализ полных последовательностей размером 9309 н.п. для подтверждения принадлежности к варианту A_{FSU} подтипа A1 всех анализированных последовательностей, включая взятые из GenBank. Все указанные последовательности образовывали общий кластер, изолированный от кластеров подтипов A1 и B и включающий предшественник A_{FSU} - EU861977.

На следующем этапе исследования полные геномные последовательности были разделены на фрагменты, соответствующие структурным и неструктурным генам ВИЧ-1 – *gag, pol, vif, vpr, tat, rev* и *vpu*. Для локализации фрагментов была использована референс-последовательность HXB2. Для отбора аминокислотных замен, типичных для генома A_{FSU}, был установлен критерий частоты встречаемости, равный 75%. В таблице приводятся данные, касающиеся положения и характера единичных аминокислотных замен в каждой из изученных областей генома по сравнению с референсом HXB2.

Заключение. По предварительным данным, во всех участках генома ВИЧ-1 обнаружены позиции, являющиеся характеристическими для варианта ВИЧ-1 A_{FSU}, то есть встречающиеся у подавляющего большинства вирусов. По литературным сведениям, часть из этих особенностей может быть связана с биологическими свойствами вирусов и патогенезом вызываемой ими ВИЧ-инфекции. В настоящее время проводится детальный анализ последовательностей неструктурных генов, а также разрабатываются подходы к выяснению влияния полиморфизма структурных генов A_{FSU} на характер ответа на антиретровирусную терапию.

Ген	Аминокислотные замены
vif	K91Q E134N Q136P I159E
tat	F32W Q54H G79R
rev	S8T E10A E32R R41Q L78I
vpr	T84V
vpu	A15V I16L M70V W76L
gag	V218A G381S Q386P T456S
pol (PR)	S37D/N V77I I93L
pol (RT)	V35I/T E36D I326V R358G E370A Q520K K530R K558R
pol (IN)	R20K L74I T124A G134N/D

СЛУЧАЙ СОЧЕТАНИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ НЕЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ С ПАРВОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Белых С.И., Плотникова О.И., Торовкова Т.В., Галич Е.А.

КГБУЗ «Алтайский краевой Центр по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями», Барнаул, Россия

К лабораторным критериям эффективности противоретровирусной терапии относятся определение в крови уровня CD4+лимфоцитов и концентрации РНК ВИЧ. Изменение вирусной нагрузки быстрее отражает эффективность либо неудачу в проведении лечения. Увеличение количества CD4+лимфоцитов на 100-200 клеток в мкл происходит у большинства пациентов за 48 недель лечения. Вместе с тем вирусологическая эффективность лечения может сопровождаться иммунологической неэффективностью. Причины подобного явления не совсем понятны.

Мы наблюдали больного ВИЧ-инфекцией, которому по иммунологическим показаниям была назначена противоретровирусная терапия. Перед назначением

терапии определялась вирусная нагрузка 4000 копий/мл, количество CD4+лимфоцитов – 130 клеток в мкл. Предыдущие, за 6 месяцев до этого, показатели вирусной нагрузки составляли 17000 копий/мл, количество CD4+лимфоцитов – 318 клеток в мкл. В процессе лечения количество копий РНК ВИЧ снизилось ниже определяемого уровня (<500 копий/мл) и оставалось неопределяемым либо определялось на уровне 500 копий/мл (однократно) в течение 18 месяцев. Количество CD4+лимфоцитов всё это время колебалось от 118 до 160 клеток в мкл (8 исследований в динамике). Дважды в течение этого периода определялся общий анализ крови, при этом в обоих анализах регистрировалась гранулоцитопения и анемия. Больному было проведено исследование на определение в крови ДНК *Parvovirus B19*. Для анализа использовались тест-системы «АмплиСенс *Parvovirus* B19-FL». Проведенное исследование позволило выявить у пациента ДНК *Parvovirus B19*. При повторном исследовании пациента, через 2 месяца, анализ показал отрицательный результат. В дальнейшем в течение полутора лет у больного наблюдался медленный рост числа CD4+ до 250 клеток в мкл при неопределяемом уровне вирусной нагрузки.

Данное наблюдение позволяет предположить возможную роль парвовирусной инфекции как в случаях недостаточной иммунологической эффективности лечения, так и при «спонтанном» снижении количества CD4+лимфоцитов.

АНАЛИЗ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ВИЧ-1 В РЕГИОНАХ ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ФЕДЕРАЛЬНОГО ОКРУГА

Котова В.О., Балахонцева Л.А., Троценко О.Е.

ФБУН «Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора, Хабаровск, Россия

Эпидемиологические особенности возникновения и распространения ВИЧ-инфекции в Дальневосточном федеральном округе (ДФО) обусловлены во многом специфической демографической ситуацией и географическим положением. В ДФО, как и в целом по Российской Федерации, продолжает увеличиваться число ВИЧ-инфицированных пациентов. На 01.01.2016 г. кумулятивное количество инфицированных, выявленных в ДВФО, возросло до 20977 человек, показатель пораженности населения ВИЧ-инфекцией составил 337,72 случая на 100 тысяч населения. Наиболее пораженными ВИЧ-инфекцией территориями являются Приморский и Хабаровский края, Магаданская область, Чукотский автономный округ. Наименее пораженной остается Еврейская автономная область. На 01.01.2016 г. на диспансерном учете состояло 11422 ВИЧ-инфицированных пациента ДВФО, 45% из которых находились в субклинической (3) стадии ВИЧ-инфекции. В последние годы существенно увеличился охват лечением ВИЧ-инфицированных пациентов ДВФО. Так, в целом по округу в 2015 году 4222 человека получали антиретровирусную терапию.

Цель исследования. Провести анализ распространенности генетических вариантов ВИЧ-1 и мутаций резистентности к ингибиторам протеазы (ИП), нуклеозидным и ненуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы (НИОТ, ННИОТ) среди ВИЧ-инфицированных пациентов, проживающих на территориях Дальневосточного федерального округа, получающих антиретровирусную терапию, и среди ВИЧ-инфицированных лиц, не имеющих опыта получения АРВП.

Материалы и методы исследования. Было проведено исследование 140 образцов плазмы крови от ВИЧ-инфицированных пациентов, проживающих на территории Дальневосточного федерального округа: из г. Хабаровска – 39 (27,9%) образцов, из Еврейской автономной области (ЕАО) – 35 (25,0%) образцов, Республики Саха (Якутия) – 27 (19,3%) образцов, Магаданской области – 14 (10,0%) образцов, из Амурской области – 11 (7,9%) образцов, Сахалинской области – 10 (7,1%) образцов и из Чукотского автономного округа (ЧАО) – 4 (2,9%) образца. Средний возраст участников исследования составил 36±3,2 года. Среди обследованных преобладали лица мужского пола – 65,0% (91 чел.). На момент забора крови 49 пациентов находились на лечении антиретровирусными препаратами, 1 пациент терапию прервал, 90 пациентам АРВП не назначалась. Мутации резистентности выявляли методом секвенирования амплифицированных фрагментов гена *pol*, кодирующего протеазу и часть обратной транскриптазы ВИЧ-1, с использованием тест-системы «АмплиСенс® HIV-Resist-Seq» (производства ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора) согласно инструкции производителя. Секвенирование очищенных фрагментов проводилось с помощью генетического анализатора Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies, США). Субтипы ВИЧ-1 определяли с использованием референс-программы HIV db Program: Sequence Analysis и программ REGA HIV-1 Subtyping Tool (версия 2) (http://hivdb.stanford.edu).

Результаты исследования. В результате проведенных исследований все полученные консенсусные нуклеотидные последовательности были подвергнуты анализу с целью определения субтипа ВИЧ-1. Установлено, что среди ВИЧ-инфицированных лиц, постоянно проживающих на территории ДВФО, продолжает доминировать субтип A1, который был выявлен в 99 (70,7±3,8%) случаях. У 10 человек был определен субтип B (7,1±2,2%), у 5 (3,6±1,6%) – субтип C, у 2 (1,4±1,0%) человек – рекомбинантная форма CRF01_AE, в единичных случаях была выявлена рекомбинантная форма CRF03_AB (Республика Саха (Якутия)) и CRF11_cpx (Сахалинская область). В 22 (15,7±3,1%) случаях была выявлена рекомбинантная форма вируса подтипа A/G – CRF02_AG.

В результате проведенного анализа 90 нуклеотидных последовательностей гена обратной транскриптазы и гена протеазы ВИЧ, изолированных от ВИЧ-инфици-

рованных пациентов, не получавших АРВП, только в 1 (1,1±1,1%) случае была выявлена мутация K103N в гене обратной транскриптазы, которая обеспечивает резистентность высокого уровня к эфавирензу (EFV), невирапину (NVP). Все остальные выявленные мутации были отнесены либо к мутациям полиморфизма, либо к вторичным мутациям. Мутация A62V, характерная для субтипа A1, встречалась у 37 (41,1±5,2%) пациентов этой группы. Данная мутация связана с развитием устойчивости только при наличии мутации Q151M.

Среди 50 обследованных пациентов, получающих АРВТ, в 24 (48,0±7,1%) случаях была выявлена хотя бы одна мутация резистентности к какому-либо классу препаратов. Высокий уровень резистентности выявлен к препаратам группы нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (НИОТ): эмтрицитабину и ламивудину (по 42,0±7,0%) – и к препаратам группы ненуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (ННИОТ): невирапину и эфавиренцу (по 24,0±6,0%). Мутации, определяющие резистентность ВИЧ к препаратам НИОТ, обнаружены у 8 человек (16,0±5,2%), к препаратам группы ННИОТ – у 1 пациента (2,0±2,0%), к препаратам группы ингибиторов протеазы (ИП) – у 1 человека (2,0±2,0%). У 14 пациентов (28,0±6,3%) выявлен штамм ВИЧ, резистентный сразу к двум классам препаратов – нуклеозидным и ненуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы. В 22 (44,0±7,0%) случаях идентифицирована мутация M184V, которая является причиной высокого уровня резистентности к ламивудину, эмтрицитабину.

Мутации в гене протеазы, в основном, были представлены минорными (вторичными) мутациями. Только в одном случае нами была выявлена мутация I54V, которая вызывает низкий и средний уровень устойчивости ко всем препаратам группы ИП.

Выводы.

- На анализируемых территориях ДВФО по-прежнему доминирует субтип А ВИЧ-1. Отмечается распространение рекомбинантной формы A/G – CRF02_AG (15,7%).
- Первичная лекарственная устойчивость среди ВИЧ-инфицированных пациентов ДВФО составила 1,1%.
- Мутации резистентности выявлены у 24 (48,0%) ВИЧ-инфицированных пациентов, получающих антиретровирусную терапию. У 14 пациентов (28,0%) выявлен резистентный штамм ВИЧ сразу к двум классам препаратов – НИОТ и ННИОТ. Наиболее высокий уровень резистентности выявлен к препаратам группы НИОТ: эмтрицитабину и ламивудину – и к препаратам группы ННИОТ: невирапину и эфавиренцу. Мутаций, вызывающих высокий уровень устойчивости к препаратам группы ИП, не выявлено.

ПРИКЛАДНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ВИЧ-1, ПОЛУЧЕННЫХ НА ТЕСТ-СИСТЕМАХ «VIROSEQ HIV-1» И «АМПЛИСЕНС HIV-RESIST-SEQ», В КЛИНИКЕ И ЭПИДЕМИОЛОГИИ

Волова Л.Ю., Грезина Л.А., Горохов В.В.

ГБУЗ «Ямало-Ненецкий окружной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», Ноябрьск, Россия

Введение. За время, прошедшее с момента регистрации первого случая заражения ВИЧ в России в 1987 году, создана обширная сеть специализированных учреждений, занимающихся организацией профилактических мероприятий, эпидемиологического надзора и учета инфицированных, наблюдения и оказания всех видов медицинской помощи, включая специфическую противовирусную терапию и лабораторный контроль ее эффективности. Самые передовые технологии лабораторного анализа, включая молекулярные методы, стали рутинными и включены в алгоритмы текущего обследования всех ВИЧ-инфицированных пациентов. Это относится и к методу секвенирования генома ВИЧ, который используется в целях слежения за возникновением мутаций лекарственной устойчивости. Однако информация о нуклеотидной последовательности РНК-ВИЧ/кДНК-ВИЧ, получаемая в результате секвенирования генома ВИЧ, столь многогранна (как и любая другая генетическая информация), что анализируя ее с помощью различных on-line программ, можно получать прогностические данные, используемые не только для клинической практики, но и в процессе эпидемиологического анализа.

Цель и задачи. Максимально эффективно использовать результаты секвенирования генома ВИЧ-1. Освоить on-line-программы, позволяющие проводить всесторонний анализ нуклеотидной последовательности генома ВИЧ.

Материалы и методы. Материалом для проведения секвенирования генов ВИЧ-1 явились 610 образцов плазмы ВИЧ-инфицированных пациентов. Секвенирование генов ВИЧ-1 проводилось на генетических анализаторах ABI PRISM 310 и ABI PRISM 3500. Использовались тест-системы ViroSeq HIV-1 (производитель – «Abbot», США) и «АмплиСенс HIV-Resist-Seq» (производитель – ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия).

Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью компьютерных и on-line-программ: ViroSeqTM HIV-1, DEONA, COMET HIV-1, «geno2pheno», MEGA 3.1.

Основные результаты. Всего методом секвенирования ВИЧ-1 исследовано 610 образцов плазмы от 404 пациентов.

С помощью программ ViroSeqTM HIV-1 и DEONA в исследуемых образцах выявлены мутации резистентности к антиретровирусным препаратам. К НИ – в 16,9% случаев; к ННИ – в 20,2% случаев; к ИП – в 3,8% случаев; к ИИ – в 0,03% случаев. Полученные результаты учтены при назначении и изменении схем АРВТ.

Таблица. Количество образцов, прошедших секвенирование генов ВИЧ-1

№	Мишени	Количество образцов, просеквенированных ViroSeqTM HIV-1 (2005-2012 гг.)	Количество образцов, просеквенированных «АмплиСенс HIV-Resist-Seq»	Всего
		2005-2012 гг.	2013-2016 гг.	2005-2016 гг.
1	Целый ген протеазы (pro)	458	152	610
2	2/3 гена обратной транскриптазы (rev)	458	152	610
3	Целый ген интегразы (int)	0	80	80
4	V3-петля гена белка оболочки (env)	0	146	146

С помощью on-line-программы COMET HIV-1 определены подтипы ВИЧ-1 у 378 пациентов. При этом на территории ЯНАО выявлены следующие подтипы ВИЧ-1: подтип А1 – 89,9% (363 образца); подтип В 3,7% – 15 образцов; а также рекомбинантные формы: CRF03_AB – 4% (16 образцов), CRF02_AG – 1,5% (6 образцов), CRF01_AE – 0,5% (2 образца), CRF63_02A1 – 0,5% (2 образца).

На основании полученных данных проведен молекулярно-эпидемиологический анализ генетических вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в различных этнических группах на территории Ямало-Ненецкого автономного округа, что позволило воспроизвести динамику распространения различных генетических вариантов ВИЧ-1 на территории и построить генетическую модель эпидемии ВИЧ-инфекции в ЯНАО.

С помощью программы «geno2pheno» тропность ВИЧ-1 определена у 146 пациентов. У 9,6% (14 человек) обследуемых выявлены CXCR4-тропные вирусы; у 90,4% (132 человека) – CCR5-тропные варианты вируса. Выявление синцитий-образующих CXCR4-тропных вирусов позволило своевременно заподозрить клинически неблагоприятное течение ВИЧ-инфекции.

Данные генотипирования и филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1, проведенного с помощью программы MEGA 3.1, были использованы в качестве дополнительного инструмента при проведении сложных эпидемиологических расследований случаев ВИЧ-инфекции. По результатам филогенетического анализа расшифровано 8 эпидочагов, в том числе случай медицинской аварии, 3 семейных очага ВИЧ-инфекции, 4 случая половой передачи ВИЧ. Также в 2016 году молекулярно-генетический анализ был применен в рамках судебной экспертизы по уголовному делу об умышленном заражении 6 женщин.

Заключение/выводы. Информация о строении нуклеотидной последовательности генома ВИЧ-1, получаемая на основе секвенирования, позволила нам не только выявлять мутации резистентности и оптимизировать схемы АРВТ в случае выявления полирезистентных штаммов ВИЧ, но и определять тропность ВИЧ с целью прогнозирования тяжести клинического течения заболевания, а также определять подтип и устанавливать генетическое родство штаммов ВИЧ для выявления эпидемиологической связи инфицированных пациентов.

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ПЕРВИЧНОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ВИЧ-1 В ХАБАРОВСКОМ КРАЕ

Воронцова Г.А., Кузнецова А.В., Сысолетина И.П., Григорьева Л.Н., Бутакова А.Е., Лойфман Е.А.

КГБУЗ «Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями» Министерства здравоохранения Хабаровского края, Хабаровск, Россия

Введение. Современная антиретровирусная терапия (АРВТ) применяется на территории Хабаровского края более 10 лет, улучшая качество жизни ВИЧ-инфицированных. В то же время растет уровень резистентных штаммов, циркулирующих в популяции ВИЧ-инфицированных больных, накапливаются мутации устойчивости к разным группам препаратов. Согласно методическим рекомендациям МР 3.1.1. 0075/1-13 «Надзор за распространением штаммов ВИЧ, резистентных к антиретровирусным препаратам», Роспотребнадзор, 2013, осуществляется надзор за резистентностью ВИЧ.

Цель и задачи. Определить уровень распространенности первичной резистентности к АРВТ среди недавно ВИЧ-инфицированных пациентов и передающихся мутаций резистентности в генах протеазы, обратной транскриптазы и интегразы.

Материалы и методы. С июня по декабрь 2016 года первичная резистентность была проанализирована в 35 образцах крови от ВИЧ-инфицированных пациентов, из них 18 – находящихся в периоде инкубации, критериями установления которого являлись два положительных результата ИФА на ВИЧ в состоянии с положительным или отрицательным результатом тестирования на р 24, отрицательным или неопределенным иммунным блотом, при положительном анализе на РНК ВИЧ и наличии вирусной нагрузки ВИЧ. В 17 случаях были отобраны образцы плазмы в период сероконверсии (период перехода неопределенного блота в положительный составил от 2 недель до 3,5 месяца). Уровень вирусной нагрузки варьировал от 310 до 460 000 коп/мл.

Среди пациентов, включенных в исследование, 68,5% составляли мужчины. У 18 пациентов – половой

путь передачи, 13 – внутривенные наркоманы, у 4 путь передачи не дифференцирован. Возраст пациентов – от 22 до 47 лет.

Лекарственную устойчивость ВИЧ к препаратам классов НИОТ, ННИОТ, ИП и ИИ определяли методом секвенирования участков генов протеазы, обратной транскриптазы и интегразы с помощью тест-системы «АмплиСенс HIV-Resist-Seq» (ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии»). Секвенирование фрагментов проводилось с помощью генетического анализатора ABI 3 500 (Applied Biosystems, США). Для анализа нуклеотидных последовательностей использовалось программное обеспечение «Деона» (ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора).

Основные результаты. Лекарственная устойчивость низкого уровня к одной из групп препаратов (ИП, НИОТ, ННИОТ) обнаружена у 9 из 35 недавно ВИЧ-инфицированных пациентов, что составило 25,7±7,4%, что соответствует высокому уровню распространенности первичной резистентности ВИЧ к АРВ-препаратам согласно классификации ВОЗ. Высокий уровень устойчивости ВИЧ к препарату из группы ННИОТ выявлен у одного больного (2,9±2,8%). Резистентность низкого уровня сразу к 2 группам препаратов (НИОТ и ННИОТ) выявлена также у одного больного (2,9±2,8%).

Частота встречаемости мутаций ВИЧ к ВААРТ у пациентов с первичной резистентностью (n=35)

Мутации к НИОТ	Абс.	%	Мутации к ННИОТ	Абс.	%	Мутации к ИП	Абс.	%
A67DN	2	5,7	E138A	6	7,0	L10FL	1	2,9
			V90I	1	2,9	K20IKL	1	2,9
			K101EK	1	2,9			
			V179D/E	2	5,7			

Снижение чувствительности к АРВТ у пациентов, недавно инфицированных ВИЧ, обусловлено несколькими мутациями. В 2 случаях выявлена мутация D67DN, которая в сочетании с A62V обусловила низкий уровень устойчивости к зидовудину и ставудину (НИОТ). Наиболее часто встречалась мутация E138A: в 3 случаях совместно с минорной мутацией A62V, в 1 – вместе с мутацией V90I, что обусловило низкий уровень устойчивости к рилпивирину (ННИОТ). У одного больного E138A в сочетании с K101EK вызвала повышение уровня устойчивости ко всей группе препаратов ННИОТ, вплоть до высокого к рилпивирину. В 1 случае зафиксированы сразу обе мутации E138A и D67DN, что привело к повышению резистентности у этого больного сразу к двум группам препаратов – ингибиторов обратной транскриптазы (НИОТ и ННИОТ). Только у одного пациента с минорными мутациями L10FL и K20IKN выявлен низкий уровень устойчивости к ИП (фосампренавиру, индиновиру и нелфиновиру).

У 26 пациентов штаммы ВИЧ-1 были полностью чувствительные ко всем группам препаратов. Но среди этих образцов выявлены следующие минорные мутации в гене обратной транскриптазы: A62V – наиболее частая (14 чел. – 54±9,8%), встречалась изолированно (10 чел.) либо в сочетании с V90I (3 чел.), с Y188DY (1 чел.). У 2 пациентов выделена мутация V179 DE (5,7±4,5%), которая приводит к повышению уровня устойчивости ко всей группе препаратов ННИОТ, у 1 – V106I. Выявлены и минорные мутации в гене протеазы: L10V, K20I, L10IL, I74S.

У 21 пациента из 35 определена резистентность ВИЧ к ингибиторам интегразы. Повышения уровня устойчивости к ИИ не наблюдалось ни у одного пациента.

Заключение. Уровень распространения первичной резистентности среди пациентов с неопределенными блотами и сероконвертов вырос до 25,7% по сравнению с 2014 годом (17,2%), что, возможно, говорит об увеличении количества резистентных штаммов, циркулирующих в популяции ВИЧ-инфицированных больных. В геномах ВИЧ чаще выявляются мутации, определяющие повышенную резистентность к препаратам группы ингибиторов обратной транскриптазы: ННИОТ: E138A (17%), V179 DE (5,7%) и НИОТ: D67DN (6%). При определении резистентности ВИЧ к ИИ у 21 пациента: все штаммы сохранили чувствительность к ИИ. С учетом малого объема выборки исследование будет продолжено.

Список используемой литературы

1. Методические рекомендации Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 20 августа 2013 г. № МР 3.1.1.0075/1-13 «Надзор за распространением штаммов ВИЧ, резистентных к антиретровирусным препаратам» // Официальный сайт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – Режим доступа: http://rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=1405&sphrase_i d=402946.

2. Методические рекомендации по анализу и интерпретации результатов исследования, проведенного с использованием реагентов для определения тропизма и выявления мутаций устойчивости вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) к антиретровирусным препаратам в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим секвенированием продуктов амплификации «АмплиСенс HIV-Resist – Seq». Список мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ. – М.: Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии», 2015. – С. 14-20.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ ВИЧ-1, ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ В РЕСПУБЛИКЕ ТАДЖИКИСТАН

Каримов С.С.[2], Астахова Е.М.[1], Ивлев В.В.[1], Сайбурхонов Д.С.[2], Гашникова М.П.[1], Исматова Л.[2], Нурляминова З.[2], Тотменин А.В.[1], Гашникова Н.М.[1]

[1] ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, Россия
[2] Государственное учреждение «Республиканский центр по профилактике и борьбе со СПИД» Министерства здравоохранения и социальной защиты населения Республики Таджикистан, Душанбе, Таджикистан

Введение. Республика Таджикистан (РТ) относится к территориям с низкой распространенностью ВИЧ-1. На 30.06.2016 число людей, живущих с ВИЧ, составило 6425 человек, из них 68,3% мужчин и 31,7% женщин. В РТ 69,4% случаев ВИЧ выявляется среди лиц возрастной категории 19-39 лет. С начала 2000-х в РТ значительно изменилось соотношение путей передачи ВИЧ: зарегистрировано снижение количества людей, инфицированных при употреблении инъекционных наркотических препаратов, с 84,4% в 2004 г. до 16,7% в 2016 г., в то же время наблюдается рост инфицирования при гетеросексуальных контактах с 15,6% до 62,5%. ВИЧ-инфекция выявляется на всех территориях РТ, наибольшее число ВИЧ-инфицированных лиц проживает в Душанбе. В 2015 г. в РТ было выявлено 1151 ВИЧ-инфицированных, причем 14,3% из этого количества являлись трудовыми мигрантами. РТ граничит с Афганистаном, Узбекистаном, Кыргызстаном и Китаем. Изучение вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в РТ, до настоящего времени не проводились.

Цель и задачи. Целью данной работы являлось изучение разнообразия и представленности генетических вариантов ВИЧ-1 в РТ.

Материалы и методы. В исследование вовлечены 111 человек с диагнозом «ВИЧ-инфекция», проживающих в РТ. Образцы периферической крови ВИЧ-инфицированных лиц были собраны специалистами РЦ СПИД МЗ РТ. Клинические образцы были связаны с демографическими и клиническими данными пациентов посредством анонимных кодированных номеров. Для каждого образца с помощью разработанного лабораторного набора праймеров были получены фрагменты генома ВИЧ-1, кодирующие область протеазы-ревертазы (PR-RT, протяженностью 1400 нт.) и область интегразы (IN, 960 нт.). Определение нуклеотидной последовательности ВИЧ-1 проводили на автоматическом секвенаторе 3130xl (AppliedBiosystems, США). Все расшифрованные фрагменты pol были собраны с помощью программы Sequencher 4.1 software (Gene Codes Corporation, AnnArbor, MI, USA). Собранные последовательности фрагментов pol сравнивались с соответствующими референс-последовательностями различных субтипов и рекомбинантных форм ВИЧ-1 из международной базы данных (LosAlamosHIV-1 database) с применением программ ClustalWMultiplealignment и BioEditsoftware. Филогенетический анализ выполняли с помощью MEGA 6.0.6, используя метод объединения ближайших соседей (neighbor-joiningmethod,NJ) с бутстрепом 1,000 повторов на основе двухпараметрической модели Кимуры. Статистическую значимость топологии филогенетического дерева оценивали с помощью анализа бутстрепов. Рекомбинационный анализ выполняли с использованием Simplot v 3.5.1 с шагом 200 нт, возможный мозаицизм выявленных уникальных рекомбинантных форм (URF) ВИЧ-1 исследовали с помощью программы jpHMM.

Основные результаты. Из 111 лиц, вовлеченных в исследование, 40,5% являлись жителями города Душанбе, 18,9% – районов Рудаки и 17,1% – Вахдатского, 10,8% проживали в городе Турсунзаде, в 12,7% случаев образцы получены от лиц, проживающих на других территориях РТ. Трем пациентам (2,7%) диагноз «ВИЧ-инфекция» был поставлен в 2004 г., 25,2% ВИЧ+ лиц было выявлено с 2007 по 2011 г., 55,9% – с 2012 по 2016 г. Исследуемая выборка включала 49 (55,2%) женщин, 40 (36%) мужчин и 22 (19,8%) ребенка; 27% взрослых лиц было инфицировано при употреблении наркотических препаратов, 66,3% – при гетеросексуальных контактах, в 6,7% случаев путь инфицирования не установлен.

Генотипирование по двум областям генома (IN, PR-RT) ВИЧ-1 выявило в 48 случаях CRF02_AG (43,2%), в 40 случаях (36,0%) субтип А – специфический для России подсубтип А1 или A_{FSU}. Все варианты ВИЧ-1 CRF02_AG ВИЧ-1 объединялись в подкластер с CRF02_AG ВИЧ-1, выделенных на территориях стран Средней Азии (в Узбекистане, Кыргызстане, Казахстане). Филогенетический анализ выявил некоторые эпидемические сети, подтверждающие, что ВИЧ-инфекция в РТ частично распространяется в рамках локальных эпидемических очагов. Кроме того, в 2 клинических образцах обнаружен специфический российский вариант CRF63_02A1 (1,8%), широко распространенный в ряде сибирских регионов России. В единичных случаях зарегистрированы ВИЧ-1 субтипа В (0,9%), субтипа С (0,9%).

Не менее чем 17,1% исследованных вариантов вируса было отнесено к уникальным рекомбинантным формам ВИЧ-1, в том числе URFAD (0,9%), URFAB (0,9%), 5 вариантов различных URF63_A1 (4,5%, мозаичные геномы ВИЧ-1, частично идентичные субтипу А, частично – CRF63_02A1) и 12 образцов ВИЧ-1 – к новым рекомбинантным формам на основе CRF02_AG и субтипа А (URF02_A1) ВИЧ-1 (10,8%). Варианты ВИЧ-1 субтипов В, С, большинство обнаруженных рекомбинантных форм CRF63_02A1, URFAD, URFAB, URF02A1, URF63_A1 были выделены от женщин (9) и мужчин (2), инфицированных при гетеросексуальных контактах, с ВИЧ-инфекцией, диагностированной в 2011-2016 годах. Лишь в четырех случаях новые URF ВИЧ-1 были найдены у ПИН, выявленных в тот же период времени, а также в двух случаях – при вертикальном инфицировании и в двух случаях путь инфицирования не был установлен. Циркуляция URF ВИЧ-1 была подтверждена на 6 исследованных территориях РТ. Для

вариантов вируса субтипа А или CRF02_AG не было выявлено периода преимущественного обнаружения среди лиц, вовлеченных в данное исследование, – оба геновариант ВИЧ-1 выявлялись с 2004 по 2016 год.

Заключение. Впервые исследовано генетическое разнообразие ВИЧ-1, распространяющихся в Республике Таджикистан. Показано, что на центральной территории страны выявляется гетерогенная популяция ВИЧ-1, генетически близкая к вирусам, циркулирующим в других странах Средней Азии и в России, но не в Афганистане и Китае. Основными генетическими вариантами, доминирующими в РТ, являются ВИЧ-1, относящиеся к среднеазиатскому кластеру рекомбинантной формы CRF02_AG и к российскому субтипу А1. Генотипирование по двум областям генома вируса позволило не менее чем в 17% случаев выявить новые уникальные рекомбинантные формы ВИЧ-1, выделенные от лиц с ВИЧ-инфекцией, диагностированной после 2010 года. Данные факты указывают на то, что в Республике Таджикистан отмечается общая для многих территорий мира тенденция к увеличению генетического разнообразия циркулирующих ВИЧ-1 за счет появления новых рекомбинантных форм ВИЧ-1. Выполненный молекулярно-эпидемический анализ ситуации позволяет заключить, что в Таджикистане существует ряд факторов, способствующих усугублению современной ситуации: одновременная циркуляция отличающихся генетических вариантов ВИЧ-1, вероятно, распространенная практика незащищенных половых контактов, способствующая повторному инфицированию ВИЧ-1, большие потоки трудовых мигрантов в соседние государства.

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА НЕСТРУКТУРНЫХ ГЕНОВ ВИЧ-1 *VIF* И *REV*

Громов К.Б.[2], Лага В.Ю.[2], Мурзакова А.В.[1], Киреев Д.Е.[1]

[1] ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия
[2] ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Введение. Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), относящийся к семейству ретровирусов, имеет уникальное строение генома, заключающееся в наличии системы регуляторных и вспомогательных генов *vif, vpr, tat, rev, nef, vpu*. Эти гены оказывают выраженное влияние на скорость репродукции вируса и его инфекционные свойства, играя основную роль в патогенезе ВИЧ-инфекции и взаимодействии вируса с иммунной системой человека. Изучение структурных особенностей регуляторных генов является важной задачей для понимания механизмов ВИЧ-инфекции, так как изменения белков, кодируемых этими генами, могут влиять на характер течения и передачи заболевания.

Вопрос о влиянии полиморфизма этих генов, в частности, наличии различий между подтипами ВИЧ, мало изучен, и в литературе можно найти лишь отдельные упоминания о единичных заменах генома ВИЧ в составе указанных генов и их связи с характером инфекции. Известно, что в России сложилась уникальная эпидемиологическая ситуация с абсолютным доминированием одного и того же генетического варианта подтипа А ВИЧ-1 – A_{FSU}. Ранее нами было показано, что этот вариант имеет значительные отличия в составе структурных генов *gag*, *pol* и *env*, однако неструктурные гены детальному анализу никогда не подвергались.

В данной работе приводятся результаты начальных этапов исследования, посвященного этой проблеме. Для исследования были выбраны два гена – ген *rev*, кодирующий регуляторный белок Rev, задействованный на этапе сплайсинга РНК ВИЧ, и ген *vif*, кодирующий вспомогательный белок Vif, выполняющий несколько функций на разных этапах размножения вируса в клетке и формирования иммунного ответа.

Цели и задачи. Анализировать неструктурные гены ВИЧ-1 *vif* и *rev* варианта A_{FSU} подтипа А, характерного для эпидемии ВИЧ-инфекции в России, выявить их особенности и попытаться связать их с имеющимися в литературе данными о влиянии этих особенностей на биологические и патогенетические свойства вируса.

Материалы и методы. Анализ последовательностей РНК ВИЧ-1 проводили с применением технологии секвенирования MiSeq («Illumina», США) и наборов MiSeq Reagent Kits V2. Для анализа использовали плазму крови от ВИЧ-инфицированных пациентов из разных регионов России, ранее идентифицированных как A_{FSU}.

В результате анализа было получено 47 полногеномных последовательностей вирусов A_{FSU}. В сравнении также участвовали 54 полногеномных последовательности генома вирусов подтипа А1 ВИЧ-1, циркулирующих в странах бывшего СССР, добавленные из Genbank. Предварительный анализ несовпадающих позиций генома ВИЧ-1 проводили с применением программы SimPlot, v. 3.5.1 (http://sray.med.som.jhmi.edu/SCRoftware/simplot/). Поиск единичных замен в составе генома ВИЧ-1 проводили с использованием интернет-ресурса HIV mutation browser (http://hivmut.org). Сравнение проводили с последовательностями референс-штамма HXB2 (подтип В), а также с консенсусной последовательностью вирусов подтипа А, полученной из GenBank.

Результаты. В составе вирусов A_{FSU} в последовательностях, кодирующих ген *vif*, были обнаружены 12 нуклеотидных замен, из которых 4 были несинонимичными, то есть приводили к замене аминокислот K91Q, E134N, Q136P и I159E по сравнению с HXB2. В тех же позициях консенсусного генома вируса подтипа А также встречались замены, однако характер их отличался от замен в геноме A_{FSU}. По данным литературы (De Maio FA, 2011), наличие мутации Q136P ассоциировано с ускоренным наступлением стадии СПИД у новорожденных детей. У

вирусов A_{FSU} эта мутация встречалась в 80,6% случаев. О других мутациях пока сведений не обнаружено.

В последовательностях, кодирующих белок Rev, у вирусов A_{FSU} были обнаружены 7 нуклеотидных замен, из которых 5 оказались несинонимичными (S8T, E10A, E32R, R41Q и L78I). Согласно исследованиям (Edgcomb SP, 2008), присутствие мутации L78I в гене *rev* отрицательно сказывается на экспорте сплайсированных РНК из ядра клетки, продуцирующей вирус. Для A_{FSU} эта мутация была характеристической (93,7%). Информации об остальных мутациях в литературе пока нет.

Заключение. В областях генов *rev* и *vif* вирусов варианта ВИЧ-1, типичного для большинства случаев заражения в России и соседних странах, в ходе пилотного исследования выявлены отличия от референс-штамма, а также от других вариантов того же подтипа А, потенциально способных влиять на размножение вируса и характер течения инфекции. Дальнейшее изучение генома ВИЧ-1 типичных для России вариантов с применением современных методов полногеномного анализа позволит получить новые сведения и запланировать исследования, направленные на выяснение истинной роли полиморфизмов неструктурных белков ВИЧ-1.

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ R5 (NSI/M)- И X4 (SI/T)-ТРОПНЫХ ВИРУСОВ В ПОПУЛЯЦИИ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ

Еремин В.Ф., Гасич Е.Л., Сосинович С.В., Дрозд А.М.

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Введение. По данным официальной статистики, на 1 января 2017 г. в Республике Беларусь зарегистрировано 22218 случаев ВИЧ-инфекции, а за 2016 год выявлено 2391 ВИЧ-инфицированный, что на 86 новых случаев больше, чем в 2015 году.

Цели и задачи. Определить распространенность R5- и X4-тропных вирусов у впервые выявленных пациентов с ВИЧ/СПИД:

- провести секвенирование по участку V3 петли gp120;

- определить частоту встречаемости R5- и X4-тропных вариантов ВИЧ-1;

- выявить Si и NSI варианты ВИЧ-1.

Материалы и методы. 126 образцов сыворотки/плазмы крови из разных регионов республики: из Минска и области – 74 (58,8%), из Могилевской области – 18 (14,3%), из Гомельской – 13 (10,3%), из Брестской и Витебской по 9 (7,1%), из Гродненской – 3 (2,4%).

55 образцов сыворотки/плазмы крови было получено от лиц женского пола и 71 – от пациентов-мужчин. 90 пациентов являлись внутривенными потребителями наркотиков (ПИН), 33 заразились при гетеро-, гомосексуальных контактах и 3 ребенка были рождены ВИЧ-инфицированными матерями.

Иммуноферментный анализ осуществляли на тест-системе «КомбиБест ВИЧ-1,2 АГ/АТ» производства ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирская область, п. Кольцово, АБК, Россия.

РТ-ПЦР проводили на тест-системах производства ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирская область, п. Кольцово, в соответствии с прилагаемой инструкцией. Исследования проводили на амплификаторе CFX96 BioRad, США.

Для генотипирования по участкам генов gag/env использовали зарегистрированную на территории Республики Беларусь тест-систему «Бел РНК/ДНК-ВИЧ (gag/env)» (Регистрационное удостоверение № ИМ-7.95957/1601, годна до 04.01.2021 года).

Анализ полученных фрагментов проводили с использованием программных продуктов «Sequencing Analysis Software v.5.1.1», BioEdit, SeqScape v.3.

Для определения R5- и/или X4-тропных вариантов ВИЧ использовали программу geno2pheno v.3. Значение FPR (false positive rate) – величина, определяющая вероятность, с которой R5- тропный вирус будет ложно определен как X4-тропный. R5-тропным считался образец при наличии показателя FPR, равного и более 20%. При величине FPR менее 20% образцы считались X4-тропными и/или R5/X4, т.е. с двойным тропизмом.

Филогенетический анализ полученных фрагментов осуществляли с помощью программы Mega6 (деревья с корнем построены методом присоединения соседей – neighbor-joining method – анализа с количеством повторов 1050, моделью Kimura-2, статистическую обработку осуществляли с помощью бутстреп-метода).

Результаты. Как показали результаты филогенетического анализа, проведенного по участкам генов gag, pol и env, из 126 секвенированных образцов ДНК ВИЧ 105 (83,2%) относились к субтипу A1, 6 (4,8%) – к B, 4 (3,2%) – к G, 6 (4,8%) – к CRF03_AB, 3 (2,4%) – к CRF02_AG и по одному образцу (0,8%) к CRF06_cpx и URF.

Для определения R5- и X4-тропных вариантов ВИЧ использовали секвенированные по участку V3 петли белка gp120 гена env фрагменты длиной 247 п.о.

В результате проведенных исследований было установлено, что 96 – (76,2%) образцов имели R5-тропные варианты ВИЧ, а 30 (23,8%) – X4-тропные варианты вируса. Среди X4-тропных доминировал A1 субтип ВИЧ – 25 (83,3%), CRF03_AB – 3 (10%), B и URF – по 1 (3,3%).

По значениям FPR 17 (13,5%) X4-тропных образцов находились в пределах от 0 до 10%, 13 (10,3%) – 10-20%, т.е. вирусы данной группы являются T-тропными или T- и M-тропными и могут использовать CXCR4- и/или CXCR4/CCR5-корецепторы для проникновения в чувствительные клетки, таблица 1. Среди R5-тропных вариантов ВИЧ 18 (14,3%) находились в пограничных значениях FPR – 20-30%, а 78 изолятов – в пределах от 30 и до >60%, что определяло их как «чистые» CCR5-тропные вирусы, чувствительные к маровироку.

Известно, что V3 регион белка gp120 гена env определяет не только тропность ВИЧ к T- и/или M-клеткам, но

и позволяет предсказать биологические свойства вируса: синцитиеобразущий (SI) или не образующий синцитии (NSI) вариант. Для определения вариантов ВИЧ с разными биологическими свойствами мы отобрали 38 аминокислотных последовательностей X4-тропных (13) и R5-тропных (25) изолятов ВИЧ.

Как показали проведенные исследования, у 6 (46,2%) из 13 проанализированных последовательностей X4-тропных вирусов в положении 11 и 25 V3 петли gp120 имелись аминокислотные замены, определяющие вирусы, как образующие синцитии (SI) с высоким уровнем репликативной активности, T-тропные: у изолята 410Gr, подтип B, в положении 25 D на N, у PV_41 – A1, в положении 11 S на R, у изолята HIV 17_AB – CRF03_AB, в положении 11 S на G и в 25 D на G, у изолята PV_32 – A1, в положении 25 D на V, у изолята Mn_21 – URF, в положении 25 D на G и, наконец, у изолята HIV_250 – A1, в положении 25 D на G. Остальные X4-тропные вирусы оказались несинцитиеобразующими (NSI) с низкой репликативной активностью, T-тропными.

Среди R5-тропных вирусов все изоляты оказались несинцитиеобразующими с низкой репликативной активностью, M-тропными, что характерно для ВИЧ, изолированного от пациентов с ранними сроками инфицирования.

Определение вирусов с SI- и NSI-фенотипом, соответственно, M- и T-тропных вариантов ВИЧ имеет большое значение не только для назначения лекарственных препаратов – ингибиторов корецепторов, но и прогностическое, поскольку у пациентов с SI-свойствами ВИЧ наблюдается быстрый прогресс заболевания с плохим прогнозом.

МУТАЦИИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ, ВЫЯВЛЕННЫЕ У ПАЦИЕНТОВ, НАХОДЯЩИХСЯ НА ВААРТ

Еремин В.Ф., Гасич Е.Л., Сосинович С.В., Дрозд А.М.

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Введение. В настоящее время для ВИЧ-инфицированных пациентов нет альтернативы ВААРТ. Используемые для терапии схемы лечения позволяют значительно улучшить жизненный статус пациентов и дают возможность пациентам работать, создавать семьи, рожать и воспитывать детей. Вместе с тем известно, что из-за высокой степени генетической изменчивости вируса в его геноме появляются мутации устойчивости к АРП, и своевременное выявление этих мутаций, назначение новых схем лечения имеет критическое значение для успешной терапии.

Цели и задачи. Определить мутации резистентности к препаратам АРТ:

- выявить мутации резистентности к НИОТ;
- определить мутации резистентности к ННИОТ;
- выявить мутации резистентности к ИП.

Материалы и методы. 528 образцов сыворотки/плазмы крови из всех регионов страны. Вирусную РНК выделяли из 500 мкл плазмы высокоскоростным центрифугированием при 21000-25000 g и 4-8 °C на высокоскоростной центрифуге Beckman CoulterJ-30i Avanti (США) с последующим лизированием осажденного вируса с использованием модуля для выделения РНК «ViroSeq™HIV-1, HIV-1 genotyping system v.2.0» (Abbott, США).

Определение мутаций резистентности проводили с использованием тест-системы ViroSeq™ HIV-1 genotyping (Abbott, США).

Анализ полученных фрагментов и определение мутаций резистентности ВИЧ к препаратам антиретровирусной терапии проводили с использованием коммерческой базы данных «ViroSeq HIV-1 genotyping system software v2.6 analysis» (Abbott, США) и базы данных Стэнфордского университета, а также с применением программных продуктов «Sequencing Analysis Software v.5.1.1», «BioEdit», «SeqScape».

Филогенетический анализ и построение деревьев проводили с применением программы MEGA6.

Результаты. За период с 2013 по август 2016 года в лабораторию поступило 528 образцов крови от пациентов, находящихся на высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ). 279/52,8% (190 от пациентов-мужчин и 89 – от женщин) поступило из г. Минска и Минской области, 103/19,5% (54 – от пациентов-мужчин и 49 – от лиц женского пола) – из Гомеля и Гомельской области, 62/11,7% – из Витебска и Витебской области (41 – пациенты мужского пола и 21 – женщины), 49/9,3 % – из Бреста и Брестской области (27 – пациенты женщины и 22 – мужчины), 30/5,7% – из Могилева и Могилевской области (17 – пациенты мужского пола и 13 – женщины) и из Гродно и Гродненской области поступило 5 проб от пациентов мужского пола. Из 528 ВИЧ-инфицированных 57 (30 мальчиков и 27 девочек) были дети в возрасте от 3 месяцев до 16 лет.

242 пробы после ПЦР были отобраны для проведения секвенирующей ПЦР и последующего секвенирования. Проведенное секвенирование и последующий филогенетический анализ позволил определить, что из 242 секвенированных образцов 225 (93%) относились к субтипу A1, 7 (2,9%) – к B, 5 (2,1%) – к CRF02_AG, 3 (1,2%) – к CRF03_AB и по 1 образцу (0,4%) – субтипам G и C, что в целом согласуется с ранее полученными нами данными.

Из 242 секвенированных образцов в 135 (55,8%) были выявлены мутации резистентности высокого уровня к разным классам соединений.

Чаще всего мутации резистентности высокого уровня выявлялись к ННИОТ невирапину (118/48,8%) и эфавиренсу (108/44,6%), а также к НИОТ ламивудину (99/40,91%) и эмприцитабину (96/39,7 %), а доминирующими мутациями были M184V и K103N. К другим препаратам этих классов мутации резистентности высокого уровня определялись гораздо реже.

Только у трех пациентов была выявлена устойчивость к фозампренавиру/r (FPV/r) и нельфинавиру (NFV), а к дарунавиру/r (DRV/r), саквинавиру/r (SQV/r) и типра-

навиру/r (TPV/r) ни у одного пациента не было выявлено мутаций резистентности.

Заключение. Для более глубокого анализа ситуации с появлением мутаций резистентности высокого уровня к отдельным классам препаратов необходимо наличие следующих данных: время инфицирования пациента; дата начала АРТ; схема АРТ; данные по СД4+ клеткам и вирусной нагрузке перед началом терапии; если схема менялась, то какова(ы) причина(ы) и данные новой схемы – все эти моменты необходимо отражать в направлениях.

ДИНАМИКА РЕЗУЛЬТАТОВ ЛАБОРАТОРНОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ ЛИЦ, УПОТРЕБЛЯЮЩИХ ИНЪЕКЦИОННЫЕ НАРКОТИКИ, НА ВИЧ КАК ОТРАЖЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ В ТАДЖИКИСТАНЕ

Каримов С.С., Абдухамедов Н.А., Сайбурхонов С.С.

Государственное учреждение «Республиканский центр по профилактике и борьбе со СПИД» Министерства здравоохранения и социальной защиты населения Республики Таджикистан, Душанбе, Таджикистан

Введение. Республика Таджикистан (РТ) относится к странам региона Восточная Европа и Центральная Азия (ВЕЦА), являющегося одним из немногих регионов в мире, в котором наблюдается прогрессирование эпидемии ВИЧ – увеличение оценочного числа новых случаев ВИЧ в 2000-2014 годах на 40% (1). В ВЕЦА за этот же период времени более чем в три раза увеличилось также число смертей в связи с ВИЧ и СПИД (1).

В Таджикистане изначально ведущим фактором распространения ВИЧ явилось немедицинское употребление людьми инъекционных наркотиков. В целях нейтрализующего воздействия на этот фактор в стране с начала 2000-х годов реализуются Программы снижения вреда (ПСВ), направленные на снижение риска инфицирования ВИЧ среди людей, употребляющих инъекционные наркотики (ЛУИН).

Одним из важных компонентов реализуемых в стране ПСВ является программа тестирования и консультирования ЛУИН на ВИЧ (2). ПСВ финансово поддерживаются Глобальным Фондом по борьбе со СПИДом, туберкулезом и малярией и Программой развития ООН в Таджикистане как результат успешного сотрудничества с ними Министерства здравоохранения и социальной защиты населения РТ (МЗ и СЗН РТ).

Результаты лабораторных исследований являются решающим моментом в комплексной диагностике ВИЧ, включающей также эпидемиологическое и клиническое обследование. Мониторинг и оценка результатов лабораторной диагностики ВИЧ в динамике среди ключевых групп повышенного риска (ключевые группы), включая ЛУИН, вкупе с результатами эпидемиологического расследования новых случаев инфекции позволяют выявить тенденции развития эпидемии ВИЧ и провести эффективное планирование ближайших профилактических интервенций.

Цель и задачи. Цель – выявление тенденций эпидемии ВИЧ в Таджикистане для повышения эффективности ответных мер. Задачи: 1. Оценить в динамике уровень оказания ЛУИН услуг по снижению вреда (тестирование на ВИЧ, обмен шприцов); 2. Оценить в динамике результаты эпидемиологического расследования новых случаев ВИЧ по основным путям передачи (инъекционный, половой) и величины основных путей передачи по половой принадлежности.

Материалы и методы. Изучены и проанализированы отчётные данные за 2011-2015 годы государственного учреждения «Республиканский центр по профилактике и борьбе со СПИД» МЗ и СЗН РТ и данные других тематических официальных документов.

Основные результаты. Оценочное число ЛУИН в Таджикистане составило в 2014 году 23100 человек (3). В стране функционирует 51 пункт доверия для ЛУИН (ПД), в которых данной ключевой группе на бесплатной основе предоставляется ряд услуг в рамках ПСВ (обмен шприцов; информирование/образование/коммуникации, обеспечение презервативами). Тестирование и консультирование ЛУИН на ВИЧ проводится в функционирующих в стране центрах по профилактике и борьбе с СПИД, также бесплатно.

В таблице 1 приводятся в динамике результаты предоставления ЛУИН некоторых услуг в рамках ПСВ в сопоставлении с изменениями, наблюдаемыми в стране, в структуре основных путей передачи ВИЧ среди новых случаев инфекции (4).

Таблица 1. Результаты предоставления ЛУИН некоторых услуг по программам снижения вреда (обмен шприцов, тестирование на ВИЧ), динамика: 2011, 2013, 2015 гг. Таджикистан

Показатели	2011	2013	2015
Число ЛУИН, получивших услуги в ПД, в т.ч. обмен шприцов	**5700**	**9202**	**13 456**
Охват по отношению к оценочному числу ЛУИН	24,7%	39,8%	58,3%
Число ЛУИН, прошедших тестирование и консультирование на ВИЧ	**5362**	**9872**	**18 192**
Охват по отношению к оценочному числу ЛУИН	23,2%	42,7%	78,8%
Новые случаи ВИЧ среди ЛУИН	**412**	**239**	**246**

Показатели	2011	2013	2015
Доля инъекционного пути передачи среди новых случаев ВИЧ (жен., муж.) (основа – немедицинское употребление людьми инъекционных наркотиков)	**41,7%**	**27,3%**	**21,3%**
Доля инъекционного пути передачи среди новых случаев ВИЧ у женщин	4,9%	4,6%	3,9%
Доля инъекционного пути передачи среди новых случаев ВИЧ у мужчин	56,6%	42%	33,1%
Доля полового пути передачи среди новых случаев ВИЧ (жен., муж.)	**37,7%**	**57,5%**	**61,7%**
Доля полового пути передачи среди новых случаев ВИЧ у женщин	68,5%	80%	75%
Доля полового пути передачи среди новых случаев ВИЧ у мужчин	25,2%	43%	52,8%

Данные таблицы 1 показывают в динамике более чем трехкратное увеличение охвата ЛУИН лабораторным обследованием на ВИЧ, более чем двукратное увеличение охвата ЛУИН услугами по программе обмена шприцов. В динамике наблюдается заметное уменьшение числа новых случаев ВИЧ среди ЛУИН, почти двукратное уменьшение доли инъекционного пути передачи ВИЧ. Доминирующим путем передачи ВИЧ в настоящее время у мужчин и, как прежде, у женщин, является половой.

Заключение и выводы. В Таджикистане имеется прогресс в реализации ПСВ, выражающийся в уменьшении заболеваемости ЛУИН ВИЧ-инфекцией. Одной из тенденций развивающегося эпидемического процесса в стране является выход на первый план полового пути передачи ВИЧ, могущего указывать на распространение инфекции среди других групп населения. Этот факт диктует необходимость усиления профилактических мер против ВИЧ среди всех групп населения, включая информационно-образовательные с использованием стратегической коммуникации для изменения поведения. Необходимо при этом продолжать и развивать ПСВ, чтобы исключить рецидив имевшей ранее место высокой заболеваемости ЛУИН ВИЧ.

Литература

1. Объединенная программа ООН по ВИЧ/СПИД. – http://www.unaids.org/ru/resources/

2. Каримов С.С., Абдухамедов Н.А., Рузиев М.М., Сайбурхонов Д.С. и др. Программы снижения вреда в Таджикистане: результаты и задачи по дальнейшему снижению заболеваемости ВИЧ среди людей, употребляющих инъекционные наркотики. Тезисы Пятой Конференции по ВИЧ/СПИД в Восточной Европе и Центральной Азии. Москва, ЕЕСААС. – 2016. – С. 105.

3. Оценка численности работников секса и людей, употребляющих инъекционные наркотики, в Республике Таджикистан в 2014 году. ГУ РЦ СПИД. Душанбе, 2014. – 16 с.

4. Отчёт страны о достигнутом прогрессе в противодействии эпидемии ВИЧ (ССГАООН). Таджикистан, 2015. – http://aidsreportingtool.unaids.org/indicator/country...

ПЕРВЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТЕСТА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ РНК/ДНК ВИЧ-1 В ОЧИЩЕННЫХ СПЕРМАТОЗОИДАХ В РАМКАХ ПРИМЕНЕНИЯ ВРТ У СЕРОДИСКОРДАНТНЫХ ПАР

Киреев Д.Е.[1,2], Мурзакова А.В.[1]

[1] ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

[2] Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

Введение. Оказание медицинской помощи, связанной с применением вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), парам, где один или оба партнера являются ВИЧ-инфицированными, стало возможным благодаря Приказу № 107н от 30 августа 2012 года, изменившему «Порядок использования ВРТ, противопоказания и ограничения к их применению» [1]. Наличие ВИЧ-инфекции у мужчины перестало являться противопоказанием, и после соответствующей обработки и тестирования его сперма может быть использована для искусственной инсеминации партнерши. Однако на момент утверждения нового Порядка в России отсутствовали зарегистрированные диагностические наборы, предназначенные для выявления генетического материала ВИЧ в очищенных сперматозоидах, что фактически не позволяло начать применять Порядок в клинической практике. В сентябре 2015 года ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора было получено регистрационное удостоверение на диагностический набор реагентов «АмплиСенс ВИЧ-C-FL» (№ РЗН 2015/3112), который стал первым и единственным набором, официально адаптированным для нужд ВРТ. Первые результаты его использования в рутинной диагностической практике показали необходимость использования такого набора в рамках применения ВРТ парам, в которых мужчина ВИЧ-инфицирован.

Цель и задачи. Целью нашей работы являлся анализ результатов использования набора реагентов «АмплиСенс ВИЧ-C-FL» при тестировании очищенных сперматозоидов от серопозитивных на ВИЧ мужчин.

Материалы и методы. 65 образцов очищенных сперматозоидов были получены из 4-х клиник ЭКО. Каждый клинический образец тестировался с помощью набора реагентов «АмплиСенс ВИЧ-C-FL» согласно инструкции.

Основные результаты. Результаты тестирования образцов представлены в таблице 1.

Всего было получено 5 положительных результатов, что составило 8,1% от всех валидно протестированных образцов. Количество невалидных результатов составило

Таблица 1. Результаты тестирования очищенных спермиев, поступивших из клиник ЭКО

	Общее количество образцов	Положительный результат	Невалидный результат
клиника № 1	31	4 (12,9%)	0
клиника № 2	2	1 (50%)	0
клиника № 3	3	0	0
клиника № 4	29	0	3 (10,35%)

4,6%. Такие результаты несколько выше опубликованных ранее Валерией Савази [2] на выборке из 188 очищенных спермиев (4% и 2% соответственно). Однако небольшое количество образцов не позволяет определить статистическую достоверность различий. Необходимо отметить сильные различия среди получаемых положительных и невалидных результатов от клиники к клинике. Все невалидные результаты были получены на биологических образцах из одной клиники, что позволяет предположить о наличии особенностей в протоколе очистки спермы, негативно повлиявших на качество ПЦР-исследования. Большая часть образцов с положительным результатом (4 из 5) поступила из клиники № 1. В ходе анализа клинических данных пациентов, являвшихся источником этих образцов, у всех была обнаружена высокая концентрация РНК ВИЧ в плазме крови (более 10.000 копий/мл) непосредственно перед сдачей спермы.

Выводы. Наличие положительных результатов, полученных при тестировании образцов очищенных сперматозоидов, говорит о пользе и необходимости тестирования клинического материала с целью снижения риска инфицирования матери и ребенка в ходе применения ВРТ. Нами было подтверждено, что высокая вирусная нагрузка у ВИЧ-инфицированного мужчины не зря является противопоказанием (как указано в Порядке использования ВРТ), так как в этом случае эффективность отмывки не является 100%-ной.

Важно также отметить, что отсутствие опубликованной стандартизированной процедуры очистки спермы негативно влияет на качество оказания медицинской помощи. Подробный протокол, рекомендованный клиниками, уже имеющими опыт работы с серопозитивными парами, позволит снизить риск инфицирования, а также облегчит новым клиникам применение ВРТ для такой сложной категории пар. Более высокий процент положительных и невалидных результатов, вероятно, связан с отсутствием опыта у клиник ЭКО и диагностической лаборатории в области обработки и тестирования данного вида материала.

Список используемой литературы

1. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 30 августа 2012 г. № 107н «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению».

2. V. Savasi, E. Ferrazzi, C. Lanzani, M. Oneta, B. Parrilla and T. Persico. Safety of sperm washing and ART outcome in 741 HIV-1-serodiscordant couples // Human Reproduction, Vol. 22, No. 3, pp. 772–777, 2007.

СРАВНЕНИЕ ДВУХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ ВИРУСНОЙ НАГРУЗКИ ВИЧ-1 НА ОСНОВЕ ОТ-ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ПРИ АНАЛИЗЕ РАЗЛИЧНЫХ СУБТИПОВ ВИЧ-1

Лаповок И.А.[1], Киреев Д.Е.[1,2], Шипулин Г.А.[1]

[1] ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

[2] Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

Введение. В настоящее время в мире выявлены 4 генетические группы ВИЧ-1: M, N, O и P. Однако наибольшее распространение имеют вирусы группы M, подразделяющиеся на 9 субтипов и ряд рекомбинантных форм [1]. В России до середины 90-х гг. 20 века было отмечено небольшое число случаев ВИЧ-инфекции, обусловленное инфицированием различными субтипами ВИЧ-1 группы M (включая A, B, C, D, G и H) [2, 3] и рекомбинантной формой CRF03_AB [4]. С середины 90-х годов ВИЧ-1 субтипа A1 начал активно распространяться в среде потребителей инъекционных наркотиков, что привело к доминированию этого субтипа в России. С 2005 года было отмечено увеличение доли инфекций рекомбинантной формой CRF63_02A1 [5]. В то же время для России не зафиксировано ни одного случая инфекции такими редкими не-M генетическими группами, как N, P или O [6].

Диагностика ВИЧ-инфекции на основе применения молекулярно-генетических тестов становится все более распространенной во всем мире, диктуя необходимость постоянного совершенствования методик и тест-систем. Измерение такого важного клинического показателя течения ВИЧ-инфекции и эффективности ее терапии, как вирусная нагрузка (ВН) ВИЧ-1, основано на применении ОТ-ПЦР в реальном времени, где мишенью являются консервативные области генома вируса, одинаково эффективно выявляемые у разных генетических субтипов ВИЧ-1. Тем не менее опубликованные данные говорят о расхождении результатов анализа ВН с применением отдельных тест-систем при тестировании панели ВИЧ-1 разных генетических групп [7].

Разработанный ЗАО «Вектор-Бест» однопробирочный тест для определения ВН демонстрирует высокую эффективность анализа ВН всех субтипов группы M, что

позволило включить его в состав коммерческого набора «РеалБест ВГВ/ВГС/ВИЧ» («Вектор-Бест», Новосибирск) [6]. В то же время применяемая в России с 2008 года диагностическая система «АмплиСенс ВИЧ-монитор-FRT» (ФБУН «ЦНИИЭ», Москва) обладает схожими характеристиками специфичности к генотипам ВИЧ-1.

Цель и задачи. Сравнение данных ВН, полученных при анализе одной и той же контрольной панели генотипов ВИЧ-1 системами «АмплиСенс ВИЧ-монитор-FRT» (далее – АмплиСенс) и теста, разработанного ЗАО «Вектор-Бест» (далее – Вектор).

Материалы и методы. Двукратно анализировали 8 образцов различных субтипов ВИЧ-1 группы М из панели генотипов ВИЧ-1 (Non WHO Reference Material NIBSC HIV-1 Genotype panel NIBSC code: 08/358). Экстракцию РНК проводили с помощью набора РибоПреп 50 (ФБУН «ЦНИИЭ», Москва) из 100 мкл материала. Данные ВН, полученные с помощью системы АмплиСенс, сравнивали с опубликованными данными, полученными с помощью диагностического набора Вектор [6].

Основные результаты. Для всех исследуемых образцов был получен валидный результат. Полученные данные ВН и их сравнение с результатами анализа системой Вектор представлены в таблице.

Степень сходимости (повторяемости) результатов определения ВН оказалась выше у набора АмплиСенс. Среднее стандартное отклонение составило 0.07 Log и оказалось максимальным при анализе образца субтипа D (0.14 Log). Для набора Вектор среднее стандартное отклонение составляло 0.15 Log, с максимальным значением для образцов субтипов D и AG-GH (0.28 Log).

Разница средних значений ВН для каждого субтипа ВИЧ-1 (посчитанная как разница между показаниями АмплиСенс и Вектора) в среднем составила 0.20 Log и оказалась максимальна для субтипа C (0.41 Log) и субтипов AG-GH (0.68). Тем не менее только расхождение результатов измерения ВН образца AG-GH могут считаться значительными, поскольку минимальные расхождения количественных показателей ВН, полученные двумя различными тест-системами, лежит в пределах 0.5 Log [6].

Субтип ВИЧ-1	Тест ЗАО «Вектор-Бест»				Тест «АмплиСенс ВИЧ-монитор-FRT»				Разница сред. значений*
	Повтор 1	Повтор 2	Среднее	Станд. откл.	Повтор 1	Повтор 2	Среднее	Станд. откл.	
A	3.62	3.36	3.49	0.18	3.80	3.68	3.74	0.09	0.25
B	3.33	3.62	3.47	0.21	3.39	3.48	3.43	0.06	-0.04
F	3.63	3.61	3.62	0.01	3.50	3.47	3.49	0.02	-0.13
D	3.77	3.37	3.57	0.28	3.62	3.82	3.72	0.14	0.15
C	3.40	3.24	3.32	0.11	3.82	3.64	3.73	0.13	0.41
G	3.43	3.55	3.49	0.08	3.50	3.61	3.55	0.07	0.06
AE	3.30	3.34	3.32	0.03	3.54	3.50	3.52	0.02	0.20
AG-GH	3.58	3.19	3.39	0.28	4.06	4.07	4.07	0.01	0.68

* Вычисляется как разница среднего значения ВН, полученного системой АмплиСенс и среднего значения ВН, полученного системой Вектор.

Выводы. Результаты нашей работы демонстрируют хорошую сходимость результатов определения ВН различных субтипов группы М ВИЧ-1, полученных двумя тест-системами. Причиной занижения значений ВН системой Вектор для образцов субтипа С и AG-GH может быть недостаточная эффективность амплификации специфической области генома вследствие генетического полиморфизма вируса.

Список литературы

1. Plantier J.C., Leoz M., Dickerson J.E., De Oliveira F., Cordonnier F., Lemée V. et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas // Nat. Med. 2009; 15(8): 871–2.

2. Bobkov A., Cheingsong-Popov R., Selimova L., Kazennova E., Karasyova N., Kravchenko A., Ladnaya N., Pokrovsky V., Weber J. Genetic heterogeneity of HIV type 1 in Russia: identification of H variants and relationship with epidemiological data // AIDS Res Hum Retroviruses. 1996; 12(18): 1687-90.

3. Popova I., Burova N., Fomin I., Rakhmanova A., Voronin E., Galkina M. The clinical course of HIV infection in children who were parenterally infected // Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 1999(1): 75-78.

4. Bobkov A., Kazennova E., Selimova L., et al. A sudden epidemic of HIV Type 1 among injecting drug users in the former Soviet Union: Identification of subtype A, subtype B, and novel gagA/env B recombinants // AIDS Res.Hum. Retroviruses. 1998; 14: 669-676.

5. Baryshev P., Bogachev V., Gashnikova N. HIV-1 genetic diversity in Russia: CRF63_02A1, a new HIV type 1 genetic variant spreading in Siberia. AIDS Res Hum Retroviruses. 2014; 30(6): 592-597

6. Однопробирочный тест для выявления и количественного анализа РНК генетических разновидностей ВИЧ, включая редкие не-М группы ВИЧ-1 и ВИЧ-2, на основе ОТ-ПЦР в реальном времени // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2014; 14:20-25.

7. Holmes H., Davis C., Heath A. Development of the 1st International Reference Panel for HIV-1 RNA genotypes for use in nucleic acid-based techniques // J Virol Methods. 2008; 154(1-2): 86-91.

СТРУКТУРА И УРОВЕНЬ МУТАЦИЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ВИЧ-1 У ПАЦИЕНТОВ С ВИРУСОЛОГИЧЕСКОЙ НЕУДАЧЕЙ ЛЕЧЕНИЯ

Кириченко А.А.[1], Мурзакова А.В.[2], Киреев Д.Е.[1,2]

[1] ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

[2] Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

Введение. В настоящее время в Российской Федерации растет распространенность инфекции, вызываемой вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ-инфекции).

Благодаря применению антиретровирусной терапии (АРВТ) удаётся улучшить продолжительность и качество жизни ВИЧ-инфицированных и снизить вероятность передачи ВИЧ-инфекции.

Однако АРВТ не всегда бывает эффективна. Основной причиной неуспеха терапии является формирование лекарственной устойчивости (ЛУ) ВИЧ в результате возникновения мутаций резистентности. Появление мутаций связано с высокой репликативной способностью вируса и большой частотой ошибок репликации, совершаемых обратной транскриптазой ВИЧ.

Таким образом, для подбора оптимальной схемы терапии и мониторинга её эффективности необходимо проводить анализ ЛУ ВИЧ у пациентов.

Цель работы. Проанализировать частоту возникновения и спектр мутаций резистентности в генах протеазы и обратной транскриптазы ВИЧ-1 к антиретровирусным препаратам (АРВП) среди ВИЧ-инфицированных пациентов, направляемых на исследование резистентности вируса вследствие выявленной вирусологической неудачи терапии.

Материалы и методы. Было проведено исследование 160 образцов плазмы крови от ВИЧ-инфицированных пациентов из 23 регионов Российской Федерации, которые состояли на диспансерном учете в территориальных центрах по профилактике и борьбе со СПИДом за период 2015-2017 гг.

На момент забора крови все пациенты находились на АРВТ, и во всех случаях была зарегистрирована вирусологическая неэффективность.

Вирусная нагрузка в образцах составляла от 526 до 7566034 копий РНК/мл.

Возраст пациентов варьировал от 2 до 54 лет (36,3±7,1).

Среди обследованных преобладали лица мужского пола – 61,9% (99 чел.).

Преобладающие пути заражения – половой, 43,1% (69 чел.) и ПИН, 23,1% (37 чел.). У 47 пациентов путь инфицирования не установлен. Мутации устойчивости ВИЧ-1 к АРВП выявляли методом секвенирования амплифицированных фрагментов гена pol, кодирующего протеазу и часть обратной транскриптазы ВИЧ-1 с использованием тест-системы «АмплиСенс® HIV-Resist-Seq» (ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора). Секвенирование очищенных фрагментов проводили с помощью генетического анализатора Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies, США). Обработку данных секвенирования и получение консенсусной последовательности осуществляли с помощью программного обеспечения «ДЕОНА» (ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора), для дальнейшего анализа использовали базу данных Стэнфордского университета HIV db Program: Sequence Analysis (http://hivdb.stanford.edu).

Субтипирование ВИЧ-1 проводили в программах HIV db Program: Sequence Analysis и REGA HIV-1 Subtyping Tool.

Полученные данные статистически обрабатывали с помощью программы Microsoft Office Excel 2010.

Результаты. Анализ распространенности различных субтипов ВИЧ-1 показал, что доминирующим субтипом является A1, он выявлен у 88,75% пациентов (142 чел.). В 6,9% случаев (11 чел.) выявлен – субтип B, у 1 пациента - субтип G. У 6 ВИЧ-инфицированных обнаружены циркулирующие рекомбинантные формы, в частности, у 4 пациентов - CRF63_02A1, у 2 - CRF01_AE.

Наличие хотя бы одной мутации ЛУ обнаружено у 142 пациентов (88,75%), однако резистентность к АРВП обнаружена только у 128 из них. Это объясняется тем, что у 14 пациентов была выявлена мутация A62V, которая является дополнительной и способствует снижению чувствительности только при наличии других мутаций резистентности.

Суммарный уровень обнаружения мутаций к нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы (НИОТ) составил 84,7%, к ненуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы (ННИОТ) 53,4% и 19,6% к ингибиторам протеазы (ИП). Наиболее часто встречались мутации M184V (68,7%), A62V (33,7%,) и G190S (29,4%) в гене обратной транскриптазы ВИЧ.

При оценке профиля резистентности к группам АРВП показано, что в подавляющем большинстве (67,2%) мутации обнаружены одновременно к двум классам препаратов, в 52,3% – к комбинации НИОТ+ННИОТ и в 14,9% случаев к – ИП+НИОТ. Реже (25,8%) мутации обнаруживаются только к одному классу препаратов (в большинстве случаев – к НИОТ – 19,5%) и лишь в 7,1% случаев выявлены мутации одновременно к трём классам препаратов.

Проанализирована частота возникновения устойчивости ВИЧ-1 к препаратам, используемым в текущих схемах терапии пациентов. При приёме препаратов класса ИП отмечается низкий уровень распространенности мутаций ЛУ (от 3% при приёме лопинавира до 50% при приёме фосампренавира и саквинавира). Для препаратов класса НИОТ выявлена более высокая частота появления мутаций. Так, например, при приёме ламивудина резистентность к нему возникла у 77% пациентов. При приёме препаратов из группы ННИОТ выявлена самая высокая частота возникновения мутаций ЛУ: этравирин (67%), эфавиренз (88%), невирапин (100%).

Отдельно был проведен анализ распространенности перекрестной лекарственной устойчивости ВИЧ к

препаратам, не принимаемым пациентом в текущих схемах АРВТ. Наиболее часто резистентность возникала к таким препаратам, как абакавир (75%), эмтрицитабин (69%), диданозин (54%) из класса НИОТ и невирапин (47%) из ННИОТ. Резистентность к ингибиторам протеазы обнаруживалась значительно реже (максимум для нелфинавира – 15%).

При анализе полученных данных не было выявлено корреляции между полом, возрастом, регионом проживания, путем заражения пациента и спектром выявленных мутаций.

Заключение. Из 160 ВИЧ-инфицированных пациентов, направленных на исследование резистентности вируса, у 128 были обнаружены значимые мутации ЛУ к АРВП, что, вероятно, являлось основной причиной неэффективности применяемой пациентом терапии. У 22 больных с вирусологической неэффективностью мутаций ЛУ обнаружено не было.

Среди исследованных образцов преобладали мутации к ингибиторам обратной транскриптазы (84,7% НИОТ; 53,4% ННИОТ). Это объясняется частым применением препаратов этих классов. Кроме того, отмечалась полирезистентность вируса к этим классам одновременно (52,3%).

Наиболее высокий уровень лекарственной устойчивости был обнаружен к препаратам класса ННИОТ, максимум которой выявлен при приёме невирапина у 11/11 пациентов (100%). Устойчивость к препаратам из класса ИП встречалась значительно реже, что связано с высоким барьером резистентности препаратов этого класса.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ ВИРУСНОЙ НАГРУЗКИ ВИЧ-1, ПРИМЕНЯЕМЫХ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Лаповок И.А.[1], Петров В.В.[1], Киреев Д.Е.[1,2], Сандырева Т.П.[3], Шипулин Г.А.[1]

[1] ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия
[2] Российский университет дружбы народов, Москва, Россия
[3] ГБУЗ «Свердловский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», Екатеринбург, Россия

Введение. Важнейшей группой тестов на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР), применяемой при наблюдении за лицами, больными ВИЧ-инфекцией, является определение концентрации РНК ВИЧ-1 в биологическом материале – определение вирусной нагрузки (ВН) ВИЧ-1. На сегодняшний день в России применяется ряд коммерческих диагностических тест-систем для измерения ВН, в том числе Abbott RealTime HIV-1 (Abbott, США) и АмплиСенс ВИЧ-Монитор-FRT (ЦНИИЭ, Россия). Обе тест-системы адаптированы для измерения ВН всех генетических вариантов ВИЧ-1, в том числе – циркулирующих на территории России. Тем не менее существует вероятность того, что коммерческие тест-системы измеряют ВН разных вариантов вируса с различной эффективностью. В частности, анализ образцов разных субтипов ВИЧ-1 с использованием различных коммерческих тест-систем дает неодинаковые результаты оценки ВН [1]. Кроме того, ряд работ, посвященных анализу сходимости результатов определения ВН на одних и тех же образцах с применением различных тест-систем, демонстрируют системное занижение уровня ВН одними тест-системами относительно других [2, 3]. Таким образом, представляется необходимым детальный анализ сходимости результатов работы распространенных в России тест-систем для анализа ВН.

Цель и задачи. Целью работы было проведение сравнительного анализа результатов измерения концентрации РНК ВИЧ-1 в образцах плазмы крови ВИЧ-инфицированных пациентов, полученных с помощью систем АмплиСенс ВИЧ-Монитор-FRT и Abbott RealTime HIV-1.

Материалы и методы. Была сформирована коллекция образцов плазмы крови от ВИЧ-инфицированных пациентов с данными ВН, полученными с помощью системы Abbott RealTime HIV-1 (с экстракцией из 1 мл плазмы). Для всех исследуемых образцов было проведено измерение ВН с использованием системы АмплиСенс ВИЧ-Монитор-FRT (с экстракцией из 100 мкл плазмы).

Для графического сравнения результатов, полученных разными методами, применяли метод Бланда – Альтмана. Оценку корреляции количественных данных ВН проводили путем построения диаграммы рассеивания с вычислением эффективности построения линии тренда (E) и коэффициента корреляции R^2.

Кроме того, был проведен анализ разведений контрольного образца из 3-го международного стандарта NIBSC, кат. № 10/152. Анализировались последовательные разведения образца в пределах концентраций в диапазоне 2.72 по 4.55 Log копий/мл.

Основные результаты. Была собрана коллекция из 178 образцов плазмы крови от ВИЧ-инфицированных пациентов из Уральского федерального округа. Для всех образцов плазмы были получены данные о ВН на основе анализа в тест-системе Abbott RealTime HIV-1. Для дальнейшего анализа исследовались образцы, ВН для которых была не ниже границы аналитической чувствительности набора «АмплиСенс ВИЧ-Монитор-FRT» при экстракции из 100 мкл биологического материала (500 копий/мл). Образцы были разделены на 4 основные группы (по концентрации РНК ВИЧ-1):

1) от 500 до 9 999 копий/мл – 54 образца;
2) от 10 000 до 99 999 копий/мл – 63 образца;
3) от 100 000 до 999 999 копий/мл – 51 образец;
4) от 1 000 000 и более копий/мл – 10 образцов.

Для всех образцов был получен валидный результат уровня ВН с помощью тест-системы «АмплиСенс ВИЧ-Монитор-FRT».

Было обнаружено, что данные ВН образцов, полученные обеими системами, формируют диаграмму рас-

сеивания с линией тренда, имеющей эффективность (E) 93,12% и коэффициент корреляции (R^2) 0.74.

Анализ по методу Бланда – Альтмана показал, что тест-система «АмплиСенс ВИЧ-Монитор-FRT» завышала уровень ВН в среднем на 0.22 Log копий/мл (P=0.001) по сравнению с Abbott RealTime HIV-1. При этом показатели ВН 175/178 (98.32%) исследованных образцов укладывались в диапазон двух стандартных отклонений.

Сравнительный анализ разведений 3-го международного стандарта NIBSC показал, что оба диагностических набора выдают завышенный результат ВН: на 0.21 Log копий/мл – для Abbott RealTime HIV-1 (P<0.001) и 0.14 Log – для «АмплиСенс ВИЧ-Монитор-FRT» (P<0.001). Однако степень отклонения результатов ВН от паспортного лежит в границах допустимого стандартного отклонения результатов ВН для обеих тест-систем.

Выводы. Результаты, полученные при тестировании стандарта NIBSC, показывают, что обе тест-системы точно оценивают его концентрацию и имеют незначительную ошибку в калибровке. При тестировании клинических образцов от пациентов Уральского федерального округа была отмечена хорошая сходимость результатов, что позволяет рекомендовать для использования оба набора в соответствии с клиническими рекомендациями.

Список литературы

1. Holmes H., Davis C., Heath A. Development of the 1st International Reference Panel for HIV-1 RNA genotypes for use in nucleic acid-based techniques // J Virol Methods. 2008; 154(1-2): 86-91.

2. Damond F., Avettand-Fenoel V., Collin G., et al. Evaluation of an Upgraded Version of the Roche Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 Test for HIV-1 Load Quantification // J Clin Microbiol. 2010; 48(4): 1413-6.

3. Hopkins M., Hau S., Tiernan C., et al. Comparative performance of the new Aptima HIV-1 Quant Dx assay with three commercial PCR-based HIV-1 RNA quantitation assays // J Clin Virol. 2015; 69: 56-62.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОРОГА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИСТАНЦИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ СВЯЗАННОСТИ ОБРАЗЦОВ ПРИ РАССЛЕДОВАНИИ СЛУЧАЕВ ПЕРЕДАЧИ ВИЧ

Лопатухин А.Э.[1], Мурзакова А.В.[1], Киреев Д.Е.[1,2]

[1] ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

[2] Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

Введение. С увеличением количества ВИЧ-инфицированных лиц расследование случаев ВИЧ-инфекции становится необходимой и часто используемой задачей. Основным методом, применяющимся при этом, является эпидемиологическое расследование. В рамках проведения эпидемиологического расследования передачи ВИЧ-инфекции, особенно при подозрении на заражение ВИЧ при оказании медицинской помощи или в результате противоправных действий, возникает потребность в получении объективных данных о связи между предполагаемым источником инфекции и реципиентом. Однако не во всех случаях результаты эпидемиологического расследования позволяют определить истинный источник ВИЧ-инфекции и подтвердить предполагаемые связи. С этой целью может быть использован филогенетический анализ. При помощи филогенетического анализа устанавливается эволюционный порядок дивергенции близких по структуре или функциям генов путем сравнения их нуклеотидных последовательностей. Метод обладает высокой разрешающей способностью и позволяет, в отличие от простого субтипирования, определить различия между вариантами вируса одного субтипа. При проведении филогенетического анализа все образцы относятся к исследуемой группе и группе сравнения.

Цель и задачи. Целью работы явилось исследование возможности использования порога генетической дистанции для оценки связанности образцов при проведении филогенетического анализа при расследовании случаев передачи ВИЧ-инфекции.

Материалы и методы. При проведении анализа структуры филогенетического дерева попарно оценивались отношения между образцами исследуемой группы и группы сравнения. В случае если образец из исследуемой группы не кластеризовался совместно с другими образцами исследуемой группы, делался вывод о том, что по результатам филогенетического анализа данный образец и остальные образцы исследуемой группы не связаны друг с другом. Если же образец из исследуемой группы кластеризовался совместно с другими образцами исследуемой группы, делался вывод о том, что результаты филогенетического анализа указывают на возможную эпидемиологическую связь между образцами исследуемой группы. При этом для каждого образца анализ проводился как минимум по двум регионам с разной вариабельностью: *pol* (менее вариабельный) и *env* (более вариабельный). Материалом для исследования послужили последовательности от образцов, полученных от пациентов в рамках проведения расследования 22 случаев передачи ВИЧ-инфекции в период с 2008 по 2017 год.

Основные результаты. Было проведено сравнительное исследование генетических дистанций между образцами исследуемой группы (как в случае доказанной связанности, так и не связанных образцов) и между образцами исследуемой группы и группы сравнения. В тех случаях, когда была доказана связанность двух образцов друг с другом, генетическая дистанция (процент отличающихся друг от нуклеотидов в сравниваемых последовательностях) по региону *pol* внутри исследуемой группы составляла от 0%, в случае когда последовательности были идентичны, до 1,2% и в среднем равнялась 0,48%. По региону *env* средняя дистанция была выше и составила 2,1% и варьировала в пределах от

0% до 4,2%. При этом средняя дистанция между исследуемой группой и группой сравнения составила 2,7% (1%–5%) по региону *pol* и 6,1% (2,6%–11,1%) по региону *env.* В случаях когда образцы не были связаны друг с другом (генетическая дистанция между исследуемыми образцами и образцами группы сравнения больше, чем между образцами исследуемой группы) дистанция по региону *pol* внутри исследуемой группы составляла от 2,1% до 3,3% и в среднем равнялась 2,8%. По региону env средняя дистанция составила 7,2% и варьировала в пределах от 6,5% до 7,9%. При этом средняя дистанция между исследуемой группой и группой сравнения составила 1,1% (0,9%–2,7%) по региону *pol* и 10,7% (3,1%–22,6%) по региону *env.* Дистанции между образцами групп сравнения варьировали в широких пределах от 0,5% до 12,3% по региону *pol* и от 0,8% до 24,3 по региону *env.*

Выводы. В целом по обоим регионам средняя дистанция между связанными образцами была достоверно меньше таковой для несвязанных образцов (0,48% против 2,8% по региону *pol* и 2,1% против 7,2% по региону *env*). Однако определить точное значение порога генетической дистанции, сравнивая с которым можно судить о связанности образцов, не представляется возможным из-за широкого разброса значений и их пересечения в разных группах. В связи с этим можно сделать вывод о том, что при помощи молекулярно-филогенетического анализа без использования правильно подобранной группы сравнения невозможно достоверно определить связанность двух образцов.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИЧ-1 СУБТИПА G, ВЫЗВАВШЕГО ВНУТРИБОЛЬНИЧНУЮ ВСПЫШКУ НА ЮГЕ РОССИИ В 1988-1990 ГГ.

Мурзакова А.В.[1], Киреев Д.Е.[1,2], Лопатухин А.Э.[1], Шемшура А.Б.[3], Носик М.Н.[4], Шипулин Г.А.[1]

[1] ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

[2] Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

[3] «Клинический центр профилактики и борьбы со СПИД» Министерства здравоохранения Краснодарского края, Краснодар, Россия

[4] ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Введение. Изучение вирусной эволюции и особенностей распространения возбудителя, проводимое на образцах от пациентов, инфицированных в результате нозокомиальных вспышек, крайне информативно, потому что обычно достоверно известны такие важнейшие параметры, как путь передачи и дата заражения. Одной из самых крупных и хорошо изученных внутрибольничных вспышек ВИЧ-инфекции является вспышка, произошедшая на юге России. В ходе эпидемиологического расследования было подтверждено, что в период с 1988 по 1990 год в 17 лечебно-профилактических учреждениях было инфицировано более 260 человек [1, 2]. Все случаи инфекции были вызваны вариантом ВИЧ-1 субтипа G, поскольку первоначальным источником являлся один человек. Несмотря на обилие отечественных и зарубежных публикаций, посвященных изучению вирусов у пациентов, зараженных в результате этой вспышки, до настоящего времени никем не была проведена работа по секвенированию полного генома данного варианта вируса.

Цель и задачи. Целью работы являлось проведение полногеномного секвенирования ВИЧ-1 субтипа G, выделенного от пациентов, инфицированных в результате внутрибольничной вспышки ВИЧ-инфекции в 1988–1990 гг.

Материалы и методы. В качестве биологического материала использовались образец лимфоцитов от пациента Ш., забранный в 1989 году, и два образца плазмы крови от пациента С., забранные в 2012 и 2014 годах. Оба пациента являлись участниками вспышки. Секвенирование всей кодирующей области генома ВИЧ-1 осуществлялось согласно методике, описанной ранее [3]. Филогенетический анализ проводили с помощью программы MEGA 6.0. Источником нуклеотидных последовательностей субтипа G для сравнения с последовательностями, полученными в данной работе, и эпидемиологических данных служила база данных Лос-Аламос (www.hiv.lanl.gov).

Основные результаты. В результате проведения полногеномного секвенирования были получены 3 нуклеотидные последовательности ВИЧ-1. По литературным данным известно, что первоисточником инфекции был один человек, некоторое время проживавший в Конго. После его возвращения спустя несколько лет произошел случай нозокомиальной вспышки [1]. В связи с этим было решено провести филогенетический анализ полученных последовательностей исследуемых образцов с использованием 75 полногеномных (протяженностью более 8000 нуклеотидов) последовательностей ВИЧ-1 субтипа G, депонированных в базе Лос-Аламос. Нужно отметить, что в данной базе отсутствуют образцы ВИЧ-1 субтипа G из России с протяженностью последовательности более 3000 нуклеотидов, а также присутствует только один образец из Конго (KU168277), который, вероятно, мог быть генетически близок вирусу, вызвавшему вспышку на территории России в 1988–1990 гг. В связи с этим, особый интерес вызывал тот факт, насколько тесную генетическую связь имеет данный образец из Конго с исследуемыми образцами из вспышки.

Для филогенетического анализа было использовано 78 образцов. Исследуемые образцы формировали четкий кластер с единственным представленным образцом из Конго, что подтвердило происхождение завезенного

вируса из данного региона и позволяет предположить, что вариант из Конго может являться предшественником исследуемых образцов.

Выводы. Впервые было проведено полногеномное секвенирование ВИЧ-1 субтипа G, выделенного от пациентов, инфицированных в результате внутрибольничной вспышки 1988-1990 гг. Результаты филогенетического анализа указывают на генетическую схожесть данного варианта вируса с вариантом из Конго, что подтверждает правильность эпидемиологического расследования, выполненного в 1990 году.

Список используемой литературы

1. Покровский В.В., Ерамова И.Ю., Деулина М.О., и др. Внутрибольничная вспышка ВИЧ-инфекции в Элисте // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 1990, том 4, стр. 17-23.

2. Саухат С.Р., Покровский В.В., Воронцов Д.В. и др. Влияние случаев ВИЧ-инфекции, связанных с нозокомиальными очагами, на дальнейшее развитие эпидемического процесса // Эпидемиология и инфекционные болезни, 2004, № 4, стр. 16-20.

3. Kireev D.E., Lopatukhin A.E., Neverov A.D., et al. Development of Molecular Technique for Deep Sequencing of Almost Full HIV Genome // AIDS Res Hum Retroviruses, 2014 Oct; 30 Suppl 1:A182. doi: 10.1089/aid.2014.5388. abstract.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ НОКАУТА ГЕНА РЕЦЕПТОРА CCR5 С ПОМОЩЬЮ CRISPR/CAS9 СИСТЕМЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА В МОДЕЛЬНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ HT1080 CCR5-EGFP

Омельченко Д.О., Урусов Ф.А., Глазкова Д.В., Богословская Е.В.

ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение. Выключение экспрессии гена CCR5 – одно из основных направлений исследований для разработки генной терапии ВИЧ инфекции. Наиболее подходящими для этой задачи являются инструменты для редактирования генома на основе нуклеаз с системой распознавания целей для рестрикции. CRISPR/Cas9 – новый инструмент редактирования генома, обладающий рядом преимуществ перед системами, разработанными ранее. Система состоит из ключевого белка-нуклеазы Cas9, который разрезает целевую последовательность, узнавание которой происходит за счёт взаимодействия с направляющей РНК (guide RNA или gRNA), комплементарной целевой ДНК. CRISPR/Cas9 могут применяться в генотерапии ВИЧ-инфекции как для модификации клеток с целью приобретения резистентности, так и для избавления от интегрированного латентного провируса уже зараженных клеток [1].

Одной из основных проблем нуклеаз в генной инженерии является их потенциальная неспецифическая активность. Для решения этой проблемы белок Cas9 был модифицирован заменой одной из аминокислот D10A, в результате чего вместо внесения двуцепочечного разрыва Cas9 делает одноцепочечный разрыв – «никирует». Хотя теперь для внесения разрыва и NHEJ репарации требуется одновременное действие двух близкорасположенных gRNA, благодаря этому специфичность CRISPR увеличивается в 50-1500 раз [2,3]. Поэтому в данной работе была проведена оценка эффективности не только Cas9 нуклеазы, но и Cas9_D10A «никазы».

Цель и задачи. Целью данной работы являлось определение эффективности нокаута гена CCR5 системы CRISPR/Cas9 и «никазы» Cas9_D10A с помощью подобранных биоинформатическим поиском целевых gRNA. Задачи: 1) подобрать цели в гене CCR5 с помощью одного из биоинформатических сервисов для подбора gRNA; 2) клонировать полученные целевые последовательности в экспрессионные плазмиды; 3) подобрать оптимальное соотношение плазмид, экспрессирующих «никазу» Cas9_D10A и целевые gRNA, для трансфекции; 4) проверить эффективность работы подобранных gRNA на модельной клеточной линии HT1080 CCR5-EGFP с помощью проточной цитофлуориметрии и T7E1 анализа.

Материалы и методы. Клетки линии HT1080 CCR5-EGFP, несущие 1 копию рекомбинантного гена CCR5, слитого с EGFP, были получены ранее [4]. Культуры растили в среде MEM с 10% ЭБС (Gibco, США) в термостате при постоянной температуре 37 °C и 5% CO_2. В работе были использованы векторы из Addgene – gRNA cloning vector (#41824), hCas9 (#41815) и hCas9_D10A (#41816). gRNA cloning vector был нами модифицирован так, что для получения экспрессионного вектора с целевой gRNA стало достаточно синтезировать и отжечь друг на друга два комплементарных олигонуклеотида с целевой последовательностью и концами CACC и CAAA, комплементарными внесенному сайту рестрикции BbsI в gRNA cloning vector.

Последовательности-мишени в гене CCR5 были подобраны согласно результатам анализа в сервисе поиска оптимальных gRNA http://crispr.mit.edu на участках со слабой гомологией генов CCR5 и CCR2, для предотвращения неспецифического расщепления CCR2. **L**: 5`-CACC**G**CTTCACATTGATGTTTTGGC-3`,5`-AAACGCCAAAACATCAATGTGAAG**C**-3`; **R**: 5`-CACC**G**CCTGCCTCCGCTCTACTCAC-3`, 5`-AAACGTGAGTAGAGCGGAGGCAGG**C**-3`; **L3**: 5`-CACC**G**CAGAATTGATACTGACTGTA-3`, 5`-AAACTACAGTCAGTATCAATTCTG**C**-3`; **R3**: 5`-CACC**G**AAAGATAGTCATCTTGGGGC-3`, 5`-AAACGCCCCAAGATGACTATCTTT**C**-3`.

Для оценки эффективности целевых gRNA проводили трансфекцию клеток HT1080 CCR5-EGFP плазмидами, экспрессирующими gRNA и Cas9 или Cas9_D10A, суммарно по 2 мкг ДНК на 5×10^4 клеток с помощью реагента LP (Clontech, США). Через неделю после трансфекции определяли эффективность работы нуклеазы по падению экспрессии EGFP, нормированной на эффективность доставки контрольной плазмиды pmaxGFP (Lonza, США). Процент EGFP+ клеток в популяции определяли на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD, США). Результаты измерений обрабатывались с помощью программного

обеспечения Flowing Software 2.5.1. Для молекулярного анализа эффективности работы нуклеазы амплифицированный ПЦР участок гена CCR5 в области распознавания gRNA после плавления и отжига подвергали гидролизу эндонуклеазой T7E1 (NEB, США) по протоколу производителя. Процент внесенных инсерций/делеций определяли по относительной интенсивности полосок в агарозном геле с помощью программы ImageJ.

Основные результаты. Для получения максимальной эффективности работы CRSIPR hCas9_D10A в первую очередь было оптимизировано соотношение плазмид, экспрессирующих hCas9_D10A и gRNA. Для оптимизации использовали одну из пар gRNA L3+R3 в разных соотношениях с hCas9_D10A. В результате было выяснено, что оптимальным соотношением hCas9_D10A : gRNA левая : gRNA правая является 6:1:1. Для полноценной hCas9 было выбрано соотношение hCas9 : gRNA 3:1.

Эффективность hCas9_D10A и hCas9 проверяли с различными комбинациями gRNA в сравнении с уже успешно применявшимися в нашей лаборатории нуклеазой – TALEN против гена рецептора CCR5. Эксперимент показал, что эффективность полноценной hCas9 по сравнению с «никазой» hCas9_D10A в 2-4 раза выше (падение экспрессии EGFP в трансфицированных клетках на 50-60% против 15-20%), а также то, что gRNA R в паре с полноценной hCas9 по эффективности не уступает TALEN (57±1,9% и 55±1,6% соответственно). Процент инсерций/делеций, определенный с помощью T7E1-теста, оказался ниже определенного на проточном цитофлуориметре (50% target R+ hCas9 и 36% TALEN), что может быть связано с разной чувствительностью данных методов.

Заключение. Наибольшую эффективность нокаута гена рецептора CCR5 дает gRNA target R в паре с полноценной hCas9, сравнимой с имеющейся у нас парой TALE нуклеаз (55-57%). Оптимальное соотношение плазмид hCas9_D10A и экспрессионных плазмид левой и правой gRNA составляет 6:1:1. Эффективность «никазы» hCas9_D10A по сравнению с интактной Cas9 в ~2-4 раза ниже.

Список используемой литературы

1. Saayman S. et al. The therapeutic application of CRISPR/Cas9 technologies for HIV //Expert opinion on biological therapy. – 2015. – Т. 15. – №. 6. – С. 819-830

2. Ran F. A. et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity //Cell. – 2013. – Т. 154. – №. 6. – С. 1380-1389

3. Shen B. et al. Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects //Nature methods. – 2014. – Т. 11. – №. 4. – С. 399-402

4. Глазкова Д. В. и др. Подавление экспрессии гена ccr5-рецептора человека с помощью искусственных микроРНК //Молекулярная биология. – 2013. – Т. 47. – №. 3. – С. 475.

СУБТИПЫ ВИЧ-1 И МУТАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ К ПРЕПАРАТАМ АРВТ В ПРИВОЛЖСКОМ ФЕДЕРАЛЬНОМ ОКРУГЕ

Парфенова О.В., Пекшева О.Ю., Зайцева Н.Н.

ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия

Введение. В мире около 35 миллионов человек заражены различными типами и подтипами ВИЧ. ВИЧ-1 вызывает 95% всех инфекций, в то время как ВИЧ-2 5% (в основном странах Западной Африки). ВИЧ-1 был разделен на четыре группы. На группу М приходится более 95% всех зарегистрированных случаев ВИЧ-1 инфекции. Она разделена на девять подтипов: A-D, F-H, и J-K. Из них подтип С является наиболее распространенным во всем мире и составляет 50-55% всех случаев ВИЧ-инфекции, главным образом в странах Африки к югу от Сахары, в Бразилии и Индии. Подтип А составляет примерно 20% и чаще всего обнаруживается в Восточной Европе (в т.ч. в России и странах бывшего СССР), Северной Азии и Западной Африке. ВИЧ-1 подтипа В составляет 12% во всем мире от инфекции ВИЧ-1 и является основным штаммом в развитых странах (Северная Америка, Западная Европа, Япония и Австралия). Другие ВИЧ-1 подтипы (D-K) встречаются редко (менее 6% всех случаев инфицирования). В группе М также зарегистрировано 66 циркулирующих рекомбинантных форм (CFR), которые эволюционируют путем рекомбинации двух или более подтипов. CRF01_AE преимущественно обнаруживаются в Юго-Восточной Азии, CRF02_AG в Западной Африке [1,2,5].

Резистентность ВИЧ к антиретровирусным препаратам (АРВП) - одна из основных угроз для контроля и сдерживания эпидемии этой инфекции. Большинство имеющихся данных лекарственной устойчивости получены из исследований ВИЧ-1 субтипа В [4]. Аналогичные данные о других подтипах ВИЧ-1 ограничены, в первую очередь из-за более позднего начала применения антиретровирусной терапии (АРВТ). АРВТ, как правило, включает в себя комбинации нуклеозид/нуклеотидных ингибиторов обратной транскриптазы (НИОТ), ненуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (ННИОТ), ингибиторов протеазы (ИП) и ингибиторов интегразы (ИИ). Эти АРВП эффективны против большинства ВИЧ-1, несмотря на то, что они изначально были разработаны против ВИЧ-1 субтипа В. Тем не менее чувствительность к АРВП может существенно варьировать в зависимости от подтипа из-за присущих полиморфизмов и межвидового скрещивания. Генетические различия могут также влиять на степень перекрестной резистентности к АРВП того же класса и привести к вирусологической неудаче, повлиять на клинический исход и иммунологический ответ [2,3,5] .

В Приволжском федеральном округе (ПФО) на 01.07.2016 г. антиретровирусную терапию (АРВТ) получали 91 315 ВИЧ-позитивных пациентов, что составило 96,2% от числа нуждавшихся в лечении. Генотипирование ВИЧ с целью выявления мутаций лекарственной устойчивости и определение типовой принадлежности вирусов в ПФО осуществляется с начала 2008 года [1,2,5].

Цели и задачи. Провести исследование распро-

страненности субтипов ВИЧ-1 и мутаций резистентности ВИЧ к АРВП в ПФО за период наблюдения с 2008 по 2016 гг.

Материалы и методы. Проанализированы 827 образцов плазмы крови ВИЧ-позитивных пациентов, состоявших на диспансерном учете в территориальных центрах по профилактике и борьбе со СПИД и ИЗ ПФО. Исследования по генотипированию проводили с использованием тест-систем «ViroSeqTM HIV-1 Genotyping System»(Celera Diagnostic, Abbott Laboratories, США) и «АмплиСенс HIV-Resist-Seq» (ФБУН «ЦНИИЭ») на генетических анализаторах ABI Prism 3100 и Genetic Analyzer XL3500 «Applied Biosystems», США. Дальнейший анализ осуществляли с помощью программного обеспечения «ViroSeq HIV-1 Genotyping System Software» v.2.8 (Celera, США), «ДЕОНА» (ООО «МедАйТи Групп», Россия) и базы данных Стэнфордского университета (http://hivdb.stanford.edu) для определения профиля мутаций устойчивости ВИЧ к различным АРВП. Субтип определяли в приложении REGA HIV-1 Subtyping Tool - Version 3.0 (http://dbpartners.stanford.edu:8080/RegaSubtyping/stanford-hiv/typingtool).

Основные результаты. Популяция субтипов ВИЧ-1, циркулирующих на территории ПФО, не отличается большим разнообразием. За весь период наблюдения и контроля за резистентностью к АРВП подавляющее большинство составляют вирусы подтипа А (А1) - 95,9%. Другие выявленные субтипы распределяются следующим образом: В - 2%; CRF 02_AG - 0,6%; G - 0,5%; Rec A-1,B – 0,5%; C - 0,25%; CRF 06_CPX – 0,25%; CRF 03_AB – 0,25%.

Во всех выделенных субтипах была оценена распространенность мутаций резистентности в генах протеазы и обратной транскриптазы ВИЧ. Самой распространенной мутацией НИОТ является M184V. Она присутствует во всех субтипах с резистентностью и определяет высокий уровень устойчивости к 3TC и FTC. Широко распространены мутации D67D/E/G/, K70K/P/R/, T215I/Y, K219E/H/N/Q/, определяющие резистентность к AZT в 4-х субтипах ВИЧ-1(A; B; Rec A-1,B; CRF 06_CPX). В нашем исследовании выявлено, что CRF02_AG содержал меньше всех мутаций – всего по одной к НИОТ и ННИОТ, а наибольшее разнообразие мутаций характерно для субтипа В.

Наиболее распространенными мутациями ННИОТ были K101E/K (субтипы A; B; G), K103N (A; B; RF 06_CPX) и G190A/C/G/S(A; B; Rec A-1,B), обуславливающие резистентность к NVP, EFV и RPV. Были найдены специфические мутации, характерные только для одного субтипа. Так, в группе НИОТ, A62V – для А, Y115F – для В, а 3 мутации, такие как M41L(резистентность к AZT и d4T), E44D и L210W – для CRF 06_CPX подтипов. Только в двух подтипах В и G выделялась замена L74V, отвечающая за резистентность к ABC. В группе ННИОТ характерной только для субтипа В была Y181I/C (снижает чувствительность к NVP и EFV), для субтипа G – Y188L (высокая резистентность к NVP,EFV,RPV) и для Rec A-1,B – Y318F (резистентность к NVP, EFV).

Заключение. В представленной работе выявлены некоторые генетические различия в резистентности к АРВП различных субтипов ВИЧ-1 в ПФО, что имеет большое значение для подбора комплексов препаратов пациентам, в зависимости от конкретного субтипа вируса. Эти данные могут быть полезными и при разработке новых лечебных препаратов для ВИЧ-инфицированных. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы понять влияние разнообразия подтипов ВИЧ на лекарственную устойчивость и клинические последствия, которые будут иметь решающее значение для дальнейшего успеха АРВТ.

Список используемой литературы

1. Зайцева Н.Н., Носов Н.Н., Парфенова О.В., Пекшева О.Ю., Ефимов Е.И../Современные молекулярно-генетические технологии в мониторинге за циркуляцией субтипов ВИЧ-1 // Современные технологии в медицине. – 2016. – Том8. - №1. - С.121-127.

2. Бобкова М. Р../Генетическое разнообразие вирусов иммунодефицита человека и антиретровирусная терапия // Журнал: Терапевтический архив. 2016;88(11): 103-111

3. Lessells RJ, Katzenstein DK, de Oliveira T./Are subtype differences important in HIV drug resistance? / /Curr Opin Virol. 2012 Oct;2(5):636-43.

4. Singh K, Flores JA, Kirby KA, Neogi U, Sonnerborg A et al./ Drug resistance in non-B subtype HIV-1: impact of HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. // Viruses. 2014 Sep 4;6(9): 3535-62.

5. Huang A, Hogan JW, Luo X, DeLong A, Saravanan S, et al./ Global comparison of drug resistance mutations after first-line antiretroviral therapy across Human immunodeficiency virus-1 subtypes. //Open Forum Infect Dis. 2015 Nov 3;3(2):ofv158.

ЛАБОРАТОРНЫЕ ПОДХОДЫ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНОЙ НАГРУЗКИ ВИЧ

Перелыгина И.В., Мясищева Е.А.

БУЗ Орловской области «Орловский центр СПИД», Орел, Россия

Введение. Количественное определение РНК ВИЧ в плазме крови (определение вирусной нагрузки) – обязательная процедура, которая проводится на этапе назначения противовирусной терапии и дальнейшего мониторинга эффективности лечения.

Цель. Оценить эффективность использования различных лабораторных подходов диагностики вирусной нагрузки ВИЧ.

Методы. Для определения вирусной нагрузки ВИЧ в настоящее время в лабораторной практике используют несколько подходов диагностики: выделение РНК ВИЧ на магнитной силике в плазме крови объемом 100 мкл, 200 мкл или 1000 мкл. Понятие «неопределяемый уровень» вирусной нагрузки определяется нижним пределом линейного диапазона (ЛД) и может быть разным, в зависимости от метода выделения нуклеиновых кислот.

При выделении из 100 мкл плазмы ЛД – от 500 копий/мл, из 200 мкл – от 250 копий/мл, а при выделении из 1000 мкл плазмы ЛД – от 50 копий/мл.

Результаты. Вирусная нагрузка – самый ранний показатель успеха или неудачи лечения, который почти на месяц опережает изменение числа лимфоцитов CD4. Первое исследование на вирусную нагрузку после начала терапии необходимо провести через 4-8 недель. Вирусологическими критериями эффективности терапии считают снижение вирусной нагрузки более чем на 0,5 lg через 4 недели и более чем на 1 lg через 8 недель лечения. Если вирусная нагрузка не снизилась до уровня менее 400 копий/мл к 24-й неделе лечения или до уровня менее 50 копий/мл к 48-й неделе лечения, это указывает на неполноценный ответ. При снижении до неопределяемого уровня проведенное затем дважды измерение с интервалом 4-8 недель показало, что вирусная нагрузка вновь возросла до определяемых значений и существует риск вирусологической неэффективности лечения. Чаще всего это свидетельствует о развитии лекарственной устойчивости ВИЧ и требует скорейшего изменения схемы лечения.

Небольшие подъемы вирусной нагрузки от неопределяемого уровня до 50-200 копий/мл («всплески») могут регистрироваться и без развития устойчивых штаммов вируса, но тем не менее это должно стать поводом для обсуждения с пациентом вопросов соблюдения режима лечения. В таких случаях, чтобы зарегистрировать «всплески» подъема вирусной нагрузки, уместным подходом лабораторной диагностики является ультрачувствительное выделение РНК из 1000 мкл плазмы на магнитной силике с недетектируемым уровнем менее 50 копий/мл.

Заключение. Использование трудоемкой методики выделения нуклеиновых кислот на магнитной силике из 1000 мкл плазмы увеличивает в десять раз чувствительность лабораторного метода исследования, тем самым помогая создать полную картину течения инфекционного процесса.

МОДЕЛЬНАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВСТАВКИ ЭКСПРЕССИОННОЙ КАССЕТЫ В ГЕН *CCR5* НА ОСНОВЕ КЛЕТОК ЛИНИИ HT1080

Поздышев Д.В., Урусов Ф.А., Омельченко Д.О., Сизова Т.В., Гоптарь И.А., Глазкова Д.В., Богословская Е.В., Маркелов М.Л., Шипулин Г.А.

ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение. Инструменты редактирования генома на основе программируемых нуклеаз имеют огромный терапевтический потенциал, в частности для лечения ВИЧ-инфекции. Одно из перспективных направлений исследований в этой области – подавление экспрессии гена *CCR5* в CD4+ лимфоцитах. Установлено, что отсутствие функционального рецептора *CCR5* на поверхности клеток препятствует связыванию ВИЧ с Т-клетками, предотвращая распространение вируса. Внесение разрыва в последовательность *CCR5* в геноме с помощью программируемых нуклеаз приводит к запуску механизмов репарации, таких как негомологичное соединение концов (NHEJ, nonhomologous end-joining) или репарация с рекомбинацией (HRR, homologous recombinational repair). Как в одном, так и в другом случае аминокислотная последовательность белка CCR5 нарушается, что ведет к потере функционального белка. При этом репарация по механизму HRR дает дополнительную возможность внесения в данное место генома экспрессионной кассеты, кодирующей какой-либо терапевтический агент. Для осуществления такой схемы, кроме введения в клетку нуклеазы, необходима доставка в ядро клетки ДНК матрицы с плечами гомологии к последовательностям, фланкирующим разрыв. Согласно опубликованным данным, наиболее многообещающие результаты по доставке трансгена в Т клетки были получены с помощью аденоассоциированных векторов (ААВ)[1]. В нашей работе для поиска наиболее эффективных протоколов сайт-специфической вставки трансгена используется модельная система клеток фибросаркомы человека линии HT1080.

Материалы и методы. Клеточные линии HEK293FT, HT1080 и SupT1 культивировались соответственно на средах DMEM с 10% эмбриональной бычьей сыворотки (ЭБС, Clontech, США), MEM с 10% ЭБС и RPMI advanced с 2% ЭБС. Плазмиды для сборки ААВ частиц были взяты из набора «AAV-6 Helper Free Promoterless Expression» (Cell Biolabs, США). Во всех плазмидах в качестве референсного гена использовался ген зеленого флуоресцирующего белка GFP. Плазмиды, кодирующие TALE нуклеазы, направленные против гена CCR5, были синтезированы в компании LABOMICs (Бельгия). Области распознавания нуклеаз расположены в начале кодирующей рамки гена *CCR5*. Доставку плазмид в клетки осуществляли с помощью Lentiphos HT (Clontech, США). Флуоресценцию GFP в клетках измеряли на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD, США). Анализ данных проточной цитометрии проводили в программе Flowing Software 2.5.1 (http://www.uskonaskel.fi/flowingsoftware/).

Цель и задачи. Цель работы – разработка протокола эффективной доставки ДНК с плечами гомологии к гену *CCR5* в ядро клеток в качестве матрицы для рекомбинации с помощью ААВ. Основные задачи работы – создание модельной системы для проверки эффективности целевой вставки по механизму HRR при внесении разрывов в ген *CCR5* с помощью TALE нуклеазы, а также изучение влияния различных параметров на эффективность вставки.

Основные результаты. В нашей лаборатории для наработки ААВ 6-го серотипа был использован набор «AAV-6 Helper Free Promoterless Expression». Протокол сборки вирусных частиц на клетках HEK293FT был оптимизирован с использованием стандартной контрольной плазмиды pAAV-GFP. В качестве агента для трансфекции клеток использовали полиэтиленимин. Среди варьируемых параметров были: исходное количество трансфекционных плазмид, соотношение количества ДНК к количеству полиэтиленимина, схема лизиса клеток-продуцентов. При использовании оптимизированного протокола инфекционный титр вирусных частиц достигал значений

$1,5*10^7 \pm 5,8*10^6$ трансдукционных единиц на миллилитр (при титровке на клетках линии HT1080).

Для выбора оптимальной клеточной линии была проведена трансдукция полученными контрольными AAB частицами клеток трех линий: HEK293FT, HT1080 и SupT1. Наибольшую чувствительность к трансдукции (50,5%) показали клетки линии HT1080, тогда как для линий HEK293FT и SupT1 максимальный процент трансдуцированных клеток при тех же условиях 17% и 6,2% соответственно. Максимальные значения количества флуоресцирующих клеток достигаются на третьи сутки после трансдукции и далее экспоненциально падают.

На следующем этапе работы на основе стандартной конструкции pAAV-MCS была создана плазмида, несущая референсный ген *GFP* под контролем промотора ppgk, в контексте последовательностей, гомологичных участку гена *CCR5*, в который будут вноситься разрывы с помощью TALE нуклеаз. Проверка работы полученных с помощью данных плазмид AAB частиц производилась на клеточных линиях HT1080. Для начальных пиковых значений процента флуоресцентных клеток в 46-53% (при добавлении 25 мкл вирусной суспензии к 100 тыс. клеток) падение процента экспрессирующих GFP клеток до нуля наблюдалось не позднее 20 дней после трансдукции.

Далее была поставлена серия экспериментов, в которой клетки той же модельной линии подвергались трансдукции AAB и трансфекции плазмидами, кодирующими пару TALE нуклеаз, для получения стабильной вставки вектора в ген *CCR5* по механизму HRR. Среди параметров, которые менялись с целью оптимизации протокола, были: исходное количество AAB для трансдукции, порядок трансфекции/трансдукции, интервал между трансфекцией и трансдукцией. При исходном инфекционном титре AAB в $4,4*10^5$ трансдукционных единиц на миллилитр брали 125 или 62,5 мкл вирусной суспензии на 100 тысяч клеток, временной интервал между трансфекцией и трансдукцией составлял 0, 3, 6 или 24 часа. Процент флуоресцирующих клеток в образцах на третьи сутки составлял 91,9±3%, что говорит о хорошей эффективности доставки ДНК матрицы в ядро клеток. Стратегия доставки трансгена с помощью AAB предполагает экспрессию привнесенных генов главным образом с эписомальной ДНК, поэтому процент флуоресцирующих клеток через 20 дней после трансдукции интерпретировался как процент клеток, в геном которых была стабильно интегрирована экспрессионная кассета. Наибольший процент клеток со вставкой трансгена в геном был получен при трансфекции плазмидами TALEN с последующей трансдукцией AAB с интервалом в сутки, максимальный процент таких клеток составлял 12,4±1,6%. Для контрольных клеток, в которые были добавлены AAB без предварительной трансфекции нуклеазами, процент флуоресцирующих клеток составлял 3,8±0,3%, что соответствует ожидаемому проценту интеграции AAB.

Вывод. Создана модельная система для подбора условий интеграции ДНК последовательностей в ген *CCR5* на базе линии HT1080, использование которой может позволить увеличить эффективность редактирования генома для целевой доставки генов.

Список используемой литературы

1. Sather B., Romano Ibarra G., Sommer K., Curinga G., Hale M., Khan I., Singh S., Song Y., Gwiazda K., Sahni J., Jarjour J., Astrakhan A., Wagner T.,. Scharenberg A., Rawlings D. Efficient modification of CCR5 in primary human hematopoietic cells using a megaTAL nuclease and AAVdonor template Science Translational Medicine 2015, 7, 307, 307ra156.

РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ВИЧ К ПРЕПАРАТАМ В СХЕМАХ АРВТ ПЕРВОЙ ЛИНИИ: ОТ ТЕОРИИ К КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Кравченко А.В., Куимова У.А., Носик М.Н., Харбутли М.А.

ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия
ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Введение. В настоящее время большинство специалистов рекомендует назначать АРВТ всем больным ВИЧ-инфекцией, независимо от количества CD4+лимфоцитов. При исходно низком количестве CD4+-лимфоцитов (<350 клеток/мкл) АРВТ рекомендуется незамедлительно (EACS guidelines, October 2016, v 8.1). В протоколах, утвержденных Российским научным обществом инфекционистов (версия 2016 г.), указано, что наличие ВИЧ-инфекции у пациента является показанием к назначению АРВТ, т.е. АРВТ рекомендуется назначать всем больным ВИЧ-инфекцией. В приоритетном порядке АРВТ назначают больным с клиническими проявлениями вторичных заболеваний, при количестве CD4+лимфоцитов <350 клеток/мкл или при наличии ряда сопутствующих заболеваний. На начало 2016 г. АРВТ получало 217 000 граждан РФ (форма № 61), а к концу года уже около 240 000 пациентов. Только за 2015 г. ВИЧ-инфекция впервые была диагностирована более чем 100 000 жителей РФ, причем у 32,7% больных уже имели место вторичные заболевания. Более чем у 50% пациентов заражение ВИЧ связано с приемом инъекционных наркотиков (ПИН). Среди ПИН приверженность АРВТ существенно ниже. Низкая приверженность терапии, прерывание лечения обуславливают развитие резистентности ВИЧ к лекарственным препаратам классов НИОТ и ННИОТ (схема АРВТ 1-й линии у 80% пациентов) и распространение в популяции больных штаммов ВИЧ, устойчивых к ряду антиретровирусных препаратов (АРВП).

Цель исследования. Анализ частоты развития резистентности ВИЧ к лекарственным препаратам в течение последних 10 лет у больных ВИЧ-инфекцией, ранее не получавших АРВТ.

Материалы и методы. Был проведен анализ за период с 2006 по 2016 г. публикаций результатов ряда исследований по частоте и спектру мутаций резистентности ВИЧ к лекарственным препаратам у пациентов, ранее не получавших АРВТ. Также приведены результаты собственных исследований частоты регистрации устойчивости

ВИЧ у 215 больных сочетанной патологией (ВИЧ-инфекция и туберкулез) и 50 больных только ВИЧ-инфекцией за период 2013–2016 гг.

Результаты. А.Л. Сухановой (2006) опубликованы результаты обследования 298 больных ВИЧ-инфекцией из 17 регионов РФ, а Л.В. Петровой (2008) – 63 пациентов из Санкт-Петербурга, ранее не получавших АРВТ. Ни в одном случае не были выявлены мутации в генах обратной транскриптазы или протеазы ВИЧ, ассоциированные с клинически значимой резистентностью к антиретровирусным препаратам. В то же время более чем у 10% пациентов были обнаружены вторичные мутации устойчивости в генах обратной транскриптазы (A62V) и протеазы ВИЧ (M36I, V77I, I93L). По данным А.В. Кравченко и Л.М. Селимовой (2009), у 2 из 45 (4,4%) больных ВИЧ-инфекцией в Московском регионе, ранее не получавших АРВТ, были обнаружены штаммы ВИЧ с первичными мутациями в обратной транскриптазе: M184V – резистентность к ламивудину и эмтрицитабину; K101E – резистентность к эфавирензу (EFV) и невирапину (NVP). Н.Н. Ладная (2010) отмечала, что в РФ мутации лекарственной устойчивости были обнаружены у 2,1% больных ВИЧ-инфекцией, ранее не получавших АРВТ. В 2016 г. Н.М. Гашниковой и соавт. были опубликованы результаты обследования 70 больных ВИЧ-инфекцией в Тюменской области. Лишь у 1 пациента (1,7%) была обнаружена мутация G190E, обуславливающая устойчивость ВИЧ к NVP и EFV.

За период 2013-2015 гг. из 215 образцов, полученных от больных ВИЧ-инфекцией и туберкулезом, мутации резистентности ВИЧ были обнаружены у 4 пациентов (1,9%). У 2 больных имела место мутация D30N, связанная с развитием устойчивости высокого уровня к ингибитору протеазы ВИЧ нелфинавиру, у 1 – мутация V108I, ассоциируемая с резистентностью среднего уровня к NVP (ННИОТ) и у 1 – мутация V32I, связанная с устойчивостью ВИЧ к ингибиторам протеазы (кроме саквинавира). Кроме того, регистрировали мутации полиморфизма, которые в сочетании с другими мутациями могут приводить к снижению чувствительности вируса (в гене обратной транскриптазы – A62V, V90I, E138A; в гене протеазы – L10I, V77I, V36A, L63P).

В 2015-16 гг. нами было обследовано 50 больных ВИЧ-инфекцией, проживающих в Московском регионе, ранее не получавших АРВТ. Мутации резистентности были выявлены у 7 из 50 больных (14%), причем у всех больных к препаратам группы ННИОТ - у 2 (4%) – к EFV и NVP (мутация K103N), а у 5 (10%) - к рилпивирину (E138A/E/G). У 1 - резистентность не только к EFV, NVP, но и к этравирину (E138Q) и у 1 помимо резистентности к рилпивирину выявлена возможная резистентность к этравирину (V179I). Лишь у 1 пациента обнаружен комплекс мутаций (L10I, K20I, E35D, M36I, L89I) в гене протеазы с резистентностью к нелфинавиру.

Обследование 41 больного ВИЧ-инфекцией в Иркутской области при неэффективности схемы АРВТ первой линии (Ю.К. Плотникова и соавт., 2016) показало, что у 1/3 пациентов имела место устойчивость ВИЧ к 1-му классу АРВП (в большинстве случаев к НИОТ – 26,8%), а у 2/3 – полирезистентность (как правило, к комбинации НИОТ+ННИОТ – 48,8%).

Заключение. В течение 10-летнего периода наблюдения отмечено появление мутаций резистентности ВИЧ у 2–4% больных, не получавших ранее АРВТ. В последние 2 года мутации резистентности ВИЧ к препаратам первой линии АРВТ (ННИОТ – EFV и NVP) выявлены у 4% больных ВИЧ-инфекцией Московского региона, ранее не получавших терапию. У 10% больных, не получавших АРВТ, обнаружена мутация E138A/E/G, обусловившая устойчивость вируса к рилпивирину – препарату, ранее применявшемуся крайне редко. У 2 пациентов выявлены мутации резистентности к ингибитору протеазы нелфинавиру, препарату, который на территории России практически уже не применяют. Не обнаружены мутации резистентности ВИЧ к ингибиторам интегразы ВИЧ. Применение в первой линии схемы АРВТ, включающей 2НИОТ + ННИОТ (как правило, EFV), у пациентов с неполной приверженностью терапии может обусловить развитие устойчивости ВИЧ к препаратам этих классов, распространение устойчивых штаммов ВИЧ в популяции пациентов и необходимость проведения теста на резистентность вируса перед назначением терапии. Перед внесением изменений в рекомендации по выбору схем первой линии терапии целесообразно проведение исследований определения чувствительности вируса к препаратам на различных территориях РФ у пациентов до назначения АРВТ.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ В ОБЛАСТИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЭПИДЕМИОЛОГИИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

Свиридова А.А.

ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Быстрое развитие технологий позволяет совершенствовать и приумножать возможные методики получения нуклеотидных последовательностей, способствуя росту теоретической и практической базы молекулярной биологии. В 1985 году была получена первая нуклеотидная последовательность вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) по методу Сэнгера, а спустя 30 лет в GenBank было депонировано более 2,5 миллиона геномов.

Со временем для «классической» методики секвенирования по Сэнгеру был установлен ряд существенных недостатков, среди которых: низкая пропускная способность, ограниченная масштабируемость, чрезмерно высокая стоимость при исследовании большого количества образцов и крупных геномов.

ВИЧ, как и все РНК-содержащие вирусы, представлен в организме множеством похожих, но не идентичных вариантов. Эти высокоизменчивые вирусные популяции обеспечивают вирусу «выживаемость» благодаря ускользанию от иммунной системы хозяина. Они же помогают вирусу вырабатывать устойчивость к антиретровирусным

препаратам (АРВП). При использовании метода Сэнгера для анализа вирусного разнообразия мажорных и минорных вариантов ВИЧ отмечается низкая чувствительность в отношении последних, что связывают с увеличением мажорных вариантов в ходе амплификации. По литературным данным, различные минорные вирусные варианты могут проходить через «генетическое бутылочное горлышко» и в итоге привести к развитию инфекции. Присутствующие в организме пациента минорные варианты ВИЧ, имеющие мутации лекарственной устойчивости, увеличивают риск неудачного выбора терапии. Однако следующее поколение методик «глубокого» секвенирования прекрасно подходит для решения этих задач.

На сегодняшний день известны четыре основные коммерческие платформы для высокопроизводительного секвенирования: 454 Life Sciences (компания Roche), Illumina Genome Analyser (компания Illumina), Ion Torrent (компания Life Technologies Thermo Fisher Scientific) и PacBio (компания Pacific Biosciences). Широкое разнообразие коммерческих технологий имеет ряд отличий между собой по числу, длине и точности чтений, времени работы и стоимости. Нужно отметить, что развитие и совершенствование этих технологий не прекращается и ведет к увеличению уровня пропускной способности наряду со снижением экономических затрат. Уже сейчас высокопроизводительное секвенирование, по сравнению с популяционным, выигрывает в стоимости чтения за один нуклеотид, а также, по сравнению с методиками секвенирования прошлых поколений, способно генерировать на 3-4 порядка больше информации. Исходя из вышесказанного – высокопроизводительное секвенирование является мощным инструментом для выявления минорных вариантов ВИЧ, оценки первичных сроков инфицирования, описания эволюционной динамики внутри организма с течением времени и в присутствии АРВП.

Большую роль играет применение NGS в различных областях молекулярной эпидемиологии, в частности, на этапе определения генетического родства в ходе расследования вспышек ВИЧ-инфекции. Fernandez-Caballero J.A. и Zhao Q. являются пионерами в данном направлении, ими были опубликованы работы, демонстрирующие явное преимущество и революционность метода [1, 2].

Есть и некоторые затруднения, возникающие при анализе данных, связанных с использованием методики высокопроизводительного секвенирования: достоверная оценка точности и чувствительности метода. В связи с чем должны быть учтены два типа артефактов: замены и ошибки в виде инсерций/делеций и рекомбинация in vitro. Оба типа могут привести к ошибочной оценке разнообразия вирусной популяции. Ошибки обратной транскриптазы в ходе получения кДНК – ещё один из факторов, влияющих на достоверность полученных результатов. Важно отметить, что «артефактную» изменчивость трудно отличить от реальной, особенно для ВИЧ, так как скорость мутаций высока и также часто встречается рекомбинация in vivo [3].

Число зарубежных публикаций по данной теме очень мало, а в нашей стране они полностью отсутствуют, поэтому существует острая необходимость валидации и внедрения метода глубокого секвенирования в эпидемиологическое расследование.

Долгое время важную роль в характеристике вирусов, циркулирующих в популяции, занимает метод секвенирования ДНК по Сэнгеру и филогенетический анализ полученных результатов. Однако секвенирование нового поколения уже сегодня позволяет более комплексно анализировать большее количество данных, включая полные геномы. Также методика может использоваться для характеристики новых рекомбинантных форм ВИЧ и определения распространенности ВИЧ-инфекции (для улучшения расследования передачи), исследования эволюции ВИЧ внутри одного организма. Особенно актуально использование данного метода в области молекулярной эпидемиологии для выявления и характеристики случаев суперинфекции ВИЧ, определения длительности инфицирования и сроков заражения.

Внедрение высокопроизводительного секвенирования в вирусологическую практику способствует увеличению значимости молекулярных исследований. В результате стало возможным: обнаружение новых вирусов, что повлекло за собой совершенствование вирусной систематики и классификации; получение объективной характеристики для новых вирусных популяций в составе вирусного метагенома; изучение молекулярной эпидемиологии; вирусного разнообразия и эволюции, как внутри одного организма, так и в популяции в целом, а также процессов передачи и патогенеза заболевания.

Список литературы

1. Zhao Q. Short communication: investigating a chain of HIV transmission events due to homosexual exposure and blood transfusion based on a next generation sequencing method. // AIDS Res Hum Retroviruses. 31(12):1225-9, 2015.

2. Fernandez-Caballero J.A. A safe an easy method for building consensus HIV sequences from 454 massively parallel sequencing data. // Enferm Infecc Microbiol Clin. 2016.

3. Giallonardo F. D. Next-generation sequencing of HIV-1 RNA genomes: determination of error rates and minimizing artificial recombination. // PLoS ONE 8(9): e74249, 2013.

ПРОИСХОЖДЕНИЕ И РАСПРОСТРАНЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ФОРМ ВИЧ-1, ВЫЯВЛЕННЫХ В БЕЛАРУСИ

Сосинович С.В., Еремин В.Ф., Гасич Е.Л.

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Введение. Первый случай ВИЧ-инфекции на территории Беларуси был выявлен в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (БелНИИЭМ) в 1986 г. у студента из Бурунди. В 1990 г. был зарегистрирован первый случай СПИД в стране у женщины – жительницы Беларуси. С 1986 по 1996 г. количество случаев ВИЧ/СПИД, выявляемых еже-

годно в Беларуси, варьировало от 12 до 14, и на 1 января 1996 г. было официально зарегистрировано 113 случаев ВИЧ-инфекции. Эпидемия ВИЧ-инфекции в Республике Беларусь началась в г. Светлогорске. Летом 1996 г. там было зафиксировано 60 случаев ВИЧ-инфекции, а на 1 ноября 1997 г. общее число случаев ВИЧ-инфекции составило уже 1728, 85% из которых выявлено у потребителей инъекционных наркотиков (ПИН). Молекулярные исследования показали, что вспышка была вызвана ВИЧ-1 субтипа А1, который был генетически идентичен вирусам у ПИН в Южной Украине и Центральной и Южной России.

По состоянию на 1 января 2017 г. в Республике Беларусь зарегистрировано 22 218 случаев ВИЧ-инфекции.

Цели и задачи. Определить и дать молекулярно-генетическую характеристику рекомбинатным формам ВИЧ-1:

- определить субтипы ВИЧ-1 у ВИЧ-инфицированных пациентов;
- выявить рекомбинантные формы ВИЧ-1;
- определить направление заноса рекомбинантных форм на территорию Республики Беларусь.

Материалы и методы. Исследовано 303 образца сыворотки/плазмы крови. Анализ нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1, изолированного из полученных образцов, проводили методом секвенирования по участку гена pol. Для синтеза фрагментов гена *pol* были использованы: диагностическая тест-система «ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System» (Abbott Molecular, США) и диагностическая тест-система «Бел ВИЧ-1-резистентность-генотип» (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Беларусь). Электроферограммы исследуемых образцов были получены на генетическом анализаторе ABI PRISM® 3100-Avant™ Genetic Analyzer. Выравнивание сиквенсов проводилось с помощью алгоритма ClustalW. Поиск генетически близких референсных сиквенсов ВИЧ осуществлялся с помощью BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Филогенетические деревья строились с применением алгоритма ML (maximum likelihood) в программе PHYML. Для расчёта статистической достоверности кластеров использовался тест SH-aLRT.

Результаты. Проведенные исследования по генотипированию показали, что ВИЧ-1 субтипа А1 в анализируемый период оставался доминирующим на территории Беларуси. На его долю, среди всех исследованных 303 образцов ДНК, приходилось 275 случаев, что составляло 90,7%. Кроме субтипа А1, было выявлено 9 случаев инфицирования ВИЧ-1 субтипа В (3,0%), по 2 случая приходилось на инфицирование субтипами С и G (по 0,7%). В 15 (4,9%) образцах были выявлены рекомбинантные формы ВИЧ-1. Более половины случаев от всех обнаруженных рекомбинантных форм приходилось на CRF03_AB – 8 (2,6%), на CRF02_AG – 4 (1,3%), на CRF06_cpx – 2 (0,7%), и в одном случае выявлена уникальная рекомбинантная форма (УРФ) между субтипами А и В.

Циркулирующая рекомбинантная форма CRF02_AG. Методом филогенетического анализа было установлено три независимых события заноса данной ЦРФ на территорию страны. На филогенетическом дереве образец RES_649 сформировал кластер с референсными сиквенсами из Нигерии, Буркина-Фасо, Сенегала и Великобритании, значение SH-aLRT составило 0,946. Образец FN995208 формировал достоверный кластер с референсными сиквенсами из Камеруна, значение SH-aLRT составило 0,966. Образцы Mn_59 и Mn_60 находились в кластере, сформированном референсными сиквенсами ВИЧ-1 из Узбекистана, которые, в свою очередь, были изолированы и секвенированы от ВИЧ-инфицированных пациентов, вовлеченных во вспышку в этой стране, связанной с Западно-Африканской рекомбинантной формой CRF02_AG.

Циркулирующая рекомбинантная форма CRF03_AB. При филогенетическом анализе выявленных CRF03_AB не было выявлено ни одного достоверного кластера, сформированного как исследуемыми образцами, так и референсными последовательностями ВИЧ-1.

2 кластера со значениями SH-aLRT 0,996 и 1 были сформированы образцами из Беларуси, Gr_3/Gr_8 и MnObl_15/Mg_8 соответственно. Это достоверно указывает на один общий предок для каждой пары в кластере и говорит о внутреннем распространении CRF03_AB на территории Беларуси. Отсутствие связей остальных исследуемых образцов между собой говорит об их независимом проникновении на территорию страны. Таким образом, рекомбинантная форма CRF03_AB была занесена 5 раз и в двух случаях привела к передаче вируса уже на территории Республики Беларусь.

Циркулирующая рекомбинантная форма CRF06_cpx. Исследуемые образцы MnObl_27 и MnObl_28 формировали кластер с референсными сиквенсами из Эстонии, значение SH-aLRT кластера составило 1. Кроме этого, оба исследуемых образца формировали субкластер между собой, значение SH которого 0,904, что свидетельствует об одном источнике их заражения. Таким образом, по результатам филогенетического анализа, занос CRF06_cpx на территорию Беларуси следует считать единичным событием. Дальнейшей передачи вируса внутри страны в ходе молекулярно-эпидемиологического скрининга выявлено не было.

Заключение. На протяжении 2008-2015 гг. субтип А1 оставался доминирующим в эпидемии ВИЧ-инфекции на территории Республики Беларусь во всех группах населения: потребителей инъекционных наркотиков, лиц, инфицированных половым путем, а также у детей, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями. На долю данного субтипа пришлось 90,7% (275 из 303) проанализированных случаев ВИЧ-инфекции. Кроме субтипа А1, на территории Беларуси были выявлены ВИЧ-1 субтипов В, С, G. Установлено 15 случаев ВИЧ-инфекции, вызванных рекомбинантными формами ВИЧ-1, что составляет 4,9% от всех случаев ВИЧ-инфекции на территории Беларуси. Более половины всех случаев (8 из 15) приходится на CRF03_AB, четыре случая вызваны CRF02_AG, два случая – CRF06_cpx. В одном случае выявлена уникальная рекомбинантная форма ВИЧ-1 между субтипами А и В.

Рекомбинантные формы ВИЧ были занесены на территорию Республики Беларусь в результате множественных событий, не имеющих эпидемических связей. Передача вируса на территории страны установлена только в двух случаях, оба относятся к распространению CRF03_AB.

УГРОЗА ИНФЕКЦИИ ВИЧ ЧЕЛОВЕЧЕСТВУ

Абдулхакимов А.Р.

Ферганский филиал Ташкентской медицинской академии, Фергана, Узбекистан

СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита, впервые описанный в 1981 году, с открытием вируса иммунодефицита человека Jl. Монтаньи и Б. Синуси в 1983 году приобрел официальное название как ВИЧ (вирус иммунодефицита человека) – инфекция, которая известна как тяжелая, многогранная болезнь, проявляющаяся поражением различных органов и систем организма с присоединением вторичных и оппортунистических инфекций, опухолями и прогрессированием болезни. Это стало причиной к выделению ВИЧ/СПИДа как самостоятельной междисциплинарной проблемы.

Цель. Показать проблему СПИДА во всем мире.

По известным данным Всемирной организации здравоохранения и глобальной программы UNAIDS, количество ВИЧ-инфицированных в мире в 2009 году достигло 40 миллионов человек. Ежегодно регистрируется около 2,5 миллиона новых случаев ВИЧ-инфекции и до 2 миллионов смертей пациентов в стадии СПИДа (UNAIDS, 2009). Экспертами ВОЗ заболевание ВИЧ/СПИДом рассматривается как угроза безопасности жизнедеятельности человечества и представляет угрозу национальной безопасности многих стран мира.

По мнению В.В. Покровского (2008), ВИЧ-инфекция является объективной демографической угрозой и серьезнейшей проблемой отечественного здравоохранения. Ее заразность, стремительное распространение и неизлечимость снискали заболеванию славу «чумы XX века». По некоторым данным, в последние годы отмечена активация полового пути передачи ВИЧ-инфекции.

Важной задачей в настоящее время является организация системы диспансеризации наркозависимых пациентов с ВИЧ-инфекцией, профилактика передачи ВИЧ инфекции от матери к ребенку, снижение частоты которой до 1-2% является одной из актуальных задач здравоохранения, обеспечение вирусной безопасности крови и ее компонентов при гемотрансфузиях, разработка эффективных методов лечения оппортунистических и вторичных инфекций. Широкая распространенность ВИЧ-инфекции во всем мире, и особенно в мегаполисах, обуславливает огромную социальную, демографическую, экономическую и медицинскую значимость этого заболевания и определяет необходимость разработки и проведения комплекса организационно-правовых, профилактических, эпидемиологических и клинико-диагностических мероприятий по проблеме ВИЧ-инфекции и сочетанных с ней состояний.

ВИЧ-инфекция стала проблемой, определяющей демографию и смертность населения целых континентов. В связи с этим политические лидеры многих стран мира объединяли свои усилия, создавая программы профилактики и борьбы с заболеванием, неуправляемый рост которого за 2 десятилетия привел к увеличению числа инфицированных в мире с 20 до 40 миллионов человек.

Вывод. Одна из крупных медико-социальных проблем – это разработка и обоснование концепции, структурно-функциональной модели, принципов и технологий работы многокомпонентной службы профилактики и борьбы со СПИДом в мегаполисе, а также ее организационно-методическое обеспечение в условиях угрозы ВИЧ-эпидемии, большого числа ВИЧ-инфицированных лиц и групп риска.

ПОКАЗАТЕЛИ РАСПРОСТРАНЁННОСТИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ СРЕДИ ТРУДОВЫХ МИГРАНТОВ ФЕРГАНСКОЙ ОБЛАСТИ

Кодиров Б.А.[1], Расулов У.М.[1], Уралова Н.О.[1], Расулов Ф.Х.[2]

[1] Ферганский областной центр борьбы со СПИДом

[2] Ферганский филиал Ташкентской медицинской академии, Узбекистан

В настоящее время ВИЧ-инфекция является глобальной проблемой, т.к. она представляет серьёзную угрозу социальной и экономической стабильности стран. Эпидемия приводит к увеличению затрат в сфере здравоохранения, приобретая характер пандемии и поражая все слои общества, и представляет собой особый вид кризиса.

Мигранты, являясь важным звеном экономического развития, составляют значительную и растущую долю населения. По аналитическим оценкам, в поисках работы за границу ежегодно мигрирует более 3% населения планеты. Трудовые мигранты больше подвержены риску инфицирования ВИЧ половым путем, чем немигрирующее население.

Цель исследования. Изучение тенденции путей передач ВИЧ-инфекции среди трудовых мигрантов Ферганской области.

Материалы и методы. Государственная статистическая отчетность, эпидемиологические и статистические данные Ферганского областного центра по борьбе со СПИДом.

Результаты и обсуждение. По отчетным данным, сотрудниками центра по борьбе со СПИДом в 2013 году всего обследовано 23455 трудовых мигрантов на наличие ВИЧ-инфекции, в 2014 году обследовано 53680 человек, а в 2015 г. – 41276 человек. В течение 2013–2015 гг. всего обследовано 118411 человек. По результатом анализов, проведенных в 2015 г., по сравнению с показателями 2013 г. количество выявляемости случаев ВИЧ-инфекции повысилось в 3 раза. Среди обследованых 118411 трудовых мигрантов в 258 случаях диагностирована ВИЧ-инфекция методом иммуноблоттинга.

При анализе ВИЧ-инфицированных мигрантов по полу было установлено, что удельный вес мужчин

составил 84,1%, а женщин – 15,9%. Возраст трудовых мигрантов составляет: 20-24 года – 5,3%, 25-29 лет – 24,6%, 30-34 лет – 19,3%, 35-39 лет – 28,1%, 40-49 лет – 22,8%.

По данным эпидемиологических исследований, выявлено, что в 92,6% случаев обследованные заразились ВИЧ-инфекцией в результате беспорядочных половых связей, в 2,7% случаев – при внутривенном введении наркотических средств.

Выводы

1. Показатели выявляемости ВИЧ-инфекции среди трудовых мигрантов, обследованных в 2015 г., в 3 раза выше по сравнению с прошедшими обследование в 2013 году.

2. Заражение ВИЧ-инфекцией половым путем составило 92,6% и парентеральным – 2,7%.

3. Основную долю ВИЧ-инфицированных трудовых мигрантов составляют мужчины (84,1%) в возрасте 25-39 лет (72%).

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ В ДИАГНОСТИКЕ ВТОРИЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У БОЛЬНЫХ С ИММУНОСУПРЕССИЕЙ

Шахгильдян В.И.[1], Ядрихинская М.С.[2], Шипулина О.Ю.[1], Сафонова А.П.[1], Альварес-Фигероа М.В.[1], Долгова Е.А.[1], Домонова Э.А.[1]

[1] ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия
[2] Московский городской центр по профилактике и борьбе со СПИДом, Москва, Россия

Введение. В России сохраняется рост числа больных на стадии СПИДа, больных, нуждающихся в стационарном лечении, увеличивается количество летальных исходов от ВИЧ-инфекции. ФНМЦ ПБ СПИД: 2005 г. – 1 600 больных на стадии СПИДа, 2014 г. – 36 119, 2017 г. (январь) – 54 160 чел. В РФ за 9 мес. 2016 г. – 19 979 случаев смерти больных ВИЧ-инфекцией (на 9,2% больше, чем за 9 мес. 2015 г.). В 2017 г. у 25,6% лиц причиной летального исхода были вторичные заболевания. Среди российских больных, имевших стадию СПИДа, большинство (44 988, 83,1%) погибли. Одна из причин – поздняя диагностика вторичных заболеваний и несвоевременное начало этиотропной терапии.

Цель. Определение диагностического значения выявления ДНК возбудителей вторичных заболеваний в различных биологических материалах у больных ВИЧ-инфекцией.

Материалы и методы. В 2007-2013 гг. обследовано 4133 стационарных пациента на стадии вторичных заболеваний (CD4+ <200 кл/мкл – 75%). Возраст: 35$\pm$5,3 лет. Исследовано 6847 биоматериалов (образцов крови, БАЛЖ, СМЖ и др.) на наличие и количественное определение ДНК *M. tuberculosis, Cytomegalovirus, T. gondii, P. jiraveci,C. albicans, C. glabrata, C. cruzei, C. neoformins, H. SimplexI-II, HerpesVI, ВЭБ, JC*-вируса, РНК ВИЧ молекулярными методами (ПЦР-тест-системы ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии»).

Результаты. Спектр и частота вторичных заболеваний у 4145 больных на стадии 4Б-4В (СПИД): туберкулез – 1498 (36,1%), висцеральный кандидоз – 1089 (26,3%), манифестная ЦМВИ – 669 (16,1%), менингоэнцефалит н/э/ВИЧ-энцефалит – 499/58 (12%/1,4%), пневмонии возвратные – 442 (10,7%), РСР – 437 (10,5%), токсоплазмоз – 251 (6%), лимфопролиферативные заболевания – 96 (2,3%), саркома Капоши – 87 (2,1%), атипичный микобактериоз – 38 (0,9%), мультифокальная лейкоэнцефалопатия – 35 (0,8%), рак шейки матки –19 (0,5%), криптококковый менингит/генер.криптококкоз – 18(0,4%)/7(0,1%), криптоспоридиоз кишечника – 14 (0,3%), ВПГ-бронхит/пневмония, генерал. сальмонеллез – единичные случаи. Качественное выявление ДНК ЦМВ в клетках крови имело низкое клиническое значение: специфичность 65,5% при 100% чувствительности. Максимальное диагностическое значение показателя 3.0 lg ДНК ЦМВ и более в 10^5 лейкоцитах (клиническая чувствительность 72,9%, специфичность 99,7%) и наличия ДНК ЦМВ в плазме крови >10 000 коп/мл. При ЦМВ-пневмонии диагностическая чувствительность наличия ДНК ЦМВ в БАЛЖ – 90%, специфичность – лишь 66% (ДНК ЦМВ в БАЛЖ:61% <1000 коп/мл, 20% 1000-10000, 12% 10000-100000, 7% >100000 коп/мл). Диагностическое значение имеет ДНК ЦМВ >100000 коп/мл. Клиническая чувствительность наличия ДНК ЦМВ в биоптатах бронхов (ББ) 79%, специфичность 92%, при количестве ДНК ЦМВ от 169 до 90972 копий (15,3%>1000 коп.). В плевральной жидкости (ПЖ) ДНК ЦМВ: 100-17900 коп/мл. В биоптатах кишечника ДНК ЦМВ: 99-444834 коп. (23% <1000 коп. 7,7% 1000-10000, 23% 10000-100000, 11,5% >100000 коп.). ДНК ЦМВ в СМЖ: 100-850 600 коп/мл (8,8% <1000 коп/мл, 2% 1000-10000, 0,8% 10000-100000, 0,26% >100000 коп/мл). Диагностическое значение: ДНК ЦМВ >10 000 коп/мл в СМЖ. При поражении ЦНС в СМЖ ДНК ВПГ – 1,2-3%, ДНК ВВЗ – 1,3%, ДНК ВГЧ-6 – 1,3% сл. (400-24100 коп/мл). ДНК ВЭБ в крови 25,6% сл. (1,0-3,3 lg), мокроте 67%, БАЛЖ 44,5% (100-26385100 коп/мл), ББ 15,3%, ПЖ 50%, биоптатах л/у 64%, кишечника 19,2%, СМЖ 28,5% сл. (100-636500 коп/мл, 83% сл. <1000 коп/мл, 11% 1000-10000, 4% 10000-100000, 2% >100000 коп/мл). При лимфоме гол. мозга ДНК ВЭБ в СМЖ: <1000 коп/мл – 20% б-х, 1000–10000 коп/мл – 47%, 10000-100000 коп/мл – 20%, >100 000 коп/мл – 13%. При соответствующем ТБ-поражении чувствительность обнаружения ДНК МБТ в мокроте – 44,8%, БАЛЖ – 58,3%, ББ – 56%, ПЖ –68,6%, СМЖ – 54%, биоптатах л/у – 93,7% при 100% специфичности. ДНК T.gondii в СМЖ у больных ТОХ составила 42,9% при 100% специфичности. У больных пневмонией ДНК P. jiraveci в мокроте – 17%, БАЛЖ – 11%, биоптатах л/у – 6,6% сл. При отсутствии ДНК РСР в БАЛЖ РСР не зарегистрирована. У 11 б-х с ДНК JC-вируса в СМЖ: в 7 сл. – «мультифокальная лейкоэнцефалопатия», 4 сл. – «многоочаговое поражение г. м. неуточненной этио-

логии». При поражении дыхательной системы в БАЛЖ ДНК C. albicans 20,2% сл. (5 - 360818 коп/мл; 95% <1000, 3% 1000-10000; 2%>10000 коп/мл; C.glabrata 10% сл. (5 - 552846 коп/мл; 96%: <1000, 3%1000-10000, 1% >10000 коп/мл); C.krusei 2,3% сл. (5 - 6938 коп/мл, 99% <1000, 1% >1000 коп/мл). При поражении ЦНС в СМЖ ДНК Cr. neoformins 4,2% (255 - 1180400 коп/мл, 1% <1000, 1,3% 1000-10000, 0,5% 10000-100000, 1,3% >100000 коп/мл). Чувствительность и специфичность наличия ДНК Cr. neoformins в СМЖ около 100%.

Выводы. Использование молекулярных методов для выявления возбудителей оппортунистических заболеваний у больных ВИЧ-инфекцией играет центральную роль в своевременной и точной постановке этиологического диагноза вторичных патологий.

ДАННЫЕ ТЕКУЩЕГО МОНИТОРИНГА ЭПИДЕМИИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ В НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ

Муранкина В.Р.[1], Власов Е.В.[1], Ивлев В.В.[1], Тотменин А.В.[1], Гашникова М.П.[1], Мирджамалова Ф.О.[2,1], Соколов Ю.В.[2], Казаева Е.В.[2], Гашникова Н.М.[1]

[1]ФБУН «ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Россия
[2] ГБУЗ НСО ГИКБ №1, «Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», Новосибирск, Россия

Введение. Начиная с 2008 года в Новосибирской области (НСО) регистрируется значительная активизация эпидемии ВИЧ-инфекции. При этом регистрируется не только стремительное увеличение числа новых случаев заражения ВИЧ в популяции потребителей наркотиков, вирус вышел из групп риска и начал свое распространение среди всего населения области. Последние годы НСО стабильно занимает 3-4 места в общероссийском рейтинге по показателю заболеваемости ВИЧ-инфекцией, относясь к наиболее неблагополучным регионам по скорости распространения эпидемии. В 2013 г. после очередной регистрации подъема заболеваемости ВИЧ-инфекцией и роста количества ВИЧ+ лиц, зараженных половым путем, показатель распространенности среди беременных в НСО превысил 1%. В настоящее время в НСО продолжает развиваться генерализованная стадия эпидемии ВИЧ-инфекции, на начало 2017 г. в НСО зарегистрировано 32989 случаев ВИЧ-инфекции.

Цель и задачи. Целью данного исследования являлось осуществление текущего анализа разнообразия циркулирующих на территории НСО генетических вариантов ВИЧ-1 с целью изучения молекулярно-генетических особенностей современной эпидемии.

Материалы и методы. Сбор образцов крови от ВИЧ-положительных пациентов, анкетирование доноров крови выполнялось совместно со специалистами Новосибирского областного центра по профилактике и борьбе со СПИД. Выделение РНК из отобранных образцов проводилось набором «ДельтаМаг ВГВ/ВГС/ВИЧ» («Вектор-Бест», Россия), с использованием системы лабораторных праймеров и реагентов для постановки реакции ОТ и ПЦР («Биолабмикс», Россия) нарабатывались вирус-специфические фрагменты генома, кодирующие области гена pol (протеаза, ревертаза, интеграза) и область env (основной белок оболочки, env) ВИЧ-1. Расшифрованные нуклеотидные последовательности фрагментов генов pol и env сравнивались с референс-последовательностями различных субтипов и рекомбинантных форм ВИЧ-1 из международной базы данных (LosAlamosHIV-1 database) с применением программ ClustalWMultiplealignment и BioEditsoftware 7.2.5. Филогенетический анализ выполняли с помощью MEGA 6.0.6, используя метод объединения ближайших соседей (neighbor-joiningmethod,NJ) с бутстрепом 1,000 повторов на основе двухпараметрической модели Кимуры. Статистическую значимость топологии филогенетического дерева оценивали с помощью анализа бутстрепов.

Основные результаты. В исследование вовлечено 78 ВИЧ+ пациента, среди них 62,3% мужчин и 37,7% женщин; 45,3% из них сообщили об употреблении инъекционных наркотических препаратов, 30,2% человек принимают антиретровирусную терапию (АРВТ). Из собранных клинических образцов крови были выделены нуклеиновые РНК/ДНК ВИЧ-1, получены и секвенированы вирус-специфические фрагменты для четырех областей генома, как описано ранее. Проведение филогенетического анализа для полученных нуклеотидных последовательностей позволяет заключить, что на территории НСО развитие эпидемии по-прежнему, начиная с 2009 года, определяет генетический вариант CRF63_02A1 ВИЧ-1 (впервые выявленный нами в 2006 и описанный в 2011 году), распространенность которого составила 83%. В 12,7% образцов выявлен субтип А ВИЧ-1, а в 4,3% случаев выявлены уникальные рекомбинантные формы ВИЧ-1 (URF), прародителями которых являлись ВИЧ-1 субтипа А и CRF63_02A1.

Молекулярно-эпидемическая ситуация в НСО является типичной для регионов СФО, характеризующихся высокими темпами развития эпидемии и преобладанием распространения вируса среди ПИН. Пожалуй, особенностью таких территориальных эпидемий в 2014-2015 гг. является лишь процент выявляемости уникальных рекомбинантных форм ВИЧ-1 на основе CRF63_02A1, данный показатель варьирует от 4 до 21%. В случае с НСО сравнительно небольшое количество случаев регистрации новых генетических вариантов ВИЧ-1 объясняется не тем, что эпидемическая ситуация не способствует повторному заражению ВИЧ. Зарегистрировать такие события достаточно сложно, для этого необходимо проводить не только молекулярно-биологические исследования ВИЧ, но и эпидемическое расследование данного случая. Как показывают единичные случаи выявляемой суперинфек-

ции (повторное заражение ВИЧ-1), такие случаи в наших регионах встречаются примерно с равной частотой. В отличие от соседних с НСО областей, где до недавнего времени параллельно циркулировали разные геновариванты вируса, большая часть ВИЧ+ лиц, проживающих в НСО начиная с 2010 года, инфицирована генетическим вариантом CRF63_02A1 ВИЧ-1. Поэтому при суперинфекции в таких случаях (при повторном инфицировании человека вирусом одного и того же генетического варианта), даже после случившихся рекомбинационных событий между вариантами ВИЧ-1, в организме ВИЧ-инфицированного не возникают генетические варианты с новой мозаичной структурой генома ВИЧ-1.

Кроме генотипирования ВИЧ-1 в работе проводятся выявление и анализ встречаемости мутаций ВИЧ-1, связанных с резистентностью вируса к АРВП. Показано, что распространенность первичных мутаций резистентности в области находится на уровне 6,4%. Обращает на себя внимание факт выявления первично резистентных ВИЧ-1 в клинических образцах, полученных от лиц, не принимавших АРВТ, ранее находившихся в местах лишения свободы. Среди лиц с неэффективностью АРВТ резистентность/полирезистентость ВИЧ-1 была выявлена в 19,4%. Анализ клинико-эпидемических данных этих пациентов позволил заключить, что основной причиной развития резистентности ВИЧ-1 явилась низкая приверженность ВИЧ-инфицированных к АРВТ.

Заключение. Характер эпидемической ситуации по распространению ВИЧ-1 в Новосибирской области, характеризовавшийся существенными изменениями по структуре циркулирующих вариантов вируса с 2006 по 2010 год, стабилизировался. Возникший в начале 2000-х генетический вариант CRF63_02A1 ВИЧ-1 сформировал на данной территории свой очаг, распространился не только среди разных слоев населения НСО, но и среди населения соседних территорий, и в настоящее время определяет развитие современной эпидемии на значительной части СФО. Выявление первично резистентных ВИЧ-1 указывает на необходимость усиления профилактической работы среди определенных категорий населения.

ОСОБЕННОСТИ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ВИЧ-1 С УЧЕТОМ РАЗВИТИЯ СОВРЕМЕННЫХ ТЕРРИТОРИАЛЬНЫХ ЭПИДЕМИЙ

Тотменин А.В., Астахова Е.М., Ивлев В.В., Зырянова Д.П., Гашникова М.П., Власов Е.В., Муранкина В.Р., Гашникова Н.М.

ФБУН «ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Россия

Введение. Характерной особенностью многих территориальных эпидемий в последние годы становится увеличение генетической гетерогенности циркулирующих вариантов ВИЧ-1. Целью настоящей работы являлась оптимизация методических подходов к молекулярно-генетическому исследованию ВИЧ-1 для корректного анализа изменчивости популяции современных распространяющихся вариантов вируса.

Материалы и методы. Проведено исследование геновариантов ВИЧ-1, выделенных из 422 клинических образцов, собранных от ВИЧ-инфицированных лиц, проживающих на отдельных территориях России (Новосибирской, Томской, Кемеровской, Свердловской, Тюменской областей, Алтайского края) и Республики Узбекистан. Из плазмы крови выделена РНК, для вариантов ВИЧ-1 с помощью лабораторной системы праймеров получены вирусные фрагменты, кодирующие протеазу-ревертазу, интегразу и основной белок оболочки (PRO-RT, IN, env) ВИЧ-1. Для фрагментов ВИЧ-1 определена нуклеотидная последовательность и проведен филогенетический и рекомбинационный анализы.

Основные результаты. Обследованная группа включала 51,8% мужчин и 48,2% женщин, 64% относились к ПИН, 36% были инфицированы половым путем. Для 79% пациентов диагноз «ВИЧ-инфекция» был поставлен впервые. Среди ПИН 82% лиц имели практику употребления солевых/синтетических психостимуляторов, 18% ПИН, инфицированных более 7-10 лет назад, употребляли героин. Исследование генетической гетерогенности циркулирующих ВИЧ-1 выявило территориальную специфику их распространения. На всех территориях Сибири (Новосибирская, Томская, Кемеровская области, Алтайский край) преобладает CRF63_02A1 и вторичные рекомбинантные формы ВИЧ-1 на основе CRF63_02A1. Новые рекомбинантные последовательности между субтипами или CRF были проанализированы с помощью программ идентификации рекомбинации (RIP http://www. hiv.lanl.gov) и SimPlot 3.5.1, используя окно 200 нуклеотидов, и построением филогенетического дерева NJ, используя двухпараметрическую модель Кимуры. Показано, что в регионах Сибири регистрируются разнообразные уникальные рекомбинантные формы ВИЧ-1 (URF63_A1, URF63_02AG, URF63_B), распространенность которых варьирует от 5% до 20% от общего количества исследованных ВИЧ-1. В отличие от территорий Сибири, в Уральском регионе (Тюменская, Свердловская области) доминирует субтип А1 ВИЧ-1 и в единичных случаях выделяются субтип В и URF63_A1 ВИЧ-1. В Республике Узбекистан современную эпидемию определяют специфические среднеазиатские варианты CRF02_AG ВИЧ-1, формирующие свой кластер на филогенетическом дереве. В связи с активными потоками трудовых мигрантов из Средней Азии в Россию и обратно, естественно, в эти страны эпизодически происходят заносы неспецифических вариантов ВИЧ-1. На территориях, характеризующихся высокой активностью распространения ВИЧ-инфекции/распространением ВИЧ в группах лиц рискованного поведения, где одновременно циркулируют отличающиеся геновариванты вируса, как правило, со временем начинается регистрация случаев суперинфекции и появление уникальных рекомбинантных форм ВИЧ-1. Так как геномы URF ВИЧ-1 имеют мозаичную структуру, отличающуюся как по рас-

положению сайтов рекомбинации, так и по их количеству, выявляемость URF ВИЧ-1 в значительной степени зависела от количества и размера исследуемых областей генома вируса. Разработанная нами схема анализа нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1, включающая области PRO-RT (1400-1800 нт), IN (900-1300 нт) и env (700-1500 нт) позволяла по большей части выявлять URF при генотипировании вирусов по отдельным областям их генома. Дополнительное осуществление сравнительного ген-специфического определения генотипа вируса по областям PRO, RT, IN и env давало возможность выявить мозаичные формы вирусов с областями рекомбинации, не попадающими в расшифрованные участки генома, что значительно повышало выявляемость вторичных URF ВИЧ-1.

Заключение. Исследование характеристик отдельных территориальных эпидемий ВИЧ-инфекции позволяет заключить, что увеличение генетического разнообразия современных ВИЧ-1 связано как с эволюционными изменениями генома циркулирующих вариантов ВИЧ, так и с появлением большого количества новых рекомбинантных форм вируса, имеющих как повторяющуюся (CRF), так и уникальную (URF) мозаичную структуру генома. В регионах России со значительной распространенностью CRF63_02A1 ВИЧ-1 для корректного выявления URF вируса генотипирование рекомендуется осуществлять одновременно не менее чем по двум отдельным областям генома ВИЧ-1, вовлекая в исследование лиц с повышенными факторами рискованного поведения.

Высокая степень изменчивости ВИЧ-1 и стремительный рост распространенности отличающихся геновариантов вируса на территориях РФ должна быть учтена не только при разработке новых профилактических анти-ВИЧ препаратов. Изменение в нуклеотидных последовательностях генов-мишеней для ПЦР-диагностики может влиять на качество (чувствительность, количественные характеристики) ПЦР-тестов, что обязаны четко отслеживать фирмы-разработчики тест-систем на основе ПЦР.

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ВЫЯВЛЕНИЮ ВИРУСОВ ГЕПАТИТА С, ГЕПАТИТА В И ВИЧ В ЭЯКУЛЯТЕ

Горская О.А.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Введение. В настоящее время проблема бесплодия и невынашивания беременности является весьма серьезной для современного здравоохранения, в связи с чем возрастает значение вспомогательных репродуктивных технологий [5]. Одновременно проблема широкого распространения трансмиссивных инфекций, в т.ч. *ВИЧ-инфекции, гепатита В, гепатита С* ставит под угрозу здоровье дискордантных пар и увеличивает возможность вертикальной передачи инфекции [1, 2, 3]. Обследование эякулята у пациентов с выявленными вышеперечисленными инфекциями представляется весьма перспективным исследованием. Но в то же время результаты по выявлению вирусов в цельном эякуляте с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) довольно противоречивы из-за ингибирующих свойств самого материала [4, 6].

Целью работы стала разработка методического подхода для обнаружения *вирусов гепатитов С, В, ВИЧ* в цельном эякуляте. Задачами исследования стал подбор вариантов выделения нуклеиновых кислот из материала пациентов, оценка достоверности получаемых результатов.

Материалы и методы. За период 2015-2016 гг. исследовалась цельная сперма от 26 пациентов отделения вспомогательных репродуктивных технологий (ОВРТ). Для выделения нуклеиновых кислот вирусов использовали комплекты реагентов «РИБО-золь-С» и «АмплиПрайм РИБО-преп». Амплификацию проводили в режиме реального времени на тест-системах «АмплиСенс HCV-FL» (чувствительность 100 МЕ/мл), «АмплиСенс HBV-FL» (чувствительность 50 МЕ/мл), АмплиСенс «HCV/HBV/HIV-FL» (чувствительность 50 МЕ/мл/25 МЕ/мл/100 копий/мл). Все реагенты производства ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва.

Основные результаты. Для выявления *РНК HCV* использовали комбинированный метод экстракции: обрабатывали цельную сперму с помощью набора «РИБО-золь-С», затем продолжали работу с водной фазой, содержащей РНК, на наборе «АмплиПрайм РИБО-преп». При анализе результатов амплификации Ct ВКО в образцах спермы укладывались в граничные значения порогового цикла Ct, а сдвиг по ВКО у образцов относительно ВКО отрицательного контрольного образца в среднем составил 1,32 Ct, что указывает на достоверность результатов исследования. В образцах спермы всех пациентов, обследованных таким образом на *HCV* (11 человек), *вирус гепатита С* выявлен не был.

При одновременном исследовании цельной спермы на *вирусы HCV, HBV, HIV* также использовали комбинированный метод экстракции. Ct ВКО в образцах спермы укладывались в граничные значения порогового цикла Ct, а сдвиг по ВКО у образцов относительно ВКО отрицательного контрольного образца в среднем составил 1,5 Ct. Значения положительного контроля выделения (ПКО) *РНК HCV* и *РНК HIV* укладывались в граничные значения. В пяти случаях одновременного исследования *РНК HCV* и *РНК HIV* выявлены не были.

Однако исследователи столкнулись с тем, что при анализе результатов амплификации отсутствовало значение Ct положительного контроля выделения (ПКО) *ДНК HBV*, что не позволяло достоверно оценить реакцию по данной инфекции. Поэтому для выявления *ДНК HBV* использовали набор «АмплиПрайм РИБО-преп», а для амплификации тест-систему «АмплиСенс HBV-FL». Разброс сдвига ВКО у образцов относительно ВКО отрицательного контрольного образца в среднем составил 2,5 Ct.

Общее количество образцов спермы, обследованных на *HBV*, составило 15. В одном случае (6,6%) был выявлен положительный результат (Ct=32,3).

Выводы. Проблема определения вирусов трансмиссивных инфекций в эякуляте требует особого методического подхода и накопления большего числа наблюдений.

Список литературы

1. Постановление Правительства Российской Федерации № 715 от 1 декабря 2004 г. «Перечень социально значимых заболеваний и перечень заболеваний, представляющих опасность для окружающих».

2. Allahbadia G.N. Viral Hepatitis and Assisted Reproduction.// Journal obstetrics and gynecol India. 2016 Dec;66(6):397-403.

3. Garolla A., Pizzol D., Bertoldo A., Menegazzo M., Barzon L., Foresta C. Sperm viral infection and male infertility: focus on HBV, HCV, HIV, HPV, HSV, HCMV, and AAV.// Journal of Reproductive Immunology**,** 2013 Nov; 100(1):20-9.

4. Gimenes F. et al. Male infertility: a public health issue caused by sexually transmitted pathogens.// Nature Reviews Urology. 2014 Dec; 11(12):672-87.

5. Krog M.C., Nielsen H.S., Christiansen O.B., Kolte A.M.//Reproductive Endocrinology in Recurrent Pregnancy Loss.// Clinical obstetrics and gynecol. 2016 Sep; 59(3):474-86.

6. Semprini A.E et al// Absence of hepatitis C virus and detection of hepatitis G virus/GB virus C RNA sequences in the semen of infected men.// Journal Of Infectious Diseases 1998 Apr; 177(4):848-54.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВИЧ-1 НА ТЕРРИТОРИИ ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ

Плотникова Ю.К., Ревизор А.О., Пономарева О.А., Круглова Е.А.

ГБУЗ «Иркутский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», Иркутск, Россия

Введение. На сегодняшний день на территории Иркутской области зарегистрировано более 37000 человек, инфицированных ВИЧ. Тем временем данные о генетическом разнообразии ВИЧ остаются довольно скудными. В литературных источниках имеются сведения о доминирующем положении в нашем регионе варианта IDU-A подтипа A1 ВИЧ-1. С 2006 года началось применение высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ), которая, как мощный эволюционный фактор, должна была привести к появлению в популяции штаммов ВИЧ с мутациями лекарственной устойчивости.

Цель исследования. Оценить генетическое разнообразие ВИЧ на территории Иркутской области, провести анализ спектра мутаций лекарственной устойчивости.

Материалы и методы. В работе использовалась плазма крови от 258 ВИЧ-инфицированных лиц, находящихся на диспансерном наблюдении в Иркутском областном Центре СПИД, получавших лечение антиретровирусными препаратами (АРВП) на момент исследования. Полученный клинический материал использовался с информированного согласия пациентов. Вирусная нагрузка в образцах составляла от 1000 до 1000000 копий РНК/мл.

Определение молекулярно-генетического профиля ВИЧ выполняли с помощью коммерческих тест-систем «АмплиСенс HIV-Resist-Seq» и «ViroSeq HIV-1» (Abbott, США), предназначенных для анализа гена *pol*, кодирующего ферменты протеазу, обратную транскриптазу и интегразу.

Полученные последовательности генома ВИЧ-1 выравнивали в программе Sequencher (version 4.1.4) в соответствии с вариантом ВИЧ-1 HXB2 (регистрационный номер GeneBank K03455). Множественное выравнивание проводили с применением программы BioEdit (version 7.2.5). Для филогенетического анализа использовали метод «максимального правдоподобия» на основе модели Тамуры-Нэя в программе MEGA 6.

Для анализа мутаций и определения профиля резистентности использовалась программа интерпретации мутаций лекарственной устойчивости HIVdb Program: Sequence Analysis (version 7.0, 27.02.2014), представленная на сайте Стэнфордского университета (*http://hivdb.stanford.edu*).

Результаты и обсуждение. Анализ распространенности различных субтипов ВИЧ-1 показал, что на территории Иркутской области доминирующее положение занимает субтип A1 – 98,08%. Выявленные образцы субтипа B и рекомбинантной формы CRF02-AG (1,16% и 0,76% соответственно) ранее не отмечались в нашем регионе. По-видимому, они представляют собой заносы из других регионов РФ и мира, так как субтип B регулярно выявляется в западных регионах нашей страны, а CRF02-AG преимущественно распространен в странах Западной Африки, Центральной и Юго-Восточной Азии.

Анализ фармакорезистентности проводили у пациентов, принимавших АРВП. Мутации лекарственной устойчивости были выявлены в образцах от 187 пациентов (72,48%). Из них в подавляющем большинстве случаев (88,52%) обнаружены мутации лекарственной устойчивости к нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы (НИОТ), в 71,04% – к ненуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы (ННИОТ), в 22,95% – к ингибиторам протеазы (ИП) и в 2,19% случаев – к ингибиторам интегразы (ИИ).

В исследованных образцах выявлено 9 различных профилей фармакорезистентности ВИЧ-1. Частоты встречаемости различных профилей приведены в таблице 1.

Таблица 1. Частоты встречаемости различных профилей фармакорезистентности ВИЧ-1, выявленных на территории Иркутской области

Профиль резистентности	ИП	НИОТ	ННИОТ	ИИ	ИП+ НИОТ	НИОТ+ ННИОТ	НИОТ+ИИ	ИП+НИОТ+ ННИОТ	НИОТ+ННИ-ОТ+ИИ
Частота встречаемости (%)	5,88	13,90	7,49	0,54	9,09	54,01	1,06	7,49	0,54

Такое распределение частот встречаемости мутаций лекарственной устойчивости, по всей видимости, связано с основными схемами терапии, применяемыми на территории Иркутской области. Относительная редкость встречаемости мутаций устойчивости к ИП связана с высоким генетическим барьером данных препаратов, а к ИИ – с крайней редкостью применения данной группы препаратов в схемах терапии. Высокая распространенность мутаций устойчивости к НИОТ и частое сочетание фармакорезистентности одновременно к НИОТ и ННИОТ связаны с тем, что наиболее активно применялась схема терапии, содержащая два НИОТ и один ННИОТ, как правило, включающая ламивудин, азидотимидин и эфавиренз. Из этих трех препаратов два обладают низким генетическим барьером к формированию лекарственной устойчивости (ламивудин, эфавиренз).

Заключение. На территории Иркутской области по-прежнему доминирует субтип А1 ВИЧ-1. В то же время в единичных случаях стали выявляться новые субтипы и циркулирующие рекомбинантные формы – субтип В и CRF02-AG, ранее не отмечавшиеся в нашем регионе, что скорее всего связано с повышением миграционной активности населения.

Среди пациентов, принимающих АРВП, мутации лекарственной устойчивости выявлены в 72,48% случаев, причем преобладают мутации к наиболее часто назначавшимся препаратам из групп НИОТ и ННИОТ. Устойчивость к ингибиторам протеазы и интегразы отмечается достаточно редко, что связано с высоким генетическим барьером препаратов из группы ИП и ограниченным применением препаратов из группы ИИ. Среди исследованных образцов преобладают полирезистентные штаммы с мутациями лекарственной устойчивости как минимум к двум группам препаратов.

ДВУХЛОКУСНЫЙ ТЕСТ КАК СПОСОБ РЕШЕНИЯ ПРОБЛЕМЫ ВЫСОКОЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ВИЧ В NAT-ТЕСТИРОВАНИИ

Прасолова М.А.[1,2], **Иванов М.К.**[1]

[1] *АО «Вектор-Бест», Новосибирск, Россия*

[2] *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

Молекулярно-биологические методы диагностики РНК ВИЧ-1 (и самый распространённый из них – ПЦР-РВ) используются как для первичного выявления вируса в донорской крови, так и в количественном варианте для мониторинга стадии заболевания и эффективности терапии. Современные тест-системы для определения РНК ВИЧ-1 должны обязательно соответствовать ряду особых для ВИЧ требований. Во-первых, это высокая чувствительность – в латентный период концентрация РНК ВИЧ-1 в плазме крови может быть очень низкой (10^2-10^3 копий/мл и ниже), а для контроля эффективности терапии требуется измерение вирусной нагрузки в области низких концентраций вплоть до предела обнаружения. Во-вторых, тест-система должна быть адаптирована для выявления объекта с высокой генетической изменчивостью, на данный момент описано множество субтипов и рекомбинантных форм ВИЧ-1, и ввиду высокой скорости возникновения мутаций в геноме постоянно появляются новые геновариванты вируса, причём давление лекарственной терапии дополнительно увеличивает этот фактор. Так, например, считается, что в России преобладает субтип А, однако, в Сибирском регионе за последние несколько лет ситуация сильно поменялась. Из Узбекистана в Новосибирск был ввезён новый вариант вируса, который затем рекомбинировал с местным штаммом и дал начало новой циркулирующей рекомбинантной форме CRF63_02A1. Доля нового варианта в Новосибирске в 2008 г. составила 28%, в 2009 г. – 57%, в 2012 г. – 73%. Также отмечен значительный рост доли CRF63_02A1 среди вновь инфицированных в соседних с Новосибирском регионах – Алтайском крае, Кемеровской и Томской областях. В литературе описан ряд прецедентов, когда значительные ошибки в определении вирусной нагрузки или даже пропуски ВИЧ-положительной крови в донорстве были связаны с наличием мутаций в детектируемом конкретной NAT тест-системой фрагменте генома РНК ВИЧ-1.

Целью нашей работы была разработка и апробация высокочувствительного ПЦР-РВ теста для определения РНК ВИЧ-1, обладающего повышенной устойчивостью к мутациям в выявляемой мишени. Самый лучший способ увеличить надёжность теста – сделать его мультилокусным. В нашем наборе используется два набора праймеров и зондов для независимой амплификации и детекции двух фрагментов генома ВИЧ-1. Система детекции каждого из локусов оптимизирована под выявление большей части геновариантов, информация о которых имеется в международных базах данных. Если система на один из локусов даёт сбой, то её подстраховывает система на второй локус.

Была проведена апробация разработанного набора для детекции РНК ВИЧ-1 в сравнении с коммерчески доступными наборами «РеалБест РНК ВИЧ количественный» (АО «Вектор-Бест») и «ВИЧ-ГЕН количественный» (ООО «ДНК-Технология») на выборке плазм из г. Москвы и Новосибирской области. Вирусная нагрузка, определённая с помощью набора «РеалБест РНК ВИЧ количественный», для 5 из 156 ВИЧ-положительных образцов была ниже результатов, полученных с помощью нового теста, на 0,5-1 $\log_{10}$, и для 1 образца – более 1 $\log_{10}$. При сравнении нового теста с набором «ВИЧ-ГЕН количественный» для 34 из 41 образца результаты определения концентрации РНК ВИЧ-1 совпали, для 6 из 41 – различались на 0,5-1 $\log_{10}$ в обе стороны, для 1 образца с помощью набора «ВИЧ-ГЕН количественный» была получена концентрация ниже >1 $\log_{10}$ по сравнению с новым тестом. Также с помощью разработанного набора были проанализированы международные панели субтипов ВИЧ-1 и циркулирующих рекомбинантных форм ВИЧ-1 (коды NIBSC 12/224 и 13/214), табл. 1. Результаты определения вирусной нагрузки с помощью нового набора хорошо совпали с литературными данными по всем образцам, включая образцы редких групп O и N. При анализе набо-

ром «РеалБест РНК ВИЧ количественный» не выявлена РНК ВИЧ-1 в образце группы O, а также сильно занижена вирусная нагрузка для образца группы N (>2 log_{10}); при анализе набором «ВИЧ-ГЕН количественный» не выявлена РНК ВИЧ-1 в образцах групп N, O и двух рекомбинантных форм, ещё для одного образца из панели рекомбинантов вирусная нагрузка была занижена на 0,5 log_{10}. Аналитическая чувствительность теста составляет 20 МЕ/мл плазмы, специфичность 100%. Новый тест включён в состав набора «РеалБест ВГВ/ВГС/ВИЧ ПЦР».

Таблица 1. Результаты исследования международных панелей генотипов с помощью наборов «РеалБест РНК ВИЧ-1» в комплекте наборами для выделения РНК «РеалБест экстракция 100» (РБ Э100) или «РеалБест ДельтаМаг ВГВ/ВГС/ВИЧ» (РБ ДМ) и набора «ВИЧ-ГЕН количественный» (ООО «ДНК-Технология»)

Описание образца	**Экспериментальные данные**, log_{10} копий/мл			**Данные литературы *,****, log_{10} копий/мл			
NIBSC 12/224	**РБ Э100**	**РБ ДМ**	**ВИЧ-ГЕН**	**Monitor**	**Nuclisens**	**bDNA**	**Abbott**
A	3,44	3,45	3,32	3,38	3,55	3,06	3,57
B	3,35	3,28	3,29	3,15	3,53	3,2	3,4
C	3,46	3,60	3,49	3,43	3,59	3,07	3,44
D	3,31	3,32	3,35	3,5	3,81	3,49	3,71
AE	3,25	3,24	3,41	3,63	3,53	3,33	3,64
F	3,49	3,59	3,79	3,67	2,33	3,47	3,53
G	3,53	3,59	3,78	3,76	**N/A**	3,25	3,34
AG-GH	3,72	3,91	3,74	4,11	2,18	3,58	3,62
N	2,78	2,67	**N/A**	**N/A**	**N/A**	**N/A**	2,18
O	3,71	3,24	**N/A**	3,61	**N/A**	2,62	2,48
*NIBSC 13/*214				**ART**	**CAP**	**RHP**	
subtype J	3,99	3,87	4,29	4,25	4,29	4,09	
CRF 01 AE	3,44	3,34	3,59	3,56	3,63	3,40	
subtype G	3,53	3,46	**N/A**	3,75	3,55	3,31	
CRF 02 AG	3,12	3,22	3,43	3,27	3,33	3,01	
Group O	3,38	3,25	3,39	3,10	3,63	3,29	
CRF ADG	2,96	2,96	**N/A**	2,99	3,09	2,58	
CRF 11 GJ	3,48	3,33	3,31	3,18	3,72	3,31	
subtype C	3,31	3,58	2,82	3,43	3,63	3,43	
CRF BG 24	3,35	3,11	3,33	3,53	3,77	3,56	
CRF01,A,G,J,U	3,61	3,67	3,34	3,60	3,62	3,17	

* Holmes H., Davis C, Heath A. *Development of the 1st International Reference Panel for HIV-1 RNA genotypes for use in nucleic acid-based techniques*. J Virol. Meth. 2008; 154: 86–91.

Monitor Roche Amplicor HIV-1 Monitor® Test, v1.5
Nuclisens Biomerieux NucliSens® HIV-1QT
bDNA VERSANT® HIV-1 RNA 3.0 assay
Abbott Abbott LCx® HIV-1 RNA quantitative assay

** Morris C.L., Wigglesworth E., Heath A.B. *Report on an International Collaborative Study to Establish the 1st WHO International Reference Panel for HIV-1 Circulating Recombinant Forms for NAT Assays.* Geneva, 2013 WHO/BS/2013.2226

ART Abbott Real Time
CAP Roche cobas Ampliprep/cobas Taqman
RHP Roche HighPure System/cobas Taqman

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ АЛЛЕЛИ HLA-B*5701 СРЕДИ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ В ПРИВОЛЖСКОМ ФЕДЕРАЛЬНОМ ОКРУГЕ

Зайцева Н.Н., Бутина Т.Ю., Кузнецова И.В.

ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия

Введение. Одним из приоритетных направлений в лечении ВИЧ-инфицированных лиц является повышение эффективности и безопасности применяемых препаратов для улучшения качества и продолжительности жизни пациентов. В настоящее время широкое применение во всем мире получили абакавирсодержащие схемы лечения ВИЧ-инфекции. Вместе с тем известно, что существует серьезное ограничение по использованию входящего в их состав препарата абакавир (АВС), связанное с возникновением реакции гиперчувствительности (РГЧ) у 5-8% пациентов в течение первых 6 недель лечения [1]. РГЧ – поликлинический синдром, характеризующийся множественными проявлениями и осложнениями (лихорадка, кожная сыпь, апатия, желудочно-кишечные расстройства, боли в мышцах и суставах, затруднение дыхания). При прекращении приема препарата все симптомы реакции гиперчувствительности обычно исчезают в течение нескольких дней, однако при повторном применении есть вероятность развития острого тяжелого приступа РГЧ, который в некоторых случаях может закончиться смертельным исходом. Иммуногенетическими и клиническими исследованиями была установлена ассоциация аллели 5701 локуса В главного комплекса гистосовместимости человека (HLA-B*5701) с развитием РГЧ [2, 3], потенциально ограничивающей прием АВС, как в моно-, так и в комбинированном формате приема. Исследования, проведенные в Австралии и США, показали, что на гиперчувствительность к АВС может влиять этническое происхождение пациента. Частота встречаемости HLA-B*5701 варьирует в разных популяциях: 5%-8% у латиноамериканцев, 4%-7% у азиатов, менее 1% у африканцев [4, 5]. В России в разное время был проведен ряд подобных исследований, определивших распространенность носительства данной аллели в различных субъектах в 3,3-5% [6, 7, 8]. В масштабе Приволжского федерального округа (ПФО) ранее подобные исследования не проводились.

Цель и задачи. Определить распространенность генетической аллели HLA-B*5701 среди ВИЧ-инфицированных пациентов субъектов ПФО.

Материалы и методы. Исследовано 309 образцов крови ВИЧ-позитивных пациентов из пяти регионов округа (Самарская, Ульяновская, Кировская и Нижегородская области, Чувашская Республика), как получающих терапию не абакавирсодержащими препаратами, так и АРВТ «наивных» лиц, которым планировалось начать лечение. Таким образом, в анамнезе у обследуемых пациентов отсутствовал факт приема абакавира. Возраст обследуемых варьировал от 19 до 48 лет, доля мужчин и женщин составила 61,0±3,6% и 39,0±4,4% соответственно. Принцип тестирования основывался на выделении тотальной ДНК человека, проведении амплификации участка локуса В главного комплекса гистосовместимости и участка гена β-глобина человека методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для выделения ДНК из лейкоцитов крови использовался комплект реагентов «Рибо-преп вариант 100» (ФБУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора, Россия), для выявления аллели HLA-B*5701 – набор реагентов «АмплиСенс Геноскрин HLA B5701-FL» (ФБУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора, Россия) с аналитической чувствительностью 10^3 клеток/мл. Анализ и учет результатов проводился с помощью амплификатора iCycler IQ5 BIORAD. При наличии аллели HLA-B*5701 в генотипе как в гомо-, так и в гетерозиготном состоянии результат тестирования оценивался как положительный.

Основные результаты. Результаты исследования представлены в таблице.

Таблица. Распространенность аллели HLA-B*5701 среди ВИЧ-инфицированных в субъектах ПФО

№ п/п	Территория ПФО	Всего обследовано (n)	Число положительных результатов (абс.)
1	Самарская область	138	7
2	Ульяновская область	99	5
3	Чувашская Республика	28	0
4	Кировская область	22	2
5	Нижегородская область	22	1
	Всего	309	15 (4,9%)

Выводы. Таким образом, распространенность генетической аллели HLA-B*5701 у ВИЧ-позитивных лиц пяти регионов Приволжского округа составила 4,9±1,2%, что сопоставимо с результатами, полученными российскими и международными исследователями. Проведение фармакогенетического тестирования ВИЧ-позитивных пациентов на наличие аллели 5701 локуса В главного комплекса гистосовместимости человека перед началом приема абакавир-содержащих препаратов необходимо для исключения побочных эффектов и возможных летальных исходов.

Список литературы:

1. Symonds, W. Risk factor analysis of hypersensitivity reaction to abacavir. / W. Symonds et al. // Clin Ther. – 2002. – V.24. – .P.565-73.

2. Abacavir adverse effects in HIV patients associated with HLA alleles / S. Mallal, D. Nolan [et al.] // Lancet. – 2002. – V.359. – P.727–732.

3. Abacavir induces loading of novel self-peptides into HLA B*5701 an autoimmune model for HLA-associated drug hypersensitivity / M.A. Norcross, S. Luo, L. Lu [et al.] // J. Infect. Dis. – 2011 – V. 204(8). – P.1202–1210.

4. Hughes, C.A. Abacavir hypersensitivity Reaction: an Update / C.A Hughes [et al.] // The Annals of Pharmacoterapy. – 2008. – V. 42.

5. Nolan, D. Frequency HLA B*5701 carriers in the general population of the Earth / D. Nolan, S. Gaudieri, S. Mallal // J. HIV Ther. – 2003. – V.8(2). – P.36–41.

6. Оценка распространенности аллеля HLA-B*5701 среди ВИЧ-инфицированных лиц на территории европейской части Российской Федерации / А.С. Туманов [и др.] // Медицинская генетика. 2010. – 8. – Т.9. – С.36-39.

7. Плотникова, Ю.К. Распространенность аллеля HLA-B*5701 среди больных ВИЧ-инфекцией на территории Иркутской области / Ю.К. Плотникова, О.А. Пономарева, Е.С. Наумова // Сб. материалов VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика-2014».– М,. – 2014. – Т.1. – С.51.

8. Цыганова, Г.М. Опыт использования набора реагентов «АмплиСенс Геноскрин HLA B5701-FL» в практической лаборатории / Г.М. Цыганова, Е.В. Буравцова, В.В. Покровский // Сб. материалов VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика-2014».– М., – 2014. – Т.1. – С.44-45.

УРОВЕНЬ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ МУТАЦИЙ, ВЕДУЩИХ К УСТОЙЧИВОСТИ ВИЧ-1 К АНТИРЕТРОВИРУСНЫМ ПРЕПАРАТАМ

Рыжов К.А., Носик М.Н., Рыманова И.В., Яровая Ж.Ю., Кравченко А.В., Куимова У.А.

ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия
Туберкулезная клиническая больница № 3 им. Г.А. Захарьина, Москва, Россия
ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Федеральный научно-методический центр по профилактике и борьбе со СПИД, Москва, Россия

Введение. Лечение ВИЧ-инфекции является одной из актуальнейших проблем современной медицины. В настоящее время с помощью химиопрепаратов, направленных на ингибирование различных ферментов вируса, удается значительно улучшить состояние больных, подавляя на какой-то период репродукцию ВИЧ. К сожалению, это временный успех, так как сложная природа вируса иммунодефицита человека позволяет ему быстро адаптироваться к действию лекарств. Появляются резистентные к действию препаратов штаммы вируса, что делает неэффективной антиретровирусную терапию (АРВ-терапия). Растет число случаев передачи ВИЧ-резистентных штаммов ВИЧ-инфицированным лицам, не получавшим лечение. С увеличением доступа к АРВ-терапии всё большее число недавно ВИЧ-инфицированных пациентов могут быть инфицированы резистентными штаммами вируса.

Цель и задачи. Целью работы было проанализировать уровень лекарственной устойчивости ВИЧ среди первичных пациентов (не получавших АРВ-терапию), проживающих в Московском регионе, где доступ к антиретровирусной терапии достаточно высок.

Материалы и методы. Были исследованы образцы крови от 527 больных, за период 2008-2015 гг., не получавших АРВ-терапию и проживающих в Московском регионе: в Москве (n=279) и в Московской области (n=248). Для анализа возможных мутаций устойчивости были изучены нуклеотидные последовательности области гена pol ВИЧ-1, с использованием программного обеспечения CPR (http://cpr.stanford.edu/cpr.cgi).

Результаты. Исследовано 114 образцов крови за период 2008-2010 гг., 198 образцов крови за период 2011-2012 гг. и 215 за период 2013-2015 гг. Среди исследованных образцов за период 2008-2010 гг., в 2 образцах было выявлено по одной значимой мутации устойчивости: мутация M184V (n=1), ассоциируемая с резистентностью к НИОТ, и мутация K101E (n=1), ассоциируемая со средней резистентностью к препаратам класса ННИОТ, в частности к невирапину и рилпивирину. За период 2011-2012 гг. значимые мутации были выявлены в 4 образцах: мутации Q151M (n=1) и M41L (n=2), ведущие к устойчивости к НИОТ, и мутация L100F (n=1), связанная с резистентностью к ННИОТ. За период 2013-2015 гг. значимые мутации были выявлены также в 4 образцах: D30N (n=2) – мутация высокого уровня резистентности к нелфинавиру (ИП); мутация V108I (n=1), ассоциируемая со средней резистентностью к невирапину (ННИОТ), и мутация V32I (n=1), ассоциируемая с резистентностью к препаратам класса ИП, за исключением саквинавира. Таким образом, частота выявления мутаций устойчивости у первичных больных составила: за период 2009-2010 гг. – 1,7%; за период 2011-2012 гг. – 2%; за период 2013-2015 гг. – 1,9%. Процент мутаций полиморфизма и второстепенных замен, которые могут вызывать незначительное снижение чувствительности вируса в сочетании с другими мутациями устойчивости, для всех групп был фактически одинаковым: в гене обратной транскриптазы – A62V (44,1%), V90I (10,5%), E138A (1,1%); в гене протеазы – L10I (16,4%), V77I (31,7%), M36A (69,9%), L63P (9,8%).

Среди образцов, собранных за период 2013-2015 гг., у 8 образцов были выявлены довольно необычные мутации в области обратной транскриптазы: V276L, L279IKMN, K275X, K281APX, G285AE, T286DINV, K287KRW, A288FIL, L289LFV, T7TFIS, P9IT, K13KE, I274IFL, V276AP, L279DEKN,

Q278X и в области протеазы: D25DAE, T26TA, G27GA, D30DE, T31TA, E35Deletion, R87R, E65EIKV.

Заключение/Выводы. Уровень передачи резистентных штаммов ВИЧ-1 среди ВИЧ-инфицированных лиц, не получающих лечение, по-прежнему остается довольно низким и не превышает 5%. Однако, учитывая широкий доступ к АРВ-терапии и появление в последние годы неоднозначных мутаций и делеций в области обратной транскриптазы/ гене протеазы, которые потенциально могут привести к устойчивости к АРВ-препаратам, необходим постоянный мониторинг за циркуляцией резистентных штаммов.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ НОКАУТА ГЕНА *CCR5* С ПОМОЩЬЮ TALE-НУКЛЕАЗЫ

Урусов Ф.А., Глазкова Д.В., Омельченко Д.О., Поздышев Д.В., Богословская Е.В.

ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение. В качестве одной из стратегий для генной терапии ВИЧ-инфекции рассматривается «выключение» гена *CCR5*, который кодирует корецептор, используемый ВИЧ для проникновения в клетку. Данная стратегия может быть реализована с помощью TALE-нуклеаз – ферментов с заданной специфичностью[1]. TALE-нуклеаза распознает заданную последовательность и вносит в нее двойной разрыв. Репарация разрыва клеткой по механизму негомологичного связывания концов приводит к коротким делециям и вставкам, что, в свою очередь, сдвигает рамку считывания гена и, таким образом, нарушает его функцию. Успешный нокаут гена *CCR5* с помощью данных нуклеаз позволит получить клетки, устойчивые к R5-тропному ВИЧ, которые могут быть использованы для генной терапии ВИЧ.

Цель и задачи. Цель работы – разработать TALE-нуклеазу, направленную против гена *CCR5* и протестировать её эффективность. Задачи: 1. Оценить эффективность TALE-нуклеазы по снижению флуоресценции EGFP в клетках HT1080-CCR5-EGFP; 2. Провести молекулярный анализ эффективности разрезания последовательности *CCR5* с помощью фермента E1 фага T7 (T7E1 нуклеаза); 3. Проанализировать неспецифическую активность TALE-нуклеазы.

Материалы и методы. Клетки HT1080-CCR5-EGFP культивировали в среде MEM с 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Clontech, США). TALE-нуклеаза, направленая против гена *CCR5*, была заказана нами в компании LABOMICs (Бельгия), которая осуществила сборку кодирующих нуклеазу плазмид. Область распознавания нуклеазы расположена в начале рамки считывания гена, что увеличивает вероятность нарушения функций гена. Доставку плазмид в клетки осуществляли методом электропорации с помощью 4D-Nucleofector™ System (Lonza, Швейцария). Эффективность электропорации оценивали с помощью контрольной плазмиды, которая содержала маркерный ген белка EGFP, флуоресценция которого значительно превышала по интенсивности флуоресценцию химерного белка CCR5-EGFP. Это позволяло оценить процент трансфецированных клеток. Для молекулярного анализа эффективности разрезания последовательности *CCR5* проводили выделение ДНК из клеток с помощью набора «АмплиСенс РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия), затем амплифицировали участок гена *CCR5* с праймерами, фланкирующими область распознавания TALEN, после чего ПЦР-продукты подвергали гидролизу эндонуклеазой T7E1 (NEB, США) по протоколу производителя. Количественный анализ фрагментов ДНК проводили путем капиллярного электрофореза на Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, США). Флуоресценцию EGFP в клетках измеряли на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD, США). Анализ данных проточной цитометрии проводили в программе Flowing Software 2.5.1 (Cell Imaging Core of the Turku Centre for Biotechnology, http://www.uskonaskel.fi/flowingsoftware/).

Основные результаты. Для оценки эффективности TALE-нуклеазы были использованы созданные нами ранее индикаторные клетки HT1080-CCR5-EGFP, которые содержат в геноме трансген, кодирующий химерный белок CCR5-EGFP[2]. Разрушение *CCR5* последовательности сопровождается выключением EGFP, что можно легко оценить по снижению флуоресценции EGFP с помощью проточного цитометра. Мы электропорировали клетки HT1080-CCR5-EGFP плазмидами, кодирующими TALEN. Электропорацию проводили разными количествами TALEN плазмид: 1, 2 и 3 мкг на 1 млн. клеток. На третий день после электропорации в обработанных культурах содержалось 7, 15 и 22% EGFP негативных клеток соответственно. Снижение флуоресценции EGFP в данных клетках произошло вследствие воздействия на трансген *CCR5-EGFP* со стороны TALEN. Поскольку эффективность электоропорации, измеренная с помощью контрольной плазмиды, составила в данных экспериментах 20%, можно предположить, что TALEN показывает максимальную активность, т.е. попадание нуклеазы в клетку приводит к инактивации гена в 100% случаев.

Полученные выше результаты подтверждали молекулярным анализом – с использованием фермента T7E1. Из клеток выделяли ДНК, амплифицировали участок гена *CCR5,* включающий область узнавания TALEN, после чего полученные ампликоны переотжигали и гидролизовали нуклеазой T7E1. Ампликоны представляют собой смесь мутантной (следствие репарационных процессов) и нативной ДНК, при отжиге друг на друга образуют фрагменты, имеющие участки неполной комплементации. T7E1-нуклеаза узнает такие участки и вносит разрыв. Таким образом, в результате обработки ампликонов T7E1 появлялись дополнительные фрагменты меньшего размера в количестве 5, 9 и 21% (соответствует 1, 2 и 3 мкг плазмид TALEN, доставленных в клетки). Из этого следует, что активность TALE-нуклеазы, измеренная с помощью молекулярного анализа, соответствует эффективности, выявленной в клетках HT1080-CCR5-EGFP путем измерения флуоресценции EGFP.

Известно, что программируемые нуклеазы могут обладать target-off эффектом, который заключается в рас-

познавании нецелевых мишеней, сходных по нуклеотидной последовательности с основным сайтом распознавания[3]. Наиболее близкой потенциальной нецелевой мишенью для *CCR5* является его ген-паралог *CCR2*. Гомология между данными генами в сайте узнавания TALEN составляет 86%. Учитывая это, мы оценили степень target-off эффекта в отношении гена *CCR2* с помощью T7E1-анализа. С помощью данного анализа из ампликона *CCR2* не было обнаружено выщепления каких-либо дополнительных фрагментов, что предполагает высокую специфичность исследуемой TALE-нуклеазы.

Заключение. В результате данной работы было показано, что сконструированная нами TALE-нуклеаза в модельных клетках HT1080-CCR5-EGFP продемонстрировала свою активность, что делает возможным её применение для редактирования генома. Обнаруженная активность является строго специфичной и направлена только против целевой последовательности – гена *CCR5*. В дальнейшем мы планируем оптимизировать условия доставки TALE-нуклеазы в первичные CD4+ лимфоциты и CD34+ гемопоэтические стволовые клетки, которые рассматриваются как клетки-мишени для генной терапии ВИЧ.

Список используемой литературы

1. Mock U., Machowicz R., Hauber I., Hauber I., Horn S., Abramowski P., Berdien B., Hauber J., Fehse B. mRNA transfection of a novel TAL effector nuclease (TALEN) facilitates efficient knockout of HIV co-receptor CCR5. // Nucleic Acids Res. 2015. V.43(11). P.5560–71.

2. Глазкова Д.В., Ветчинова А.С., Богословская Е.В., Жогина Ю.А., Маркелов М.Л., Шипулин Г.А. Подавление экспрессии гена CCR5-рецептора человека с помощью искусственных микроРНК. // Молекулярная Биология. 2013. Т.47(3). С. 475–485.

3. Gaj T., Gersbach C.A., Barbas C.F. ZFN, TALEN and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering // Trends Biotechnol. 2013. V. 31(7). P.397–405.

АНАЛИЗ СПЕКТРА МУТАЦИЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ВИЧ-1 К АНТИРЕТРОВИРУСНЫМ ПРЕПАРАТАМ СРЕДИ ОСУЖДЕННЫХ, ОТБЫВАЮЩИХ НАКАЗАНИЕ В ПЕНИТЕНЦИАРНЫХ УЧРЕЖДЕНИЯХ СВЕРДЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Устюжанин А.В.[1], Демчук Н.С.[1], Санникова Л.Б.[1], Новоселов А.В.[1], Алимов А.В.[1], Кадырова О.Ю.[2], Паньков А.П.[2]

[1] ФБУН «ЕНИИВИ» Роспотребнадзора, Екатеринбург, Россия
[2] ФКУЗ «МСЧ-66» ФСИН России, Екатеринбург, Россия

Введение. В исправительных учреждениях Федеральной службы исполнения наказаний содержится значительное число ВИЧ-положительных лиц, многим из которых по показаниям проводится терапия антиретровирусными препаратами (АРВП). В случаях вирусологической неэффективности антиретровирусной терапии у осужденных представлялось целесообразным изучить спектр мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ-1 с целью рациональной коррекции схем терапии при выявлении мутаций высокой или множественной устойчивости к АРВП.

Целью работы являлся анализ спектра мутаций резистентности ВИЧ-1 к АРВП среди осужденных, отбывающих наказание в пенитенциарных учреждениях Свердловской области.

Материалы и методы. Из двух женских исправительных колоний было получено 89 образцов крови от ВИЧ-положительных осужденных, принимавших по показаниям антиретровирусную терапию. В 32 пробах, имевших вирусную нагрузку не менее 1000 копий/мл, была определена резистентность ВИЧ-1 к АРВП генотипическим методом с использованием тест-систем «АмплиСенс HIV-Resist-Seq» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия) на генетическом анализаторе ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). В пробах с достаточной концентрацией РНК ВИЧ-1 для генотипического определения резистентности к АРВП проводилось выделение РНК, обратная транскрипция и амплификация фрагментов генома ВИЧ-1, кодирующих обратную транскриптазу и протеазу, секвенирование амплифицированных участков генома ВИЧ-1. Анализ полученных нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1 был выполнен с помощью программного обеспечения «ДЕОНА» (ООО «Мед АйТи Групп», Россия), обеспечивающего идентификацию и оценку степени влияния выявленных мутаций на устойчивость ВИЧ-1 к 19 АРВП, относящимся к нуклеозидным/нуклеотидным ингибиторам обратной транскриптазы (НИОТ), ненуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы (ННИОТ) и ингибиторам протеазы (ИП).

Основные результаты. В нуклеотидных последовательностях 20 из 32 проанализированных образцов (в 62,5%) не было выявлено мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ-1 к АРВП. Данный результат был в некоторой степени неожиданным, поскольку в пенитенциарных учреждениях содержится значительное количество осужденных по делам, связанным с наркотиками, включая бывших потребителей инъекционных наркотиков, многие из которых инфицированы ВИЧ. В потоке рутинных исследований образцов, поступавших в референс-лабораторию Уральского окружного центра по профилактике и борьбе со СПИД при ФБУН «ЕНИИВИ» Роспотребнадзора из территориальных Центров по профилактике и борьбе со СПИД, нуклеотидные последовательности, в которых не определялись мутации резистентности ВИЧ-1 к АРВП, встречались значительно реже. Среди 12 образцов (из 32), в которых были обнаружены мутации резистентности, лишь в одной нуклеотидной последовательности были выявлены мутации высокого уровня устойчивости к невирапину и эфавирензу, однако в текущей схеме терапии данные препараты не применялись. Остальные выявленные мутации были ассоциированы со средним, низким и, возможно, низким уровнем резистентности к АРВП.

Таблица 1. Спектр мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ-1 к АРВП, выявленных у осужденных, отбывающих наказание в пенитенциарных учреждениях Свердловской области

Мутации резистентности к НИОТ							
Мутации	*Абс.*	*Мутации*	*Абс.*	*Мутации*	*Абс.*	*Мутации*	*Абс.*
A62V	**8**	D67G	1	T215I	1	T215NT	1
Мутации резистентности к ННИОТ							
V90I	**4**	**E138A**	**3**	E138Q	1	Y188D	1
K103N	1	E138K	2	V179D	1	P236LP	1
Мутации резистентности к ИП							
L10I	1	D30E	1	M46I	1	V82G	1
L10V	**5**	V32L	1	V82C	1	I84H	1
K20I	**3**	L33F	1	V82F	1	L90V	1

Среди 43 выявленных мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ-1 наиболее часто встречалась замена A62V (8 образцов), чаще одного раза были выявлены замены L10V (5 образцов), V90I (4 образца), E138A (3 образца), K20I (3 образца). В базе данных Стэнфордского университета «HIV Drug Resistance Database» (http://hivdb.stanford.edu/) перечисленные мутации снабжены следующими комментариями.

Мутация, приводящая к аминокислотной замене A62V, является акцессорной по отношению к основной мутации множественной устойчивости к НИОТ (Q151M или K65R), изменяющей активный центр обратной транскриптазы. В изолированном виде аминокислотная замена A62V существенно не снижает чувствительность ВИЧ-1 к НИОТ и часто выявляется у генетических вариантов ВИЧ-1 субтипа A (A_FSU), тем не менее она не относится к мутациям полиморфизма.

L10V является акцессорной мутацией полиморфизма, которая либо снижает чувствительность к ИП, либо увеличивает скорость репродукции вирусов, имеющих основную мутацию, изменяющую активный центр протеазы. K20I у ВИЧ-1 субтипов B и C является акцессорной мутацией, снижающей чувствительность к ИП нелфинавиру.

V90I – акцессорная мутация полиморфизма, подвергающаяся слабой позитивной селекции в присутствии каждого из АРВП группы ННИОТ. E138A – акцессорная мутация полиморфизма, которая подвергается слабой позитивной селекции у пациентов, принимающих ННИОТ этравирин или рилпивирин, снижает чувствительность к данным препаратам приблизительно вдвое.

Заключение. Среди исследованных нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *pol* ВИЧ-1, полученных от осужденных с вирусологической неэффективностью антиретровирусной терапии, не было выявлено мутаций, обеспечивающих высокий уровень устойчивости к применяемым в текущих схемах терапии препаратам. В 62,5% исследованных нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1 не было выявлено мутаций резистентности ни к одному из 19 АРВП. Таким образом, во всех исследованных случаях вирусологической неэффективности терапии генетическая устойчивость ВИЧ-1 к АРВП не являлась причиной неэффективности терапии. Низкая частота выявления мутаций резистентности ВИЧ-1 к АРВП на фоне назначенной антиретровирусной терапии и вирусологической неэффективности лечения может быть обусловлена низкой приверженностью к терапии и преобладанием последовательности дикого штамма после длительной отмены АРВП.

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СУБТИПОВОЙ СТРУКТУРЫ ГЕНОВАРИАНТОВ ВИЧ-1, ВЫЯВЛЕННЫХ У ОСУЖДЕННЫХ, ОТБЫВАЮЩИХ НАКАЗАНИЕ В ИСПРАВИТЕЛЬНЫХ КОЛОНИЯХ В СВЕРДЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Устюжанин А.В.[1], Демчук Н.С.[1], Санникова Л.Б.[1], Новоселов А.В.[1], Алимов А.В.[1], Кадырова О.Ю.[2], Паньков А.П.[2]

[1] ФБУН «ЕНИИВИ» Роспотребнадзора, Екатеринбург, Россия
[2] ФКУЗ МСЧ-66 ФСИН России, Екатеринбург, Россия

Введение. Практическое применение методов молекулярной филогенетики в медицинской вирусологии открывает новые возможности для установления причинно-следственных связей эпидемического распространения вирусных инфекций. Сравнение выделенных нуклеотидных последовательностей отдельных штаммов ВИЧ

с последовательностями, накопленными в базах данных, позволяет выдвигать и проверять гипотезы о происхождении актуальных для конкретной территории штаммов, о возможных путях их передачи и о предположительном сроке заноса на конкретную территорию. Таким образом, анализ распространенности различных типов, субтипов и циркулирующих рекомбинантных форм ВИЧ среди различных контингентов инфицированных лиц обеспечивает повышение эффективности системы эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией.

Целью работы явилось проведение филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1, выделенных от осужденных, отбывающих наказание в пенитенциарных учреждениях Свердловской области.

Материалы и методы. В 32 пробах, полученных из двух женских исправительных колоний от осужденных, получавших антиретровирусную терапию и имевших вирусную нагрузку не менее 1000 копий/мл, были определены нуклеотидные последовательности части генома ВИЧ-1, кодирующей протеазу и обратную транскриптазу, на генетическом анализаторе ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) с использованием тест-систем «АмплиСенс HIV-Resist-Seq» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия). Полученные консенсусные последовательности сравнивали с референсной последовательностью ВИЧ-1 из базы данных Стэнфордского университета (http://hivdb.stanford.edu).

Выборка близкородственных нуклеотидных последовательностей из международной базы данных для филогенетического анализа выделенных последовательностей производилась с помощью онлайновой системы BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov).

Филогенетический анализ полученных нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1 выполнен с помощью программы MEGA v.6.0. Филограммы были построены по алгоритму «ближайшего соседа» (Neighbor-Joining). Расчет эволюционных дистанций между последовательностями производили согласно двухпараметрической модели М. Кимуры (Kimura 2-parameter). Достоверность топологии филограмм оценивали методом повторных выборок на основании анализа 1000 псевдореплик. Достоверными считали построения при индексе поддержки не менее 70%.

Основные результаты

Генотипирование полученных нуклеотидных последовательностей позволило определить геноварианты штаммов ВИЧ-1, имеющихся у обследованных осужденных. Преобладающим оказался субтип A1 с ближайшим «общим предком» – геновариантом A_FSU. Две последовательности относились к циркулирующим рекомбинантным формам CRF63_02A1; четыре последовательности – к циркулирующим рекомбинантным формам CRF03_AB. При сравнении выделенных от осужденных нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1 между собой на филограмме сформировалось три корневых топологических ветви, объединявших три основных кластера последовательностей, соответствовавших трем выявленным субтипам ВИЧ-1. В кластере субтипа A1 был выделен субкластер, объединивший две близкородственных последовательности ВИЧ-1 из числа исследованных, от лиц, зарегистрированных в г. Перми и в г. Богдановиче (идентичность 99%). В кластере субтипа CRF63_02A1 также были обнаружены две близкородственных последовательности (идентичность 97%), выделенных от лиц, зарегистрированных в г. Нижнем Тагиле и в г. Томске.

Согласно данным литературы, геновариант A_FSU (FSU – Former Soviet Union), относящийся к субтипу A1, циркулирует на территории стран бывшего Советского Союза среди потребителей инъекционных наркотиков (ПИН) с 1990-х годов, в 2000-е геновариант вышел из контингента ПИН в основное население, где распространяется по настоящее время гетеросексуальным путем, характеризуется очень низкой генетической вариабельностью (1 – 2% генетических различий между вирусами, циркулирующими в популяции)[1]. На филограмме наибольший по количеству штаммов кластер объединял штаммы ВИЧ-1 субтипа A1 преимущественно от осужденных, имевших регистрацию в городах Свердловской области: Екатеринбурге, Нижнем Тагиле, Камышлове, Краснотурьинске, Серове, Полевском, Арамиле, Реже, Асбесте, Богдановиче, Тавде, Верхотурье.

В 2014-2015 годах было установлено[2], что геновариант CRF63_02A1 стал доминирующим в Сибирском регионе. В частности, от жителей Томской области этот вариант был выделен в 77,7% случаев. В Кемеровской области, где на протяжении многих лет распространенность субтипа A среди циркулирующих вирусов превышала 90%, геновариант CRF63_02A1 стал преобладающим среди недавно заразившихся ВИЧ, выявленных в 2014-2015 годах.

В настоящем исследовании показано существование эпидемической сети с достаточно короткой цепью передачи ВИЧ-инфекции, объединившей осужденную, зарегистрированную в Нижнем Тагиле, и осужденную, зарегистрированную в Томске. Учитывая высокую распространенность геновариантa CRF63_02A1 в Томской области, полученные результаты указывают на возможность заноса этого геновариантa из Томской области в Свердловскую, где в последние годы преобладал субтип A1.

CRF03_AB представляет собой рекомбинантную форму вируса субтипа A/B, которая была впервые изолирована в Калининграде и получила распространение среди ПИН в России и Украине в 1990-е годы 20 века[3].

Заключение. Генотипирование полученных нуклеотидных последовательностей позволило определить геноварианты штаммов ВИЧ-1, имеющихся у обследованных осужденных: преобладающим был субтип A1; два штамма относились к циркулирующим рекомбинантным формам CRF63_02A1; четыре штамма – к циркулирующим рекомбинантным формам CRF03_AB. Ряд данных позволил предположить возможность заноса геновариантa CRF63_02A1 из Томской области, где доминирует CRF63_02A1, в Свердловскую область, где на протяжении нескольких лет преобладает субтип A1.

Список используемой литературы

1. Lebedev A., Kazennova E., Bobkova M. Comparative analysis of AFSU HIV-1 variants circulating in IDUs and heterosexual populations. // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2016 г. – Т.8. – № 2. – С.107-108.

2. Гашникова Н.М., Тотменин А.В., Астахова Е.М. и со-

авт. Распространение CRF63_02A1 в Сибирском регионе России // Тезисы Пятой конф. по ВИЧ/СПИДу в Вост. Европе и Центральной Азии. - М. – 2016. – С.251-252.

3. Шарман А. Синдром приобретенного иммунодефицита: Академия профилактической медицины. – NeiroNex, Bethesda, MD, USA. – 2006. – 303 с.

ПРИМЕНЕНИЕ КОМПЛЕКСА МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДАВНОСТИ ЗАРАЖЕНИЯ ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ

Шемшура А.Б.[1], Бендус И.В.[1], Милованова И.И.[1], Лебедев П.В.[1], Кулагин В.В.[1], Мурзакова А.В.[2], Киреев Д.Е.[2]

[1] ГБУЗ «Клинический центр профилактики и борьбы со СПИД» Министерства здравоохранения Краснодарского края, Краснодар, Россия

[2] ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение. Темпы распространения ВИЧ-инфекции в России в целом и на юге страны в частности остаются высокими [1, 2]. При этом в Краснодарском крае более половины пациентов выявляется в продвинутых стадиях заболевания (вторичных заболеваний + СПИД: 55% в 2015 г. по сравнению с 39% в 2012 г.). Преимущественное выявление лиц с проявлениями серьезного иммунодефицита свидетельствует о позднем и неполном выявлении больных, инфицированных в прежние годы. Очевидно, что значительная часть вновь зарегистрированных случаев ВИЧ-инфекции не является случаями недавнего заражения. Это приводит к завышению показателей заболеваемости из-за отсроченного выявления больных, затрудняет разработку мероприятий по противодействию эпидемии ВИЧ-инфекции и оценку их эффективности. В связи с этим верификация реального срока инфицирования ВИЧ у впервые выявляемых пациентов приобретает особую актуальность. Кроме того, установление давности заражения имеет важное значение при эпидемиологических расследованиях в очагах ВИЧ-инфекции.

На сегодняшний день давние случаи инфицирования дифференцируются от свежих, как на основе клинической картины и данных эпидемиологического анамнеза, так и с использованием лабораторных методов определения концентрации, класса или авидности анти-ВИЧ-антител [3, 4]. Однако серологические тесты, как правило, позволяют уверенно определять срок инфицирования не более 6-12 месяцев [3]. Более длительные периоды от момента заражения серологическими методами не дифференцируются. При этом эффективность серологических тестов в значительной степени зависит от спектра субтипов ВИЧ, представленных в исследуемых образцах [5]. Современный алгоритм дифференциации свежих случаев заражения RITA (Recent Infection Testing Algorithm), кроме серологической, включает оценку по нескольким дополнительным параметрам (клиническая картина, количество CD4, вирусная нагрузка). В настоящее время накоплена информация о возможности использования молекулярно-биологических методов для оценки давности заражения ВИЧ, которая основана на увеличении генетического разнообразия вируса с течением времени вследствие ошибок, возникающих в вирусном геноме во время репликации.

Цель исследования. В связи с вышеизложенным целью работы стала оценка возможности использования комплекса молекулярно-биологических и иммунологических методов для совершенствования определения давности заражения ВИЧ-инфекцией в Краснодарском крае.

Материалы и методы. Обследовано 83 пациента, заразившихся ВИЧ-инфекцией на территории Краснодарского края (41 женщина и 42 мужчины от 14 до 69 лет), с известными сроками заражения, установленными по результатам эпидрасследования в сочетании с характерными для сероконверсии результатами ИФА, определения p24-антигена и иммуноблота (31 чел. (37%) – менее 9 мес.; 52 чел. (63%) - более 9 мес.). У всех пациентов отсутствовал опыт приема антиретровирусных препаратов, в том числе в качестве до- и постконтактной профилактики. Для определения давности инфицирования по изменению количественного и качественного состава антител к gp160 и gp41 ВИЧ-1 использовали тест-систему «ДС-ИФА-ВИЧ-АТ-СРОК» (ООО «Диагностические Системы», Россия) с рекомендованным производителем Cut-off срока заражения 9 мес. В качестве дополнительных критериев для определения давности инфицирования использовали динамику клинической картины, показателей вирусной нагрузки (Cut-off <1000 копий/мл), количества CD4 (Cut-off >200 кл/мкл), а также данные о генетической гетерогенности гена pol ВИЧ-1 по результатам популяционного секвенирования по Сэнгеру, с помощью набора реагентов «AmpliSens HIV-Resist-Seq» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии»). Cut-off срока заражения – 12 мес., распределение по субтипам ВИЧ-1: субтип A1 (68,8%), субтип B (12,5%), различные рекомбинанты (18,7%).

Основные результаты. Результаты сравнительного анализа определения давности инфицирования ВИЧ с использованием различных подходов представлены в таблице.

Метод определения давности инфицирования	Группы по давности	Число больных в группе	Верно определено	Правильность определения
ДС-ИФА-ВИЧ-АТ-СРОК	Менее 9 мес.	31	24	77,4%
	Более 9 мес.	52	50	96,2%
	Всего	83	74	89,2%

Метод определения давности инфицирования	Группы по давности	Число больных в группе	Верно определено	Правильность определения
По данным секвенирования и генетической гетерогенности	Менее 12 мес.	13	12	92,3%
	Более 12 мес.	14	11	78,6%
	Всего	27	23	85,2%
С учетом всех лабораторных и дополнительных параметров	Менее 9 мес.	31	31	100%
	Более 9 мес.	52	52	100%
	Всего	83	83	100%

Как видно из представленных данных, специфичность серологической методики определения давности инфекции (96,2%) выше, чем при молекулярно-биологическом подходе (78,6%), при этом чувствительность – напротив, выше при использовании данных секвенирования (92,3% против 77,4%). Необходимо отметить, что в подгруппе со сроком инфицирования < 9 мес. выявлено 3 дискордантных результата, когда данные серологического тестирования ошибочно свидетельствовали о длительном сроке инфицирования, а результаты молекулярно-биологических исследований правильно указали на недавнее заражение. В подгруппе со сроком инфицирования > 9 мес. зарегистрирован 1 дискордантный результат, когда, напротив, серологический метод верно идентифицировал давнее заражение, а измерение генетического разнообразии вируса послужило основанием для неверного заключения о недавнем инфицировании (< 12 мес.). Комплексная оценка давности заражения ВИЧ с учетом всех исследуемых параметров, в том числе в динамике, позволила в 100% случаев правильно определить срок инфицирования в соответствии с принятыми граничными значениями.

Заключение. Таким образом, комплексное использование серологических и молекулярно-биологических методов в сочетании с анализом дополнительных патогенетически значимых параметров в динамике, позволяет повысить точность определения давности заражения ВИЧ-инфекцией. В условиях расширения масштабов молекулярно-генетических исследований представляется целесообразным использовать получаемые последовательности вирусных геномов для определения предполагаемой длительности инфицирования. Необходимо продолжение исследований для подтверждения выявленных тенденций и обоснования целесообразности применения указанного комплексного подхода для оптимизации системы эпиднадзора за ВИЧ-инфекцией

Литература

1. Справка Федерального научно-методического центра по профилактике и борьбе со СПИДом и ИЗ. ВИЧ-инфекция в Российской Федерации на 31.12.2015 (http://aids-centr.perm.ru/Статистика/ВИЧ/СПИД-в-России).

2. Справка об эпидемиологической ситуации по ВИЧ-инфекции в Краснодарском крае в 2015 году. Краснодар, 2016. – 5 с. (http://www.hivkuban.ru/statistics/).

3. WHO/UNAIDS annual meeting of the technical Working Group on HIV Incidence Assays. Meeting report – 13-15 October 2014, Barcelona, Spain, 1 April 2015 (http://www.who.int/hiv/pub/meetingreports/twg-hiv-incidence-assays/en/).

4. ВИЧ-инфекция и СПИД: национальное руководство / под ред. Акад. РАМН В.В. Покровского. – Москва. ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 608 с.

5. Kassanjee R., Pilcher C.D., Keating S.M. et al. Independent assessment of candidate HIV incidence assays on specimens in the CEPHIA repository. AIDS (London, England). 2014; 28(16):2439-2449

6. Mastro T., Kim A., Hallett T., et al. Estimating HIV Incidence in Populations Using Tests for Recent Infection: Issues, Challenges and the Way Forward. J HIV AIDS Surveill Epidemiol. 2010; 2(1):1-14.

Раздел 12. МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНОГО АНАЛИЗА В ДИАГНОСТИКЕ И ЭПИДЕМИОЛОГИИ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

ПРИМЕНЕНИЕ КВАНТИФЕРОНОВОГО ТЕСТА У БОЛЬНЫХ НА ПОЗДНИХ СТАДИЯХ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЁЗА

Прокопенко А.В.[1], Альварес Фигероа М.В.[1], Парфёнова О.В.[2], Зимина В.Н.[3], Максимов С.Л.[2]

[1]ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия
[2]ГБОУ ВПО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова» МЗ РФ, Москва, Россия
[3]ФГАОУВО «Российский университет дружбы народов» МОиН РФ, Москва, Россия

Введение

В настоящее время диагностика туберкулёза (ТБ) у больных на поздних стадиях ВИЧ-инфекции является актуальной проблемой. В первую очередь это связано с атипично протекающей клинической картиной болезни и частым развитием внелегочных форм ТБ. Глубокий иммунодефицит также приводит к развитию других вторичных инфекций, что ещё больше затрудняет диагностику ТБ. Данная проблема особенно актуальна для инфекционных стационаров, где в кратчайшие сроки необходимо выявить пациентов, требующих перевода в специализированные учреждения фтизиатрического профиля для более углубленной диагностики заболевания и проведения противотуберкулезной терапии. Имеющиеся в распоряжении инфекционной клиники традиционные рентгенологические, микроскопические и другие методы не обладают достаточной диагностической чувствительностью и специфичностью.

В настоящее время квантифероновый тест QuantiFERON-TB Gold in Tube (QIAGEN), наравне с пробой Манту, рекомендуют (строгая рекомендация) для регулярного скрининга больных ВИЧ-инфекцией, как группы с высоким риском развития ТБ (ВОЗ, 2015). Квантифероновый тест, как и другие иммунные тесты (проба Манту, Диаскинтест, T-SPOT.TB и др.), не позволяет дифференцировать активный и латентный ТБ, тем не менее, у больных ВИЧ-инфекцией на стадии выраженной иммуносупрессии с проявлениями вторичных инфекционных заболеваний, требующих госпитализации, учитывая возможность стертой клинической картины, а также быстрой активации латентного ТБ, целесообразно оценить возможность применения теста для данной категории больных в диагностических целях.

Цель и задачи

Оценить диагностические характеристики квантиферонового теста у больных на поздних стадиях ВИЧ-инфекции при проведении дифференциальной диагностики ТБ на этапе инфекционного стационара.

Материалы и методы

Исследование проводилось на базе ГБУЗ «ИКБ № 2» ДЗМ в период с января 2014 г. по апрель 2015 г. В исследование включали пациентов на поздних стадиях ВИЧ-инфекции с наличием хотя бы одного из четырех клинических симптомов, характерных для туберкулёза (лихорадка, потеря массы тела, кашель, потливость). У всех больных было получено информированное согласие на участие в исследовании.

На первом этапе исследования были собраны демографические данные, определен иммунный статус, собрана и подготовлена сыворотка для проведения квантиферонового теста. Квантифероновый тест проводился по окончании сбора материала, поэтому его результаты не влияли на окончательный диагноз. Ретроспективно проанализированы результаты рентгенологических, микроскопических, микробиологических, клинико-диагностических исследований, полученных при обследовании больных в ИКБ № 2 или противотуберкулезных больницах в случае их перевода. Окончательное суждение о диагнозе получено после полного прижизненного или посмертного обследования больных.

За диагноз «Туберкулёз» в данной работе принимали случаи обнаружения микобактерий туберкулеза в диагностическом материале от больных микробиологическими и молекулярно-генетическими методами, эффективности противотуберкулёзной терапии, а также подтверждение диагноза при патологоанатомическом исследовании. В ряде случаев заболевание не было подтверждено вследствие выписки больных по их просьбам или летального исхода до окончания проведения комплекса диагностических мероприятий, поэтому диагноз «Туберкулёз» не был установлен однозначно. У ряда больных был установлен диагноз другой этиологии с положительным исходом от соответствующей этиотропной терапии или, в случае их перевода в противотуберкулезные клиники, диагноз ТБ был отвергнут. На основе этих данных пациенты были нами ретроспективно разделены на три группы: I - больные туберкулёзом, II - больные, у которых диагноз туберкулёз был исключен, III - больные, у которых туберкулёз не был исключен или подтверждён.

Основные результаты

Из 89 отобранных для участия в исследование пациентов в анализируемую группу было включено 77. Остальные исключены по причине отсутствия сведений о вирусной нагрузке, иммунном статусе, результатов квантиферонового теста или сведений о клиническом диагнозе. В анализируемой группе было 69,7% (n = 53) мужчин и 30,3% (n = 23) женщин в возрасте от 24 до 61 года (Me = 36 лет, IQR = 8 лет). Количество CD4+ клеток варьировало от 0 до 476 клеток/мкл (Me = 68 клеток/мкл, IQR = 121 клеток/мкл). Вирусная нагрузка по ВИЧ была в диапазоне от 0 до $3{,}09 \times 10^6$ копий/мл (Me = $1{,}32 \times 10^5$ копий/мл, IQR = $4{,}75 \times 10^5$ копий/мл). Распределение результатов квантиферонового теста по группам представлено в таблице 1.

Диагностическая чувствительность и специфичность теста в нашем исследовании составили 42,3% (ДИ 95%: 23,4 – 63,0) и 65,0% (ДИ 95%: 40,8 – 84,6), соответ-

Таблица 1. Распределение результатов квантиферонового теста среди пациентов

Группа	Положительный	Отрицательный	Сомнительный	Всего
I	11 (42,3%)	11 (42,3%)	4 (15,4%)	26 (100%)
II	2 (10,0%)	13 (65,0%)	5 (25,0%)	20 (100%)
III	3 (9,7%)	18 (58,1%)	10 (32,3%)	31 (100%)
Всего	16 (20,8%)	42 (54,5%)	19 (24,7%)	77 (100%)

ственно. При исключении из расчетов сомнительных результатов – 50,0% (ДИ 95%: 28,2 – 71,8) и 86,7% (ДИ 95%: 59,5 – 98,3), соответственно. Положительная (PPV) и отрицательная (NPV) прогностическая значимость теста составили 84,6% (ДИ 95%: 58,6 – 95,5) и 54,2% (ДИ 95%: 42,7 – 65,2), соответственно. Кроме того, у данной категории больных в нашем исследовании выявлена высока доля сомнительных результатов – 24,7%, тогда как по данным литературы у больных ВИЧ-инфекцией эта цифра не превышает для больных с CD4+ <200 клеток/мкл – 11,6% (ДИ 95%: 7,0 – 18,6), и для больных с CD4+ ≥200 клеток/мкл – 3,1% (ДИ 95%: 1,1 – 8,5) (Santin M. *et al.,* 2012).

Заключение и выводы

Квантифероновый тест позволяет оценить вероятность наличия заболевания при положительном результате у 84,6% больных ТБ, тогда как вероятность отрицательного результата у больных ВИЧ-инфекции при отсутствии ТБ – только у 54,2%. Таким образом, наличие положительного результата требует консультации фтизиатра для назначения углубленного обследования для дальнейшей дифференциации активного и латентного ТБ-процесса, назначения схемы противотуберкулезной терапии, а также для решения вопроса о переводе пациента в противотуберкулезную клинику. Отрицательный результат не гарантирует отсутствия ТБ. В этом случае следует продолжить дифференциальную диагностику ТБ и других вторичных заболеваний с целью поиска этиологической причины с применением других методов, в т.ч. молекулярной диагностики.

Список литературы

1. Santin, M. Interferon-γ Release Assays for the Diagnosis of Tuberculosis and Tuberculosis Infection in HIV-Infected Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis / M. Santin, L. Munoz, D. Rigau // PLoS One. – 2012. – V.7. – №3. – e32482.

ЭМЕРДЖЕНТНЫЕ КЛОНЫ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* В РОССИИ И СТРАНАХ БЫВШЕГО СССР

Мокроусов И.В.

ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Вид Mycobacterium tuberculosis имеет клонального структуру популяции и его отдельные линии (генотипы, семейства) отличают особые эволюционные пути. Кроме того, отдельные компактные кластеры, выявленные в рамках крупных и гетерогенных семейств, представляют особый клинический и/или эпидемиологический интерес. К таковым относятся клональные варианты M. tuberculosis разных генотипов (Beijing, LAM, Ural), которые начали привлекать к себе внимание в последние десятилетия и даже годы в России и других странах бывшего Советского Союза.

Два крупных клональных кластера, обозначаемые как 94-32 и B0/W148, представляют наибольший интерес в популяции Beijing в странах бывшего СССР. B0/W148 был ранее определен как «успешный российский клон» микобактерий туберкулеза (Mokrousov, 2013). Первоначально он был обозначен как B0 (Нарвская, 2003) и W148 (Bifani и др., 2002), на основании IS6110-RFLP-типирования. На основании 24-MIRU-VNTR типирования, этот кластер в основном соответствует типу 100-32 (MIRU-VNTRplus.org). Распространение штаммов Beijing B0/W148-кластера является основной движущей силой российской эпидемии мультирезистентного туберкулеза. Он эпидемически распространен по всей России (но не в Средней Азии) и, вероятно, возник в Сибири, откуда и начал свое эпидемическое распространение в последние 50 лет. Недавние исследования независимо друг от друга "заново открыли" эти штаммы, обозначив их Beijing East-European sublineage Clade B (Casali и др., 2014), Resistant European cluster ECDC0002 (de Beer et al., 2014), East Europe 2 (Luo et al., 2015), и комплекс CC2 (Merker et al., 2015). В отличие от B0/W148, более гетерогенный клональный кластер Beijing 94-32 имеет как среднеазиатское, так и российское распространение и примерно соответствует A0-кластеру на основании IS6110-RFLP (Нарвская, 2003; Мокроусов и др., 2008). Он широко распространен в Средней Азии и является одним из двух крупнейших и значимых подтипов Beijing в России (Skiba et al., 2015; Merker et al., 2015; Luo et al., 2015).

Генетическое семейство LAM (Latin-American Mediterranean) занимает второе место после Beijing в популяции M. tuberculosis в странах бывшего СССР и в основном включает штаммы сублинии RD115 и ее ветви LAM-RUS при спорадическом выявлении штаммов иберoамериканской сублинии RD174/RD-Rio (Mokrousov et al., 2016a). Два резистентных сполиготипа с частично перекрывающимися областями циркуляции привлекают к себе внимание в последнее время. Сполиготип SIT252 характеризуется консервативным профилем 24-MIRU-VNTR, сходными профилями IS6110-RFLP и характерным набором мутаций устойчивости (Vyazovaya et al., 2016); он циркулирует в Европейской части России и Восточной

Европы и уже был описан в спорадических изолятах на Урале (Умпелева и соавт., 2016) и в Казахстане (Ю.А. Скиба, неопубл. данные). Сполиготип SIT266 все еще географически ограничен территорией Белоруссии (Zalutskaya et al., 2013), но уже был выявлен в северо-западной и центральной части России и в Латвии. SIT266 характеризуется множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) (и, возможно, широкой лекарственной устойчивостью), в отличие от своего родительского сполиготипа SIT264, циркулирующего на большей территории, но в малой доле (Mokrousov et al., 2016b).

Генотип Ural до недавнего времени традиционно считался низковирулентным и не ассоциированным с МЛУ, что объясняло его низкую распространенность (<15%) и ограниченную циркуляцию, в основном в центральной части Евразии (Mokrousov, 2012). Однако в последние годы описаны МЛУ штаммы Ural в ряде стран Восточной Европы (Молдова, Литва) и в северо-западной России (Mokrousov, 2015; Vyazovaya et al., 2015; Crudu et al., 2014). Проведенный Синьковым и соавторами (2016) филогенетический анализ геномов штаммов Ural разделил их на две большие группы: (1) предковая, небольшая и гетерогенная группа и (2) крупная и гомогенная, вероятно эволюционно молодая группа. Чувствительные штаммы значимо превалировали в предковой группе (p <0,05) (Синьков и соавт., 2014, 2016).

Причины успеха новых эмерджентных клонов M. tuberculosis могут отличаться в каждом конкретном случае и быть связаны как с недостатками реализации программ борьбы с туберкулезом, так и с особенностями штаммов возбудителя и генетикой хозяина. Сильная ассоциация с МЛУ была показана для штаммов Beijing B0/W148 (по сравнению с другими российскими штаммами Beijing) и генетически, это может быть связано с определенными мутациями резистентности, и, вероятно, компенсаторными мутациями (но не rpoA/rpoC). Мутация N51I в регуляторном гене RelE была предложена в качестве ключевого изменения в эволюции "современной" подгруппы внутри генотипа Ural (Синьков и соавт., 2014, 2016). Различия в потенциале определенных, относительно однородных клональных групп приобретать патобиологически значимые свойства могут быть решающим фактором распространения нового клона в той же человеческой популяции, где циркулировали менее опасные родительские варианты возбудителя.

Благодарность: Российский Научный Фонд (грант #14-14-00292).

ГЕНОТИПЫ ШТАММОВ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* В КАЛИНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ

Вязовая А.А.[1], Соловьева Н.С.[2], Ахмедова Г.М.[3], Туркин Е.Н.[3], Герасимова А.А.[1], Мокроусов И.В.[1], Журавлев В.Ю.[2], Нарвская О.В.[1,2]

[1] ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия
[2]ФГБУ «НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия
[3]ГБУЗ «Противотуберкулезный диспансер Калининградской области», Калининград, Россия

Введение. В Калининградской области, несмотря на снижение заболеваемости туберкулезом с 784 в 2010 г. до 492 в 2015 г., увеличился (с 23,9% в 2010 г. до 31,8% в 2014 г.) удельный вес первичной множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) возбудителя. Согласно опубликованным данным в 2006 году доля генотипа Beijing в структуре популяции *Mycobacterium tuberculosis* составила 40,3%.

Цель исследования: генотипическая характеристика штаммов *M. tuberculosis* на территории Калининградской области.

Материалы и методы. Изучено 93 штамма *M. tuberculosis*, выделенных в течение 2015 г. от вновь выявленных больных, в основном, инфильтративным (57%) и диссеминированным (21,5%) туберкулезом легких (68 мужчин и 25 женщин в возрасте 21-86 лет). Культивирование *M. tuberculosis* и определение лекарственной чувствительности изолятов к основным противотуберкулезным препаратам (ПТП) проводили стандартным непрямым методом абсолютных концентраций. Принадлежность к генотипу Beijing определяли методом ПЦР по выявлению специфической вставки элемента IS*6110* в локусе *dnaA-dnaN* хромосомы. Кластер B0/W148 генотипа Beijing идентифицировали по наличию специфической инсерции IS*6110* в межгенном участке *Rv2664-Rv2665* с помощью мультиплексной ПЦР. Генотипирование штаммов других генетических групп (non-Beijing) осуществляли методом сполиготипирования. Сполиготип (SIT) и принадлежность штаммов к генетическим семействам определяли согласно международной базе SITVITWEB; принадлежность к генотипу LAM - путем выявления специфической мутации GAG→GAA в кодоне 103 гена Ag85C (*Rv0129c*) методом ПЦР.

Результаты исследования. Оценка лекарственной чувствительности 93 штаммов *M. tuberculosis* показала, что 30 (32,3%) сохранили чувствительность к ПТП, у 48 (51,6%) выявлена МЛУ. Установлена принадлежность к генотипу Beijing 61 штамма *M. tuberculosis*, среди которых МЛУ обладали 65,6%. При этом подавляющее большинство (21 из 22) штаммов эпидемиологически и клинически значимого кластера B0/W148 были мультирезистентными. Сполиготипирование 32 изолятов non-Beijing (53,1% сохраняли лекарственную чувствительность) позволило выделить 16 сполиготипов 5 генетических семейств – T, LAM, Ural, S и X. Среди штаммов генотипов T (n=13) и LAM (n=11) наиболее часто встречались сполиготипы SIT53 (n=7) и SIT42 (n=7), соответственно.

Заключение. В Калининградской области у больных туберкулезом легких доминируют штаммы *M. tuberculosis* генетических семейств: Beijing, LAM и T. Доля штаммов семейства Beijing *M. tuberculosis* возросла с 2006 г. на 25,3%, при этом большинство (83,3%) из них обладают МЛУ.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА ТУБЕРКУЛЕЗА У ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ С ПРИМЕНЕНИЕМ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Александрова Н.М.[1,2], Хаммадов Н.И.[2], Шуралев Э.А.[1,3], Елизарова И.А.[2]

[1]ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Россия
[2]ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности – ВНИВИ», Казань, Россия
[3]Казанская государственная медицинская академия – филиал ФГБОУ ДПО «РМАНПО» Минздрава России, Казань, Россия

Введение. В последнее время во многих странах мира происходит ухудшение эпидемиологической обстановки по туберкулёзу. Современные достижения молекулярной биологии и генетики, позволили по-новому представить важные закономерности развития этого заболевания и наметить принципиально новые пути его диагностики. В ветеринарии для прижизненной диагностики туберкулеза широко применяется аллергическая реакция на ППД-туберкулин. На Российском рынке существует ряд ПЦР тест-систем, позволяющих проводить дифференциацию *M.tuberculosis*, *M.bovis* и *M.bovis* BCG, а также *M. avium complex* и др. Однако, для решения нашей цели было необходимо использовать сразу несколько наборов, что экономически не рентабельно.

Цель и задачи. В связи с этим, целью наших исследований являлось выяснение причинно-следственных связей неспецифических аллергических туберкулиновых реакций. Для её решения были поставлены задачи:

1. Провести анализ сиквенсов геномов микобактерий.
2. Создать новую ПЦР тест-систему.
3. Создать технологию дифференциальной диагностики туберкулеза от неспецифической сенсибилизации организма.

Материалы и методы. Для исследований пробы биологического материала (молоко, кровь, соскобы из влагалища и носа) отбирались от КРС в хозяйствах Республики Татарстан. Мокроту от больных людей (с заведомо поставленным диагнозом) получали из противотуберкулезного диспансера. Пробы от животных исследовали бактериологическими и молекулярно-генетическими методами. Пробы от людей молекулярно-генетическими методами.

Основные результаты. Нами был произведен анализ (Next-generation sequencing) сиквенсов геномов микобактерий. В результате анализа полиморфизма высоко-консервативных участков ДНК, были определены общеродовые и видоспецифичные локусы ДНК микобактерий (*M. tuberculosis, M. bovis, M. avium, M. kansasi, M. scrofulacium, M. phlei, M.smegmatis, M. paratuberculosis*) и создан банк ДНК разных видов микобактерий.

В результате изыскания видоспецифичных и общеродовых локусов ДНК микобактерий было определено 17 потенциально перспективных локусов. Как следствие этого анализа, было сконструировано и синтезировано 12 праймеров для амплификации не туберкулезных микобактерий. Для выявления патогенных микобактерий было проанализировано 10 локусов ДНК микобактерий туберкулеза и созданы праймеры для обнаружения патогенных микобактерий.

Нами созданы мультиплексные ПЦР тест-системы для индикации и дифференциации вакцинного штамма M. *bovis BCG* от патогенных видов возбудителей туберкулёза, с определением наличия общеродового участка генома и дифференциации видов человечьего, бычьего и птичьего типов возбудителей туберкулеза, и от других микобактерий.

Мы предприняли попытку по выяснению причинно-следственных связей неспецифических аллергических туберкулиновых реакций, при помощи вновь созданных ПЦР тест-систем для создания технологии установления происхождения специфических и неспецифических аллергических реакций при туберкулезе.

Взятый биологический материал от животных исследовали бактериологическими и молекулярно-генетическими методами. Из 859 проб биологического материала от коров, положительно реагировавших на ППД-туберкулин для млекопитающих, геномов патогенных микобактерий в пробах крови и влагалищной слизи не выявлено. В 27 пробах молока и в 12 пробах носоглоточной слизи обнаружен геном патогенных микобактерий.

Нами установлено, из 65 коров носителей микобактерий (подвергнутых диагностическому забою) лишь 26 были заражены патогенными микобактериями, что говорит о целесообразности определения в пробе не туберкулезных микобактерий как источника парааллергических реакций на туберкулин.

В 287 пробах мокроты от людей, с установленным диагнозом туберкулёза, установлено наличие микобактерий туберкулеза.

Заключение/выводы. Проведен анализ сиквенсов геномов микобактерий. Созданы мультиплексные ПЦР тест-системы позволяющие обнаруживать геномы общеродового участка, вакцинного штамма *M. bovis BCG* и патогенных видов возбудителей туберкулёза.

Показано, что доля истинного туберкулеза, у положительно реагировавших на ППД-туберкулин для млекопитающих коров составила 7,49%, при этом 22% сенсибилизации обусловлено наличием других микобактериозов.

Разработана технология дифференциальной диагностики туберкулеза от неспецифической сенсибилизации организма.

ВЫЯВЛЕНИЕ НАИБОЛЕЕ РАСПРОСТРАНЕННЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ СПОНДИЛИТА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Бердюгина О.В.[1,2], **Голубева Л.А.**[1]

[1]*ФГБУ «Уральский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России*
[2]*ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Екатеринбург, Россия*

Введение. Туберкулезный спондилит – одна из часто встречающихся форм специфического спондилита, характеризующаяся преимущественным поражением грудного и поясничного отделов позвоночника. Отмечено, что она редко бывает моновариантом туберкулезного процесса. Установлено, что *Mycobacterium.tuberculosis* обычно является этиологическим фактором остеомиелита позвоночника в областях, где туберкулез гиперэндемичен. Вместе с тем, по имеющимся в настоящее время данным, на долю других возбудителей заболевания, приводящих к возникновению неспецифического спондилита, приходится от 1,5% до 8% от всех выявленных случаев. В подавляющем большинстве (97,5%) спондилит характеризуется мономикробной флорой. При этом, грамположительные кокки встречаются в 68% случаев (из них *Staphylococcus aureus* – в 57%, *Streptococcus pyogenes* – 4,1%), грамотрицательные микроорганизмы – в 29% случаев (преобладают *Escherichia coli* – 10,5%, *Proteus spp*. – 6,7%, *Pseudomonas aeruginosa* – 5,7%). Очевидно, что выявление патологического агента воспалительного процесса является обязательным компонентом современной этиологической диагностики спондилита, поскольку установление его вида определяет вариант обоснованной антибиотикотерапии. Диагностика спондилита в настоящее время представляет определенные трудности, что обусловлено рядом объективных причин: несвоевременностью обращения больного за медицинской помощью, сложностями дифференцирования патологического состояния имеющимися инструментальными методами, отсутствием возможности ранней идентификации возбудителя заболевания. Это приводит к возникновению диагностических и тактических ошибок, частота которых достигает 73,4%. Важная роль в решении данной проблемы принадлежит оптимизации и адекватному применению молекулярно-генетических и микробиологических методов исследования. Целью данного исследования стало изучение возможностей молекулярно-генетических методов в выявлении наиболее распространенных возбудителей спондилита.

Материалы и методы. Изучали биологический материал, полученный от больных репрезентативной выборки, состоящей из 336 мужчин и женщин в возрасте от 18 до 60 лет с первично диагностированными спондилитами, после скринингового обследования на серологические маркеры вируса иммунодефицита человека 1 и 2 типов, вирусные гепатиты В и С. Из общего количества больных, получавших лечение в ФГБУ «УНИИФ» Минздрава России у 165 пациентов направительный диагноз был «специфический туберкулезный спондилит», у 6 – «остеомиелит позвоночника», у 165 – «спондилит неуточненной этиологии». Результатом диагностических исследований, двухэтапного оперативного лечения – транспедикулярного погружного спондилосинтеза и переднего спондилодеза с резекцией тел позвонков – и лечения стал верифицированный клинический диагноз по МКБ-10 двух вариантов: А18.03 – туберкулез позвоночника, установленный при наличии объективных данных на основании положительных результатов обнаружения возбудителя культуральными, молекулярно-генетическими и гистологическими методами (Приказ МЗ РФ от 29.12.14 года № 951) и М86.0 – остеомиелит позвоночника (неспецифический спондилит), установленный при обнаружении возбудителя культуральными и молекулярно-генетическими методами при наличии клинических данных, указывающих на присутствие неспецифического воспаления. Лабораторные исследования выполнены в сроки и методами, установленными в соответствии с порядком оказания медицинской помощи данной категории больных, они включали молекулярно-генетические, культуральные, гистологические методы изучения биологического материала, микроскопическое исследование. Объектом молекулярно-генетического тестирования был материал из очага поражения (резектат костной ткани). Наличие туберкулезного комплекса с установлением видовой принадлежности и лекарственной чувствительности устанавливали с использованием набора реагентов для выделения ДНК *M.tuberculosis* на магнитных частицах «М-Сорб-Туб» (Синтол, Москва), детекцию осуществляли – с использованием набора реагентов «Амплитуб-РВ» (Синтол, Москва) на приборе CFX-96 (Bio-Rad, США) с визуализацией результата в режиме реального времени. Нагрузку метициллин-чувствительного и метициллин-резистентного *St.aureus*, метициллин-резистентных коагулазонегативных *Staphylococcus spp*. в биологическом материале с гибридизационно-флуоресцентной детекцией проводили, используя тот же прибор, реагенты «АмплиСенс® MRSA-скрин-титр-FL» (Интерлабсервис, Москва).

Основные результаты. Появившиеся наборы, дающие возможность идентифицировать *St.aureus,* призваны оптимизировать ряд сложнодифференцируемых заболеваний, в частности спондилитов. Было установлено, что среди 6 больных, поступивших в клинику с диагнозом «неспецифический спондилит» в 5 (83,3%) случаях он был подтвержден. Возбудитель идентифицирован молекулярно-генетическим и культуральными методами. Во всех случаях выявлен *St.aureus*. В 1 случае определено наличие *M.tuberculosis* культуральными методами в отсутствие наличия ДНК возбудителя при проведении ПЦР-реакции, что нами связывается с такими факторами, как сложности экстракции материала из костной ткани и предоставление разных фрагментов материала на параллельное молекулярно-генетическое и культуральное исследование.

Результат исследования материала второй группы пациентов, поступивших с диагнозом «специфический туберкулезный спондилит», показал, что на основании выполненного комплекса тестов, а также клинико-рентгенологических данных дифференциация больных была

пересмотрена в сторону деления их на две близкие по количеству группы. В частности, в 51,1% случаев диагноз был подтвержден, в 48,9% случаях отвергнут в связи с отсутствием в исследованных образцах *M.tuberculosis,* выявляемых всеми доступными методами.

Третья когорта обследованных – пациенты, поступившие в клинику на лечение с недифференцированными вариантами спондилита. Результатом исследования стало установление у них в 53,3% случаев остеомиелита позвоночника, обусловленного преимущественно наличием *St.aureus* (90,9%) и в 46,7% случаях специфический туберкулезного спондилита.

Заключение. Возникающие сложности дифференцирования основных форм спондилита, очевидно, связаны с идентификацией возбудителя и могут быть преодолены внедрением современных диагностических технологий, к которым относятся методы прямого выявления нуклеиновых кислот возбудителя. В условиях сложившейся культуры лечения больных, когда на момент поиска этиологического агента уже применяется антибактериальная терапия, микробиологические методы верификации диагноза могут не позволять устанавливать возбудителя воспаления, тогда как приоритет молекулярно-генетических исследований становится очевиден. Он обусловлен замедленной элиминаций ДНК патогена в условиях назначенного лечении, что дает возможность выявлять ее еще, как минимум, в течение месяца после начала приема препарата.

Контактное лицо: Бердюгина Ольга Викторовна д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории диагностических и экспериментальных методов исследования. Тел.: 8(904)988-43-82; berolga73@rambler.ru

ОЦЕНКА ОПЕРАЦИОННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX* ИЗ ОБРАЗЦОВ НАТИВНЫХ ЖИДКОСТЕЙ И ТКАНЕЙ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ТУБЕРКУЛЕЗА И ПОСТВАКЦИНАЛЬНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ У ДЕТЕЙ

Альварес Фигероа М.В.[1,2], Прокопенко А.В.[1], Долгова Е.А.[2], Леви Д.Т.[3], Позднякова А.С.[4], Вязовая А.А.[5], Журавлев В.Ю.[6]

[1] ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия
[2] 7-я ТКБ ДЗ г. Москвы (в настоящее время МНПЦ БТ ДЗ г. Москвы), Россия
[3] «Центр экспертизы и контроля МИБП» ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Москва
[4] Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь
[5] ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия
[6] ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

Доказательная диагностика туберкулеза (ТБ) основана на обнаружении в образцах биоматериала пациента возбудителя заболевания - *Mycobacterium tuberculosis complex* (*MTBc*). Традиционные микробиологические методы эффективны лишь в 57% случаев легочного туберкулеза [1]. Бактериологическое подтверждение ТБ внелегочной локализации не превышает 15% [2]. Такое явление связано с уменьшением фитнеса исследуемого микроорганизма.

Диагностика ТБ у детей представляет еще большую сложность, что связано с особенностями патологического процесса и менее специфичными, чем у взрослых, клинико-рентгенологическими признаками. У детей (в возрасте 0-14 лет включительно) чаще встречается внелегочная локализация ТБ-процесса, достигающая 77,8%, тогда как у взрослых она составляет около 15% [1,3]. Бактериологическое подтверждение ТБ у детей в РФ в 2014 г. не превысило 5,2% [3]. У детей трудно получить образцы биоматериала, поэтому при диагностике ТБ легких вместо мокроты, которую дети проглатывают, приходится проводить бронхоскопию или гастроскопию. При диагностике внелегочного ТБ использование свободно экскретируемых материалов малоинформативно, поэтому для подтверждения диагноза проводят исследование биопсийного или, в случае хирургической санации патологического очага, операционного материала.

Кроме того, в ряде случаев требуется проведение дифференциальной диагностики ТБ с поствакцинальными осложнениями БЦЖ. При этом видовая дифференциация внутри группы *MTBc* при использовании бактериологических методов неточна, а в случае дикого и вакцинного штаммов *M. bovis* – невозможна, для этих целей предпочтительно использовать молекулярно-генетические методы.

В настоящее время в клинической лабораторной практике для диагностики ТБ применяют различные молекулярно-генетические методы. В установленном порядке зарегистрирован ряд наборов реагентов (НР) для обнаружения МТВс и единичные НР - для дифференциации видов микобактерий, входящих в состав этой группы. Из них только один НР предназначен для исследования ДНК, выделенной как из культур микобактерий, так и из других видов тестируемого биоматериала: различные жидкости, нативные ткани и ткани в парафиновых блоках, в то время как остальные – только из культур микобактерий, что ограничивает их применение для данной категории больных.

С учетом ряда отличительных особенностей ТБ у детей и необходимости дифференциальной диагностики ТБ и поствакцинальных осложнений оценка качества и эффективности применения ПЦР-НР в клинической лабораторной диагностике для этой категории обследуемых должна проводиться отдельно.

Цель исследования - оценить операционные характеристики комплекса ПЦР- методик, основанного на последовательном применении двух НР, предназначен-

ных для обнаружения и видовой дифференциации *M. tuberculosis complex* методом ПЦР-РВ из образцов нативных жидкостей и тканей.

Материалы и методы

Исследовали образцы различных видов биоматериала: различные жидкости (мокрота, промывные воды бронхов, плевральная жидкость, моча и др.), нативные ткани и культуры микобактерий, взятые у 146 детей в возрасте от 0 до 14 лет включительно. Материал получен из НИИ пульмонологии и фтизиатрии МЗ Республики Беларусь, 7 ТКБ (в настоящее время МНПЦ БТ), Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии, КДЦ, а также педиатрических стационаров различного профиля г. Москвы в период 2006-2015 гг. Дизайн исследования – двойное слепое. Ретроспективно дети были разделены на 3 группы: I - больные туберкулезом (43 ребенка, 66 образцов), II – с поствакцинальными БЦЖ-осложнениями (68 детей, 73 образца), III – с подтвержденными заболеваниями другой этиологии или с латентным ТБ, у которых исключена активность ТБ-процесса (35 ребенка, 35 образцов). Молекулярно-генетическое исследование выполнено для 174 образцов, из которых 51 образец представлял собой культуры *MTBc*. Образцы жидкостей подвергнуты также бактериологическому исследованию, включающему люминесцентную бактериоскопию и посев на плотные или жидкие питательные среды.

Выделение ДНК проводили НР «Рибо-преп» (РУ № ФСР 2008/03147). Комплекс методик включал применение двух НР: с целью обнаружения ДНК *MTBc* использовали НР «АмплиСенс®MTC-FL» (РУ № ФСР 2010/09556), а для дифференциации возбудителя заболевания микобактериальной этиологии – «АмплиСенс®MTC-diff-FL» (РУ № ФСР 2012/13301) (все НР производства ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора). Видовую идентификацию внутри группы *MTBc* в случае исследования культур микобактерий дополнительно подтверждали с помощью метода секвенирования при анализе фрагмента гена *oxyR*.

Результаты. При анализе ДНК всех образцов от детей контрольной группы как с НР для идентификации, так и НР для дифференциации *MTBc* получен отрицательный результат, что подтвердило специфичность оцениваемых НР.

Использование комплекса методик показало в 100% случаев ожидаемые по диагнозу результаты при тестировании ДНК из культур, полученных от 10 больных ТБ детей и от 41 ребенка с поствакцинальными осложнениями. Видовая принадлежность выделенных культур к *M. tuberculosis* или *M. bovis* была подтверждена микробиологическими методами, а в ряде случаев и методом секвенирования.

Оценку положительного и отрицательного соответствия результатов комплекса ПЦР-методик с культуральным методом (который принято считать «золотым стандартом») проводили для тех образцов, которые были параллельно исследованы этими методами без учета диагноза заболевания. Положительное соответствие изучаемого теста с использованием двух НР с методом сравнения составило 100% (95% ДИ: 79,4 - 100,0), тогда как отрицательное соответствие составило 70,8% (95% ДИ: 60,2 - 80,0) для НР «АмплиСенс®MTC-FL» и 76,4% (95% ДИ: 66,2 – 84,8) для НР «АмплиСенс®MTC-diff-FL». Полученные результаты свидетельствуют о полном совпадении результатов обоих ПЦР-НР в случае обнаружения *MTBc* и их более высокую способность к выявлению микобактерий по сравнению с референтным методом. Разница между показателями двух НР обусловлена использованием в их дизайне целевых мишеней различной копийности.

Для оценки диагностической чувствительности применявшихся методов результаты исследования материала I и II групп пациентов объединяли. Оценку всех методов проводили для 88 результатов исследования диагностического материала, взятого в зависимости от локализации патологического процесса. Диагностическая чувствительность люминесцентной микроскопии составила 6%, культурального метода – 16%, НР «АмплиСенс®MTC-FL» - 70%, и НР «АмплиСенс®MTC-diff-FL» - 61% ($p<0,0001$).

Выводы. Определены основные операционные характеристики комплекса ПЦР-методик и проведена оценка его клинической эффективности при диагностике ТБ и БЦЖ-осложнений у детей. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости применения в клинической лабораторной практике, наряду с традиционными микробиологическими методами, комплекса ПЦР-методик.

Список литературы

1. Global Tuberculosis Report, 2016

2. Цыбикова Э.Б., Сон И.М. Динамика показателей заболеваемости и смертности от туберкулеза в России в 2005 г. – «Проблемы туберкулеза и болезней легких». - №3, 2007

3. Туберкулез в РФ, 2012/2013/2014 гг. Аналитический обзор статистических показателей, используемых в РФ и в мире, М., 2015

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* К БЕДАКВИЛИНУ И ЛИНЕЗОЛИДУ

Зименков Д.В.[1], Носова Е.Ю.[2], Кулагина Е.В.[1], Антонова О.В.[1], Арсланбаева Л.Р.[1], Исакова А.И.[2], Крылова Л.Ю.[2], Перетокина И.В.[2], Макарова М.В.[2], Сафонова С.Г.[2], Борисов С.Е.[2], Грядунов Д.А.[1]

[1] Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН), Москва, Россия

[2] ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом» Департамента здравоохранения города Москвы (МНПЦБТ), Москва, Россия

Введение. Ежегодно Всемирная организация здравоохранения регистрирует увеличение числа изолятов *M. tuberculosis* (ТБ), обладающих устойчивостью к применяющимся противотуберкулезным препаратам первой и второй линии терапии. Лекарства нового поколения с доказанным антибактериальным действием, такие как

бедаквилин (BDQ) и линезолид (LZD), призваны преодолеть существующие проблемы терапии пациентов с резистентными формами. Однако их эффективность будет напрямую зависеть от применения молекулярно-диагностических инструментов, основанных на знании о специфичных генетических детерминантах устойчивости, других маркерах, имеющих прогностическое значение для течения болезни и персонифицированного излечения. Если для препаратов первой и второй линии терапии такие механизмы достаточно хорошо изучены, то по лекарствам последнего поколения достоверных данных в настоящее время практически нет.

Цель/задачи. Микробиологические и молекулярно-генетические исследования резистентности возбудителя туберкулеза к бедаквилину и линезолиду. Установление минимальных ингибирующих концентраций (МИК) по данным препаратам с последующей идентификацией генетических маркеров лекарственной устойчивости.

Материалы и методы. В 2014-2016 г. в МНПЦБТ были проведены открытые нерандомизированные клинические исследования 105 пациентов с устойчивыми формами ТБ, получавших терапию бедаквилином и линезолидом согласно IV и V режимов химиотерапии в соответствии с приказом Минздрава России № 951 от 29.12.2014 г. После проведенного курса в соответствии с критериями клинической эффективности (абациллирование мокроты, закрытие каверн) было отобрано 27 пациентов, у которых не было получено положительной динамики при использовании BDQ и LZN и образцы которых исследовали микробиологическими и молекулярно-генетическими методами.

Определение МИК к BDQ (ЗАО «Фармстандарт», Россия; Janssen Pharmaceutica, Бельгия) было проведено с использованием чашек со средой Middlebrook 7H11, с использованием следующих концентраций препарата: 0,03; 0,06; 0,12; 0,25; 0,50; и 1 мкг/мл. По результатам культивирования штамма дикого типа H37Rv, изолятов из контрольной группы чувствительных штаммов и образцов от пациентов с отсутствием положительной динамики была определена пограничная концентрация BDQ, равная 0,03 мкг/мл, превышение которой свидетельствовало о потенциальной устойчивости изолята к BDQ. Критическая концентрация по LZN (Sigma-Aldrich, США) была определена в системе Bactec MGIT 960 и составила 1 мкг/мл.

Идентификацию генетических маркеров резистентности проводили с использованием таргетного секвенирования локусов *mmpR* (*Rv0678*), *atpE*, *atpC*, *pepQ*, *rv1979c* у чувствительных и устойчивых изолятов.

Основные результаты. Проведенный динамический фенотипический и молекулярно-генетический анализ образцов, при котором анализировали изоляты от пациентов до начала терапии, в процессе лечения и по окончании курса (всего – 85 изолятов от 27 пациентов) позволил выявить 65 изолятов от 23 пациентов с МИК к BDQ ≥ 0,06 мкг/мл. При этом повышенные значения МИК по BDQ были зарегистрированы в исходных культурах у 7 пациентов. Формирование устойчивости к линезолиду (МИК ≥1 мкг/мл) было обнаружено у 10 из 21 пациента по окончании лечения. У 6 пациентов сформировалась устойчивость одновременно к LZD и BDQ в процессе лечения. В ходе динамического анализа образцов от пациентов, получающих терапию бедаквилином и линезолидом, смеси штаммов дикого типа и мутантных вариантов, либо различных мутантов были зарегистрированы более чем в 40% случаев. Данное обстоятельство свидетельствует о гетерорезистентности популяции микобактерий и отражает сложную природу эволюции патогена *in vivo*, вызванную селективным давлением терапевтических препаратов.

У 52 из 65 изолятов, обладающих повышенной МИК к BDQ, обнаружены разнообразные мутации в гене *mmpR*, кодирующем транскрипционный репрессор ряда генов, таких как *mmpL5* и *mmpS5*, чьи продукты формируют эффлюксный насос, обеспечивающий транспорт наружу таких препаратов как клофазимин и эконазол. Инактивация данного репрессора приводит к эффективному выводу бедаквилина из клетки. Найденные мутации, приводящие как к аминокислотным заменам, так и к сдвигу рамки считывания, были распределены случайным образом по последовательности гена *mmpR*.

Впервые в бедаквилин-устойчивых изолятах, полученных от пациентов, были обнаружены мутации в гене *atpE,* приводящие к изменению конформации микобактериальной АТФ-синтазы, и отсутствию связывания с ней бедаквилина. Штаммы с такими мутациями ранее были идентифицированы только *in vitro*, предполагая их пониженный фитнесс и нежизнеспособность *in vivo*. Анализ ростовых единиц в системе Bactec в нашем случае показал, что фитнесс таких штаммов весьма близок к изолятам дикого типа.

Наиболее часто встречающейся мутацией у устойчивых к LZD штаммов была замена t460c в гене *rplC*, что согласуется с предыдущими исследованиями. В одном образце нами найдена новая, не описанная ранее, двойная замена в позициях 460 и 462 гена *rplC*, приводящая к замене аминокислоты C154R в рибосомном белке L3. Секвенирование последовательностей гена 23S рРНК выявило две ассоциированные с устойчивостью к линезолиду мутации – описанную ранее замену g2814t и впервые выявленную нами g2294a. Все эти мутации изменяют структуру пептидил-трансферазного центра рибосомы предотвращая связывание линезолида.

Анализ характеристического полиморфизма у изолятов, полученных от 27 пациентов, выявил подавляющее (25/27) доминирование генотипа Beijing с преобладанием кластера Beijing B0/W148 (15/25), что подтверждает высокое адаптивное преимущество данного семейства, проявляющего эффективный мутаторный фенотип.

Заключение/выводы. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости проведения микробиологических и молекулярно-генетических исследований изолятов от пациентов с лекарственно-устойчивыми формами ТБ, планируемых к переводу на режимы терапии с применением бедаквилина и линезолида. Данный комплекс тестов должен применяться как до начала курса, так и в процессе лечения с целью оценки эффективности химиотерапии больных с тяжелыми лекарственно-устойчивыми формами туберкулеза. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ #14-50-00060.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* COMPLEX ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ИЗОНИАЗИДУ И РИФАМПИЦИНУ

Луданный Р.И.[1], Альварес Фигероа М.В.[1], Попов С.А.[2], Лобашова Г.П.[3], Кравцова Т.А.[1], Валдохина А.В.[1], Шипулин Г.А.[1]

[1]ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия
[2]НИИ фтизиопульмонологии ММА им. И. М. Сеченова, Москва, Россия
[3]7-я Туберкулезная клиническая больница ДЗ города Москвы, Москва, Россия

Введение. Заболеваемость туберкулезом, оставаясь одной из серьезнейших проблем для национальных систем здравоохранения в большинстве стран мира, уносит около двух миллионов смертей ежегодно, согласно докладу ВОЗ (Доклад о глобальной борьбе с туберкулезом, 2016 год). Наряду с тем, что количество новых случаев заболевания населения штаммами *Mycobacterium tuberculosis* complex (МТВс) до сих пор остается высоким, наибольшей проблемой является распространение штаммов с лекарственной устойчивостью. Зачастую, такие штаммы, по мнению ряда авторов, обладают повышенной вирулентностью, устойчивостью к более чем одному противотуберкулезному препарату, что может отражаться на их трансмиссивности. Понимание того, какие частоты встречаемости мутаций и их возможные сочетания могут встречаться в штаммах МТВс, в дальнейшем может предопределить набор маркеров и выбор диагностической молекулярно-генетической методики, которая окажется оптимальна для выявления резистентных штаммов.

Цель и задачи. Исследовать генетическую вариабельность локусов, ассоциированных с устойчивостью штаммов МТВс к изониазиду и рифампицину, выявить внутригенную вариабельность и определить возможное сочетание мутаций - основная цель этого исследования.

Материалы и методы. Молекулярно-генетические методы исследования локусов *(rpoB*, *katG* и промоторная часть гена *inhA*), ассоциированных с феноменом устойчивости в совокупности с биостатистикой послужили основой для получения результатов. ДНК из 436 образцов клинических изолятов, включая повторные, полученные от пациентов в процессе противотуберкулезной терапии и собранные в течение последних десяти лет на территории России. ДНК была проверена на наличие возбудителя туберкулеза помощью набора реагентов АмплиСенс MTC-FL (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии). Наличие генетических изменений в генах *rpoB*, *katG* и зоне промотора гена *inhA* с использованием локус-специфичной ПЦР и праймеров собственного дизайна с последующей детекцией фрагментов посредством электрофоретического разделения в агарозном геле и секвенированием по Сэнгеру. Генетические показатели были рассчитаны с помощью пакетов программ Geneious (Ver. 7.1.12) и Mega (Ver. 6.1).

Основные результаты. В нашем исследовании отбор штаммов носил случайный характер, тем самым данные, полученные в ходе исследования, могут более достоверно отражать генетические характеристики выборки штаммов. Из-за разницы в их длинах и длинах анализируемых ампликонов, а также показателях вариабельности для каждого параметра, нормализацию статистических показателей проводили с использованием коэффициента вариабельности, как для всего локуса (К ген), так и для анализируемых ампликонов - К ампликона (К amp).

Анализ результатов свидетельствуют о высоком генетическом разнообразии выборки. При этом стоит отметить, что доля диких генотипов составила 49,7%, а мутантных 51,3%, соответственно. На разнообразие прямым образом указывают оценки гетерогенности (Таблица 1), которые составили 23,8% (для участка промотора гена *inhA)*, 63,9% *(rpoB)* и 67,2% *(katG).* Косвенно это подтверждается и коэффициентом вариабельности, который варьировал от 0,008 *(katG)* до 0,08 *(inhA*). Несмотря на многообразие выявленных мутаций, для каждого локуса был определен пул наиболее часто встречаемых, частота которых превысила 3%.

Таблица 1. Генетическая характеристика исследованной выборки

локус	L п.н.	var obs	К ген	L amp	var obs amp	К amp	h,%	w- штаммов,%
inha-promotor	**35**	3	0,08	35	3	0,08	23,8	23,3
katG	**223**	46	0,2	450	4	0,008	63,9	67,8
rpoB	**519**	80	0,09	330	20	0,06	67,2	63,3

(L – длина локуса; var obs - наблюдаемая вариабельность исследуемого локуса; К ген – коэффициент вариабельности гена (К=L/var obs); L amp – длина ампликона; var obs amp - наблюдаемая вариабельность в полученных ампликонах ; К amp – коэффициент вариабельности ампликона (К=L amp/var obs amp); h% - генетическое разнообразие мутаций; w-% штаммов - доля мутантных штаммов по отношению ко всей выборке)

Во всей выборке в зоне промотора гена *inhA* до 21% от всех проанализированных штаммов имели замену C>T в положении -15. У 41,5% штаммов в гене *rpoB* чаще обнаруживалась мутация p. Ser 531>Leu (c. 1349 C>T), при этом, несмотря на самое высокое разнообразие мутаций (h = 67,2%), частота встречаемости других типов мутаций в данной выборке не превышала 1,8%. Также отметим, что в секвенограммах этого участка в 28 раз чаще, по сравнению с другими проанализированными локусами, мы обнаруживали наличие двойных пиков, указывающих либо на сочетание мутантного и дикого генотипов, либо на сочетание разных мутаций внутри одной последова-

тельности. В то же время, в гене *katG* у 63% штаммов была обнаружена мутация p. Ser 315 > Thr (c. 944 G>C) в мономорфном состоянии, а доля всех других генетических изменений не превысила 3%. При анализе сочетания замен в исследуемых локусах во всей выборке было обнаружено, что доля штаммов, где мутации в гене *rpoB* одновременно детектировались в каком-то одном из двух других генов (промоторная часть *inhA u katG)*, достигала 41,6%, что составило 87,3% от количества всех мутантных штаммов. Это коррелирует с мировыми данными.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что популяция штаммов, циркулирующая в России, гетерогенна и вариабельна. Кроме того, было показано, что замены в генах, ассоциированных с феноменом устойчивости к изониазиду и рифампицину, часто могут образовываться у мутантных штаммов одновременно. Эти результаты могут найти применение в создании диагностических наборов для определения наличия устойчивых к препаратам изониазид и рифампицин МТВс у пациентов.

ГЕНОМИКА РОССИЙСКОГО ВАКЦИННОГО СУБШТАММА *M. BOVIS* BCG-1

Луданный Р.И.[1], Альварес Фигероа М.В.[1], Леви Д.Т.[2], Маркелов М.Л.[1], Дедков В.Г.[1], Александрова Н.А.[2], Шипулин Г.А.[1]

[1]ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия
[2]«Центр экспертизы и контроля МИБП» ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, г. Москва

Введение. Несмотря на многочисленные альтернативные превентивные меры, направленные на защиту населения от заражения туберкулезом, иммунизация БЦЖ новорожденных детей до настоящего времени остается одним из главных способов профилактики этого заболевания. Вакцину против туберкулеза на протяжении многих десятилетий производят как в России, так и в большинстве других стран мира, используя аттенуированный вакцинный штамм *Mycobacterium bovis* BCG (BCG англ. – Bacillus Calmette-Guerin). Несмотря на многолетнюю историю применения, только с открытием метода полногеномного секвенирования начались масштабные исследования в области сравнительной геномики и молекулярной генетики субштаммов БЦЖ. Работы по определению полных нуклеотидных последовательностей генетически-детерминированных линий субштаммов *M. bovis* BCG стимулировали исследования российского субштамма *M. bovis* BCG-1.

Цели и задачи. Исследование направлено на определение полной нуклеотидной последовательности *M. bovis* BCG-1 (Russia), изучение архитектуры генома, его особенностей, генетической характеристики, что позволит прогнозировать биохимические и иммунологические свойства. В рамках исследования проведен предварительный сравнительный анализ этого субштамма с известными в мире генетически-детерминированными линиями субштаммов *M. bovis* BCG.

Материалы и методы. Лиофилизированный в 2006 г. seed lot 368 «щ», депонированный в государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФГБУ НЦЭСМП Минздрава России, применяется для производства отечественных вакцин БЦЖ и БЦЖ-М с 2008 г. Для получения полной аннотированной последовательности *de novo* с правильно ориентированной структурой всех элементов генома мы использовали две технологические платформы для полногеномного секвенирования: GS Junior (Roche) и MiSeq (Illumina). Коррекцию отдельных вариабельных участков осуществляли с помощью секвенирования по Сэнгеру. Биоинформатические и биостатистические задачи решали с помощью пакетов программ Geneious (Bep.7.0.6), ALE, Blast2go, Artemis, MEGA, ROSETTA и SABER.

Результаты и обсуждение. Протяженность кольцевой молекулы, депонированной в базу данных нуклеотидных последовательностей Genbank [CP_011455] составила 4,363,945 нуклеотидов ((4,36Mb) с составом AT/GC - 35,5/65,5%, соответственно. Аннотация функциональных и структурных характеристик генома показала 4119 элементов, из которых 3916 (95%) имели открытую рамку считывания (ORF), 86 образованы сдвигом ORF, 149 предположительно имели псевдогенный характер происхождения, а 6 участков были соотнесены с некодирующей функцией. Кроме того, нами были обнаружены 45 генов тРНК, 3 гена рДНК (с классической структурой цистрона 5s, 16s и 23s) и 3 тандемных палиндромных повтора, относящихся к системе CRISPR-CAS. Расчет генетических дистанций между штаммами, полногеномные последовательности которых размещены в банке данных, показал наиболее высокий процент сходства (96,5%) между российским *M. bovis* BCG-1 (Russia) [CP_011455] и японским *M. bovis* BCG Tokyo–172 [NC_012207], что предопределило использование последнего в качестве референсного.

Определив ключевые вариабельные участки (N=182) в геноме *M. bovis* BCG-1, предположительно влияющие на генетическую стабильность вакцинного штамма, рассчитали для каждого из них скорость дивергенции для выявления изменений, которые являются эволюционно значимыми. С учетом непродолжительной истории культивирования, правильность расчета корректировалась с использованием поправки Бонферрони. Точечные генетические изменения были рассмотрены на предмет их возможного влияния на биохимические особенности штамма лишь в тех отобранных участках, изменения в которых происходили после точки создания вакцины ее авторами (1921 г.), Например, мутация c.581G>C (p. Gly194Ala) в гене *atpD* (β субъединица АТФ-синтазы), согласно нашим расчетам, возникла после 1960 года (±2). С использованием 3D-моделирования, *in silico* был выявлен возможный эффект на изменение, как пространственной структуры белка вследствие перераспределения заряда, так и смещением туннелей между субстратом и топографией активного центра. Следует отметить, что локализация мутации в гене не была сопряжена ни

с активным центром, ни с лигандом белка. Однако при компьютерной симуляции были обнаружены различия в количестве и пространственной структуре туннелей в белке АТР (β-субъединица) российского субштамма при сравнении с другими, входящими в группу I (DU2*) (*M. bovis* BCG Moreau и *M. bovis* BCG Tokyo), предположительно возникшие из-за точечных нуклеотидных изменений. Данное явление может вызывать кинетическую асимметрию при синтезе АТФ, что, в конечном счете, способно влиять на изменение фитнеса бактерии.

Выводы. Определена полная аннотированная последовательность вакцинного штамма *M. bovis* BCG-1, используемого для приготовления вакцины БЦЖ в России и ряде других стран, выявлена архитектура генома, его структурные особенности, определены генетические характеристики и предпринята попытка моделирования процессов, при которых генетические изменения могут влиять на метаболические процессы в клетке. В дальнейшем эти результаты могут найти отражение в создании высокоэффективных молекулярно-диагностических систем для определения стабильности генетического материала вакцинных штаммов.

Литература

* Brosch R. et al. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. 2007. Proc Nat. Acad Sci №104 pp. 5596–5601.

ВАЛИДАЦИЯ АВТОМАТИЗИРОВАННЫХ МЕТОДИК ЭКСТРАКЦИИ ДНК *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* COMPLEX

Прокопенко А.В., Альварес Фигероа М.В.

ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение. Основными преимуществами автоматизации процесса экстракции нуклеиновых кислот принято считать сокращение влияния «человеческого фактора» на результаты исследования (сокращение потерь нуклеиновых кислот, высокую воспроизводимость исследований и предотвращение кросс-контаминации), увеличение пропускной способности лаборатории, оптимизацию распределения рабочего времени персонала или сокращение штата, а также уменьшение себестоимости исследований.

К настоящему времени нами опубликовано несколько работ, в которых была произведена оценка эффективности экстракции и воспроизводимости различных автоматизированных методик экстракции ДНК *Mycobacterium tuberculosis* complex (МТВс). Полученные результаты свидетельствовали о возможности использования автоматизированных решений в практике клинических лабораторий для автоматизации процесса экстракции нуклеиновых кислот.

Цель и задачи. Провести расчет необходимого рабочего времени, пропускной способности лаборатории и себестоимость анализа при проведении экстракции с помощью автоматизированных методик экстракции ДНК МТВс.

Материалы и методы. Мануальная экстракция ДНК МТВс была проведена с помощью набора реагентов (НР) «Рибо-преп» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора) согласно инструкции производителя. Автоматическая экстракция выполнена на станциях «Xiril Neon 100» («Xiril») и «MICROLAB STARlet IVD» («Hamilton») с использованием НР «Магно-сорб» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора), а также на станции «MagPurix 12s» с использованием НР «TB DNA Extraction Kit» («Zinexts Life Science Corp.»).

Расчет пропускной способности и учет рабочего времени выполнен для максимального количества образцов, которое способна обработать станция за один запуск: 96 образцов для «Xiril Neon 100» и «MICROLAB STARlet IVD», 12 образцов для «MagPurix 12s», или оператор в ручном режиме за одну экстракцию НР «Рибо-преп» – 24 образца.

В клинических лабораториях, как правило, экстракцию нуклеиновых кислот проводит средний медицинский персонал (лабораторные техники или фельдшеры-лаборанты). Максимально возможное количество экстракций в день рассчитано с учетом времени, необходимого на подготовку к экстракции и уборке рабочего места по окончании работ. Продолжительность рабочего дня рассчитана исходя из 30-часовой рабочей недели в учреждениях противотуберкулезной службы, сокращенной вследствие вредных условий труда. Также учитывалось, что только 80% рабочего времени среднего медицинского персонала, затрачивается на непосредственное проведение лабораторных исследований. (Приказ №380 от 25.12.1997г. Минздрава РФ, Постановление Правительства РФ №101 от 14.02.2003г.)

В оценку себестоимости анализа были включены стоимость реагентов для экстракции, расходных материалов и оплаты среднего медицинского персонала.

Основные результаты. Полученные данные свидетельствуют о том, что наиболее выгодным является включение в рабочий процесс станций с большой максимальной загрузкой («Xiril Neon 100» и «MICROLAB STARlet IVD»). За шестичасовой рабочий день возможно экстрагировать ДНК из 96 образцов, при этом оператор затрачивает 50 мин. рабочего времени (см. таблица 1). Экстракция того же числа образцов мануальной методикой потребовала бы от оператора 240 мин. Однако при отсутствии большого потока образцов в лаборатории использование таких станций неэффективно. Из-за продолжительного времени работы самой станции (150 мин.) возможно выполнение не более 1 запуска в день с учетом сокращенного рабочего дня.

Станции с небольшим количеством одновременно загружаемых образцов («MagPurix 12s») практически не позволяют увеличить пропускную способность лаборатории или значительно сократить время работы оператора (120 мин. для «MagPurix 12s» против 140 мин. для ману-

альной методики). Однако их использование позволяет более оперативно выполнять молекулярно-биологические исследования без необходимости накапливать достаточное количество образцов для рентабельной работы прибора. Кроме того, внедрение таких станций может быть эффективным при использовании в кластере. Такой подход позволяет использовать различные методики экстракции для параллельного исследования разных видов материалов или других инфекционных агентов.

Расчет стоимости экстракции показал, что автоматизация процесса экстракции ДНК МТВс позволяет снизить затраты на 8 - 14% по сравнению с мануальной методикой в зависимости от применяемой платформы.

Заключение и выводы. В настоящей работе было показано, что использование автоматизированных методик позволяет увеличить пропускную способность лаборатории и сократить трудозатраты на экстракцию ДНК МТВс. Использование автоматизированных методик в лаборатории позволяет снизить стоимость экстракции ДНК МТВс.

Таблица 1. Учет рабочего времени оператора и максимальная пропускная способность методик экстракции

Методика экстракции	Максимальная пропускная способность, образцов в день	Общее время работы оператора при максимальной пропускной способности, мин.	Время, затрачиваемое оператором на одну экстракцию (или загрузку), мин.
НР «Рибо-преп»	48	280	140
«Xiril Neon 100»	96	50	50
«MicroLab STARlet IVD»	96	50	50
«MagPurix 12s»	48	120	30

ИЗУЧЕНИЕ ПОПУЛЯЦИИ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX*, ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ НА ТЕРРИТОРИИ МОСКОВСКОГО МЕГАПОЛИСА

Альварес Фигероа М.В.[1,2], Луданный Р.И.[1], Вязовая А.А.[2], Мокроусов И.В.[2], Лобашова Г.П.[3]

[1] ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия
[2] ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия
[3] 7-я ТКБ ДЗ г. Москвы (в настоящее время МНПЦ БТ ДЗ г. Москвы), Россия

Введение. Организация мероприятий, способствующих сокращению заболеваемости туберкулезом (ТБ), основана в т.ч. на изучении циркулирующего на территории возбудителя заболевания - *Mycobacterium tuberculosis* complex. Для этого идентифицируют его видовой состав, исследуют спектр фенотипической чувствительности и определяют генетические маркеры устойчивости, а также выявляют его филогенетическое разнообразие. Проведение такого исследования в варианте отбора репрезентативной выборки клинических изолятов в виде ежегодного мониторинга осуществляется в ряде стран.

Целью нашей работы было исследование видового состава, частоты встречаемости и вариантов мутаций в генах *rpoB*, *katG* и промоторе *inhA*, а также их сопряжения с множественной лекарственной устойчивостью в зависимости от генотипа *M. tuberculosis* complex на территории мегаполиса г. Москвы.

Материалы и методы. В период с 2008 по 2009 г. в 7 туберкулезной клинической больнице (в настоящее время Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом) нами был проведен сплошной сбор 133 клинических изолятов от 124 больных с массивным бактериовыделением, в которых количественные показатели бактериоскопии были не менее 1 «+». Включение в дальнейший анализ результатов исследований происходило по принципу «один больной - один клинический изолят».

ДНК из культур выделяли с помощью набора реагентов «РИБО-преп». ПЦР, для подтверждения принадлежности выросшей культуры к *M. tuberculosis complex*, проводили с использованием набора реагентов «АмплиСенс® *MTC*-FL», а дальнейшую видовую дифференциацию - «АмплиСенс® *MTC*-diff-FL» (все наборы – производства ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). ПЦР проводили на приборах Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия) и Терцик (ДНК-Технология, Россия). Генетический анализ локусов генов *rpoB*, *katG* и промотора *inhA*, мутации в которых ассоциированы с устойчивостью к рифампицину и изониазиду, проводили методом прямого секвенирования по Сэнгеру на анализаторе ABI PRISM 3500xL (Applied Biosystems, США).

Определение фенотипической чувствительности МБТ к рифампицину и изониазиду проводили с помощью

метода абсолютных концентраций на среде Левенштейна-Йенсена. Штамм считался устойчивым, если он давал рост культуры более 20 КОЕ при критической концентрации к рифампицину – 40 мг/л и изониазиду – 1 мг/л.

Генотипирование проводили методом сполиготипирования. Результаты сполиготипирования оценивали визуально для каждого из 43 спейсеров, и представляли с помощью бинарного кода: 1 (наличие спейсера) и 0 (отсутствие спейсера) в формате Excel. Для классификации полученных профилей сполиготипирования использовали международную компьютерную базу данных SITVITWEB (http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/).

Результаты. Тестирование ДНК методом ПЦР всех клинических изолятов подтвердило их принадлежность к *M. tuberculosis* complex, дальнейшее исследование позволило идентифицировать вид - *M. tuberculosis.*

На основании исследования методом секвенирования генов *M. tuberculosis*, ассоциированных с лекарственной устойчивостью, был проведен отбор клинических изолятов для дальнейшего анализа. В исследование было включено 95 клинических изолятов (культур) от 94 больных, т.к. у одного больного рост культуры был получен из биоматериала двух различных локализаций с несовпадающим спектром мутаций (который был идентичен в повторах), что позволило предположить развитие патологического процесса, обусловленного разными штаммами.

По результатам сполиготипирования все клинические изоляты были разделены на 2 группы генотипов: Beijing и non-Beijing. Количество Beijing составило 62 штамма – 63,3%, а non-Beijing составило 33 штамма – 34,7% (p=0,0095). Среди штаммов non-Beijing чаще других встречались следующие генотипы – LAM (36,4%, 12/33) двух профилей – 42 и 254, T1 (18,2%, 6/33), Ural (9,1%, 3/33), H1 и T4 (по 6,1%, 2/33). Остальные генотипы встречались в единичном количестве: X1, T4-CEU1, T1-RUS2. Кроме того, в одном случае наблюдалась смесь штаммов, в двух случаях база данных SITVIT_WEB не позволила отнести их к конкретному семейству (генотипу), а также было обнаружено 2 новых сполиготипа.

Оценка частоты встречаемости генотипов *M. tuberculosis*, проведенная относительно места проживания у постоянного населения больных туберкулезом показала, что генотип Beijing чаще встречался у жителей Центрального региона (67,2%, 43/64), чем у больных из Кавказского региона (54,5%, 9/11), или более отдаленных регионов России или близлежащих стран (42,9%, 3/7). Вместе с тем у лиц БОМЖ Центрального региона наблюдается тенденция к увеличению доли генотипа Beijing– 76,9% (10/13) (P=0.4886). Учитывая, что этот генотип обладает большей трансмиссивностью, больные туберкулезом лица БОМЖ могут являться резервуаром инфекции повышенной опасности.

Анализ частоты встречаемости разных мутаций, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину, среди двух групп генотипов, показал их статистически достоверное различие. Мутация Ser 531>Leu у генотипа Beijing встречалась в 75,8% случаях, тогда как у non-Beijing – только в 21,2% (p<0.0001). Другие варианты мутаций в гене *rpoB* у генотипа Beijing встречались только в 3,2% случаях, тогда как у non-Beijing – в 30,3% (P = 0.0002). Ген дикого типа наблюдался у генотипа Beijing в 21% случаев, а у non-Beijing – в 48,5% (P = 0.0059).

Проведение подобного анализа для локусов генома *M. tuberculosis - katG* и промотора *inhA,* ассоциированных с устойчивостью к изониазиду, показало, что одновременное наличие в них мутаций: у генотипа Beijing в 16,1% случаев, а у non-Beijing – в 36,4%, а также частота одновременной встречаемости локусов дикого типа: 9,1% и 39,4%, достоверно не различались. Мутации только в регуляторной области гена *inhA* встречалось в небольшой доле в обоих генотипах – 4,8% и 6,1%, соответственно. В то же время достоверное различие было выявлено при наличии генетических изменений только в гене *katG*: у генотипа Beijing - в 61,3%, у non-Beijing – в 18,2% (P = 0.0001).

Частота встречаемости комбинации из любых мутаций в гене *rpoB,* а также в локусах – *katG* и *inhA* одномоментно или по-отдельности, достоверно различалось: у генотипа Beijing – в 82,3% случаев, а у генотипа non-Beijing – в 54,5% (p=0.0039). Тогда как сопряжение этой комбинации с МЛУ (множественная лекарственная устойчивость)-фенотипом встречалось с практически равной частотой: 64,7% и 66,7%. Одновременное наличие всех генов дикого типа встречалось в 17,7% у генотипа Beijing и в 39,4% - non-Beijing (P = 0.0211).

Выводы. Проведено комплексное молекулярно-генетическое и бактериологическое исследование, позволившее установить ряд закономерностей у циркулирующей на территории г. Москвы популяции *M. tuberculosis*.

РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАЦИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА

Микулович Ю.Л.[1], Савочкина Ю.А.[1], Альварес Фигероа М.В.[1], Луданный Р.И.[1], Тимошина О.Ю.[1], Кравцова Т.А.[1], Попов С.А.[2], Лобашова Г.П.[3], Шипулин Г.А.[1]

[1] ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия
[2] ФГБОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» МЗРФ, НИИ фтизиопульмонологии, Москва, Россия
[3] ГКУЗ «Туберкулезная клиническая больница № 7» ДЗ г. Москвы (в настоящее время ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом» ДЗМ), Россия

Введение. Проблема распространенности туберкулеза (ТБ) с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя актуальна во всём мире. Для своевременного назначения пациенту соответствующей схемы терапии необходимо быстрое и точное выявление лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis complex* (*MTC*) к противотуберкулезным препаратам (ПТП). С этой целью могут использоваться молекулярно-генетические методы исследования, обеспечивающие выявление мутаций, ассоциированных с устойчивостью *MTC* к ПТП. Мутации в

области RRDR гена *rpoB* связаны с возникновением устойчивости *MTC* к рифампицину, а мутации главным образом в кодоне 315 гена *katG* и/или в промоторе гена *inhA* – к изониазиду. В настоящее время существует ряд наборов реагентов (НР) отечественного и зарубежного производства для выявления мутаций в этих генах, однако им свойственны те или иные существенные ограничения: недостаточная аналитическая чувствительность, риск контаминации продуктами амплификации или высокая стоимость. Таким образом, существует потребность в создании НР, позволяющего преодолеть перечисленные ограничения и выявлять генетические маркеры устойчивости *MTC* как к рифампицину, так и к изониазиду. Использование подхода, основанного на одноэтапной мультиплексной ПЦР с детекцией в реальном времени (ПЦР-РВ), позволяет устранить риск контаминации, связанный с пост-амплификационной детекцией или двухэтапной ПЦР, и одновременно обеспечивает выявление спектра мутаций, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину и изониазиду.

Цель работы – разработка и лабораторные испытания НР на основе одноэтапной мультиплексной ПЦР-РВ для выявления широкого спектра мутаций в RRDR области гена *rpoB* и наиболее распространенных мутаций в кодоне 315 гена *katG* и в промоторе гена *inhA*.

Материалы и методы. Для тестирования выбранных для детекции мутаций флуоресцентно-меченых олигонуклеотидных зондов использовали панель положительных контрольных образцов ДНК, каждый из которых представлял собой синтезированный из олигонуклеотидов фрагмент ДНК-мишени, содержащий одну из целевых мутаций или мутации в нескольких кодонах, клонированный в плазмидный вектор pGEM-t.

ПЦР-РВ проводили параллельно с использованием систем для амплификации как роторного (Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия)), так и планшетного типа (CFX96 Touch™ Real-Time PCR (Bio-Rad, США)) для сравнения результатов при использовании обоих типов систем. Для оценки аналитической чувствительности проводили тестирование двукратных разведений суспензии культуры *M.bovis* BCG-1 (Russia) в восьми повторах в диапазоне концентраций 5×10^6–5×10^1 м.т./мл в физиологическом растворе, а также в пулированном и индивидуальных образцах мокроты, полученных от разных пациентов (не имевших ТБ в анамнезе), в которых *MTC* не выявлены ни бактериологически, ни методом ПЦР с помощью НР «АмплиСенс® MTC-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Экстракцию нуклеиновых кислот проводили с помощью НР «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Возможность неспецифических результатов оценивали при тестировании панели образцов ДНК 59 штаммов и культур микроорганизмов различных видов, включая нетуберкулезные микобактерии (НТМБ) и микроорганизмы других родов и семейств в концентрации не ниже 5×10^7 ГЭ/мл, а также ДНК из 57 образцов биоматериала различного вида (мокрота, промывные воды бронхов, ликвор, плевральная жидкость), полученных от пациентов с заболеваниями отличной от ТБ этиологии. Обнаружение ДНК *MTC* и дифференциацию до вида осуществляли с помощью НР «АмплиСенс® MTC-FL» и «АмплиСенс® MTC-diff-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора).

Референс-методом выявления мутаций являлось секвенирование по Сэнгеру последовательностей генов *rpoB*, *katG* и промоторной области гена *inhA*, которое проводили на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500xL (Applied Biosystems, США).

Для проведения испытаний НР использовали ДНК 224 культур *M.tuberculosis*, полученных из образцов различных видов биоматериала. На основе сопоставления результатов, полученных с помощью разработанного НР и методом секвенирования последовательностей целевых генов, оценивали следующие характеристики:

– положительное соответствие результатов – доля образцов, в которых выявлены мутации с помощью тестируемого НР, среди образцов с мутациями в целевых участках ДНК *MTC* по результатам секвенирования;

– отрицательное соответствие результатов – доля образцов, в которых с помощью тестируемого НР мутации не выявлены, среди образцов, в которых нет мутаций в целевых участках ДНК *MTC* по результатам секвенирования.

Основные результаты. Разработан НР «*MTC*-MDR» (рабочее название), позволяющий с помощью трех мультиплексных ПЦР-РВ выявлять мутации в RRDR области и в кодоне 572 гена *rpoB*, в кодоне 315 гена *katG* и в промоторной области гена *inhA*. Для максимального охвата спектра возможных мутаций были выбраны олигонуклеотидные зонды, комплементарные определенным участкам ДНК *MTC* дикого типа. При использовании такого подхода принцип выявления мутаций в ДНК заключается в том, что отсутствие подъема флуоресцентного сигнала от определенного зонда (отсутствие порогового цикла (Ct)) означает наличие мутации на участке гибридизации этого зонда. Разработанный НР интегрирован в линейку НР «АмплиСенс» для диагностики ТБ, предполагается его использование после обнаружения в образцах ДНК *MTC* с помощью НР «АмплиСенс® MTC-FL».

Аналитическая чувствительность НР «*MTC*-MDR» для разведений суспензии культуры *M.bovis* BCG-1 в физиологическом растворе составила 5×10^2 м.т./мл, в образцах мокроты – 2×10^3 м.т./мл.

При тестировании ДНК культур и штаммов НТМБ, а также других микроорганизмов различных родов и семейств неспецифические результаты отсутствовали.

Проведены лабораторные испытания разработанного НР, в ходе которых протестированы образцы ДНК 224 культур *M.tuberculosis*. Результаты выявления мутаций с помощью НР «*MTC*-MDR» оценивали по соответствию с результатами секвенирования («золотого стандарта» для молекулярно-генетических методов) генов *rpoB*, *katG* и промотора *inhA*. Проанализированная выборка включала культуры с мутациями в гене *rpoB* в кодонах 531, 526, 516, 533, 511, 513 и 572. Мутации в соответствующих кодонах гена *rpoB* были выявлены с помощью разработанного НР в ДНК 159 из 160 культур, у которых присутствовали нуклеотидные замены согласно результатам секвенирования. В ДНК 64 культур мутации в гене *rpoB* не обнаружены ни одним из методов. Положительное соответствие результатов выявления мутаций в гене *rpoB* составило 99,4% (95% ДИ: 96,6-100,0), отрицательное соответствие результатов – 100% (95% ДИ: 94,4-100,0).

Результаты секвенирования последовательностей генов *katG* и промотора гена *inhA* были получены для 221 образца. При использовании разработанного НР мутации в кодоне 315 гена *katG* были обнаружены у 151 культуры *MTC*, в ДНК 70 культур указанных мутаций не выявлено, что полностью соответствовало результатам секвенирования. В промоторе гена *inhA* мутации обнаружены у 47 из 48 культур, в ДНК которых присутствовали нуклеотидные замены в -8 и -15 позициях. При этом в ДНК культуры, у которой мутация в промоторе гена *inhA* не была обнаружена, одновременно присутствовала мутация в кодоне 315 гена *katG,* которая была выявлена с помощью НР «*MTC*-MDR». Такой результат – выявление одной из нескольких присутствующих в ДНК *MTC* мутаций, связанных с устойчивостью к изониазиду, – учитывается как выявление генетического маркера устойчивости к этому ПТП. В промоторе *inhA* 173 культур мутации не выявлены ни одним из методов. Положительное соответствие результатов выявления мутаций, связанных *с* устойчивостью *MTC* к изониазиду, с помощью разработанного НР по отношению к секвенированию составило 100% (95% ДИ: 97,7-100,0), отрицательное соответствие результатов – 100% (95% ДИ: 94,6-100,0).

Выводы. Разработан НР «*MTC*-MDR» на основе одноэтапной мультиплексной ПЦР-РВ для одновременного выявления спектра генетических маркеров устойчивости *MTC* к рифампицину и изониазиду. Использованный подход позволяет, как максимально расширить спектр выявляемых мутаций в RRDR гена *rpoB MTC* за счет детекции любых вариантов нуклеотидных замен, так и свести к минимуму риск контаминации продуктами ПЦР. При тестировании коллекции ДНК культур *M.tuberculosis* получены высокие показатели соответствия результатов при использовании разработанного НР и метода секвенирования: для выявления мутаций, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину, положительное соответствие результатов составило 99,4%, отрицательное соответствие – 100%, для выявления мутаций (либо в кодоне 315 гена *katG,* либо в промоторе *inhA)*, связанных с устойчивостью к изониазиду, как положительное, так и отрицательное соответствие результатов составили 100%.

ОЦЕНКА ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАЦИЙ, СВЯЗАННЫХ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА К РИФАМПИЦИНУ И ИЗОНИАЗИДУ

Микулович Ю.Л.[1], Савочкина Ю.А.[1], Альварес Фигероа М.В.[1], Луданный Р.И.[1], Кравцова Т.А.[1], Тимошина О.Ю.[1], Лобашова Г.П.[2], Барило В.Н.[2], Попов С.А.[3], Шипулин Г.А.[1]

[1]ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия
[2]ГКУЗ «Туберкулезная клиническая больница № 7» ДЗ г. Москвы (в настоящее время ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом» ДЗМ), Россия
[3]ФГБОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М.Сеченова» МЗРФ, НИИ фтизиопульмонологии, Москва, Россия

Введение. Нами был разработан набор реагентов (НР) «*MTC*-MDR» (рабочее название) на основе одноэтапной мультиплексной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ), предназначенный для выявления широкого спектра мутаций в RRDR области и в кодоне 572 гена *rpoB*, связанных с устойчивостью *Mycobacterium tuberculosis* complex (*MTC*) к рифампицину, а также мутаций в кодоне 315 гена *katG* и в промоторной области гена *inhA*, ассоциированных с устойчивостью *MTC* к изониазиду (см. тезисы Микулович Ю.Л. и соавт. в данном сборнике).

Цель данной работы – оценить характеристики разработанного НР «*MTC*-MDR» при выявлении генетических маркеров множественной лекарственной устойчивости *MTC* в образцах различного вида биологического материала в сравнении с секвенированием и диагностические показатели НР в сравнении с фенотипическим методом определения лекарственной чувствительности *MTC* к указанным противотуберкулезным препаратам (ПТП).

Материалы и методы. В работе использовали 120 содержащих *MTC* образцов различных видов биоматериала (мокрота, промывные воды бронхов, кал, моча, содержимое очагов, грануляции, выпот, гной, плевральная жидкость) от больных туберкулезом как с впервые установленным диагнозом, так и после длительной химиотерапии. Тотальную ДНК из биоматериала выделяли с помощью НР «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Наличие ДНК *MTC* в образцах определяли с использованием НР «АмплиСенс® MTC-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора).

ПЦР-РВ с помощью разработанного НР проводили параллельно с использованием систем для амплификации и детекции роторного (Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия)) и планшетного типа (CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США)) с целью оценки результатов при работе с различными типами систем. Фенотипическую чувствительность *MTC* к рифампицину (критическая концентрация 40 мкг/мл) и изониазиду (критическая концентрация 1 мкг/мл) определяли методом абсолютных концентраций на плотной питательной среде Левенштейна-Йенсена у культур *MTC* (n=87), полученных из исследованных образцов биоматериала. Референс-методом выявления мутаций являлось секвенирование по Сэнгеру последовательностей генов *rpoB*, *katG* и промоторной области гена *inhA*, которое проводили на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500xL (Applied Biosystems, США).

В работе оценивали следующие характеристики НР «*MTC*-MDR»:

- положительное соответствие результатов – доля образцов, в которых выявлены мутации с помощью тестируемого НР, среди образцов с мутациями в целевых участках ДНК *MTC* по результатам секвенирования;

- отрицательное соответствие результатов – доля образцов, в которых с помощью тестируемого НР мутации не выявлены, среди образцов, в которых нет мутаций

в целевых участках ДНК *МТС* по результатам секвенирования;

- диагностическая чувствительность – доля образцов, в которых с помощью тестируемого НР выявлены мутации, ассоциированные с устойчивостью *МТС* к конкретному ПТП, среди образцов, из которых получены фенотипически устойчивые к данному ПТП культуры *МТС*;

- диагностическая специфичность – доля образцов, в которых по результатам, полученным с помощью НР «*МТС*-MDR», отсутствуют мутации, ассоциированные с устойчивостью *МТС* к конкретному ПТП, среди образцов, из которых получены фенотипически чувствительные к данному ПТП культуры *МТС*.

Основные результаты. При тестировании ДНК *МТС* из 120 образцов биоматериала с помощью разработанного НР в гене *rpoB* выявлены мутации в 57 из 58 образцов, в которых присутствовали мутации в кодонах 531, 526, 516, 511 и 512 в RRDR области и в 572 кодоне гена *rpoB*. В 62 образцах мутации в *rpoB* не обнаружены ни с помощью ПЦР-РВ, ни методом секвенирования. Положительное соответствие результатов выявления мутаций в гене *rpoB* с помощью НР «*МТС*-MDR» по отношению к секвенированию составило 98,3% (95%ДИ: 90,8-100,0), отрицательное соответствие результатов – 100% (95%ДИ: 94,2-100,0).

Результаты секвенирования последовательностей гена *katG* и промотора гена *inhA* были получены для 103 образцов. Мутации в кодоне 315 гена *katG* были выявлены с помощью НР «*МТС*-MDR» в 55 из 58 образцов с мутациями в данном кодоне по результатам секвенирования. Мутации в промоторе гена *inhA* обнаружены с помощью данного НР в 9 из 10 образцов. В одном образце, в котором мутация в промоторе *inhA* не была обнаружена, одновременно присутствовала мутация в кодоне 315 гена *katG,* которая была выявлена с помощью НР «*МТС*-MDR». Такой результат – выявление одной из нескольких присутствующих в ДНК МТС мутаций, связанных с устойчивостью к изониазиду – учитывается как выявление генетического маркера устойчивости к этому ПТП. С помощью ПЦР-РВ и секвенирования не обнаружено мутаций в кодоне 315 гена *katG* и в промоторе гена *inhA МТС* 45 образцов. Положительное соответствие результатов выявления мутаций, ассоциированных с устойчивостью *МТС* к изониазиду с помощью НР «*МТС*-MDR» по отношению к секвенированию составило 94,8% (95% ДИ: 85,6-98,9), а отрицательное соответствие результатов – 100,0% (95% ДИ: 92,1-100,0).

Диагностические показатели разработанного набора оценивали сопоставлением результатов ПЦР-РВ с данными фенотипического определения лекарственной чувствительности, полученными для 87 культур *МТС*, выделенных из исследованных образцов биоматериала. Мутации в гене *rpoB* были выявлены с помощью НР «*МТС*-MDR» в каждом из 41 образца с фенотипически устойчивыми к рифампицину *МТС* и в 2 из 46 образцов с фенотипически чувствительными к данному ПТП *МТС*. Диагностическая чувствительность НР «*МТС*-MDR» для выявления маркеров устойчивости *МТС* к рифампицину составила 100,0% (95% ДИ: 91,4-100,0), диагностическая специфичность – 95,7% (95% ДИ: 85,2-99,5).

Мутации в гене *katG* (кодон 315) выявлены с помощью НР «*МТС*-MDR» в каждом из 46 образцов с фенотипически устойчивыми к изониазиду *МТС* и в 2 из 41 образца с фенотипически чувствительными к данному ПТП *МТС*. Мутации в промоторе *inhA МТС* выявлены в 8 образцах в сочетании с мутацией в кодоне 315 гена *katG*. В 39 образцах с фенотипически чувствительными к изониазиду *МТС* мутации в гене *katG* и в промоторе гена *inhA* с помощью НР «*МТС*-MDR» не обнаружены. Диагностическая чувствительность НР «*МТС*-MDR» для выявления маркеров устойчивости *МТС* к изониазиду составила 100,0% (95% ДИ: 92,3-100,0), диагностическая специфичность – 95,1% (95% ДИ: 83,5-99,4).

Заключение. При анализе образцов различного биоматериала с помощью разработанного НР «*МТС*-MDR» для выявления мутаций, ассоциированных с множественной лекарственной устойчивостью микобактерий туберкулеза, были получены высокие диагностические показатели НР: чувствительность выявления генетических маркеров устойчивости к обоим ПТП составила 100%, специфичность – 95,7 и 95,1% для маркеров устойчивости соответственно к рифампицину и изониазиду.

ПРОДУКЦИЯ БИОФИЛЬМОВ ВОЗБУДИТЕЛЕМ ТУБЕРКУЛЕЗА В МОНО- И МИКСТ-КУЛЬТУРАХ

Огарков О.Б.[1,2,3], Бадлеева М.В.[4], Белькова Н.Л.[1,5], Адельшин Р.В.[6], Цыренова Т.А.[7], Синьков В.В.[1,8], Хромова П.А.[1], Костюнин К.Ю.[8], Кощеев М.Е.[7], Жданова С.Н.[1]

[1]ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», Иркутск, Россия

[2]ФГБОУ ВПО «Иркутский государственный университет», Иркутск, Россия

[3]ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования», Иркутск, Россия

[4]ФГБОУ ВО «Бурятский государственный университет», Улан-Удэ, Россия

[5]ФГБУН «Лимнологический институт» СО РАН, Иркутск, Россия

[6]ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт», Иркутск, Россия

[7]ОГБУЗ «Иркутская областная клиническая туберкулезная больница», Иркутск, Россия

[8]ОГАУЗ «Иркутский областной клинический консультативно-диагностический центр», Иркутск, Россия

Ключевые слова: биопленки, M. tuberculosis, Bacillus spp., Brevibacillus spp.

Введение. Процесс образования биопленок *in vivo* на поздних стадиях туберкулеза является важным фактором патогенеза инфекции (Orme I.M., 2014). По всей видимости, субстанция биофильмов *M.tuberculosis* (МБТ)

во многом повторяет состав полимеров клеточной стенки и капсулы. К таким полимерам можно отнести PDIM (phthiocerol/phthiodiolone dimycocerosate), PG (phenolic glycolipids) (Flentie K.N., et al., 2016) и альфа-полиглутаматы (Barton L., 2005). Интересно, что альфа- и гамма- полиглутаматы являются биополимерами, широко встречающимися в капсулах и биопленках других видов бактерий (Barton L., 2005).

Цели и задачи. Исследование механизмов образования биопленок клиническими штаммами *M.tuberculosis.*

Материалы и методы. Штаммы МБТ были получены с твердой питательной среды Левенштейна–Йенсена. Среда Школьниковой готовилась согласно действующим рекомендациям (Приказ № 109), для получения биопленок штаммы МБТ выращивали в 5 мл среды в стеклянных пробирках с добавлением до 10% инактивированной при 56°С сыворотки крови человека, согласно ранее описанной методике (Приказ № 558). Выделение геномной ДНК из биофильмов: Экстракцию ДНК штаммов МБТ проводили из образцов, убитых прогреванием при 100° С в течение 30 мин. Для удаления ингибиторов ПЦР проводили предварительную обработку биофильмов протеиназой К и хлороформом. Фермент добавляли в количестве 2 ед. на образец в равном образцу объеме 0,5-кратного лизирующего буфера от набора ДНК-сорб-В (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия), интенсивно встряхивали и прогревали при 55°С 30 мин. В дальнейшем к образцу добавляли равный объем хлороформа, перемешивали и центрифугировали. Полученный супернатант отбирали в чистый виал и выделяли ДНК набором ДНК-сорб-В (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия), согласно протоколу производителя. ПЦР проводили в варианте с детекцией электрофорезом на термоциклерах фирмы БИС-М (Россия) или с детекцией в реальном времени на амплификаторе LightCycler Nano (Roche). Олигонуклеотидные праймеры и зонды синтезированы НПФ «Синтол», также использовали реагенты для ПЦР компании «Интерлабсервис». Молекулярное клонирование ПЦР продуктов проводили с помощью набора Clon JETTM PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, США). Секвенирование по Сэнгеру выполняли на автоматическом секвенаторе Genetic Analyzer 3500xL. Определение минимальной ингибирующей концентрации (MIC) 2-х основных противотуберкулезных препаратов (ПТП) и 10-ти препаратов резерва проводили на планшетах Sensititre (Thermo Scientific, США).

Основные результаты. При исследовании процесса образования биопленок на среде Школьниковой обнаружено отсутствие образования биофильмов у всех 100 клинических штаммов при наличии планктонного роста. Рост в виде биофильмов наблюдался только у 20 лабораторных штаммов МБТ, прошедших многочисленные пассажи на искусственных питательных средах. В то же время посев 150 образцов мокроты, стандартно обработанной NALC-NaOH, на «голодную» среду Школьниковой (без добавления сыворотки крови) в 63 случаях сопровождался ростом микрофлоры с образованием биофильмов. В 30,2% (19/63) случаев биопленки содержали возбудитель туберкулеза. ПЦР-РВ методом выделено 6 образцов, имеющих наибольшую концентрацию микобактериальной ДНК. Проведено молекулярное клонирование участка гена 16S РНК одной из шести биопленок с последующим секвенированием клонов. Выявленная последовательность имела 99% гомологию с видом *Bacillus thermoamylovorans*. Из имеющихся образцов биофильмов с МБТ микробиологическими методами изолировано три штамма бацилл. Секвенирование гена 16S позволило идентифицировать выделенные штаммы как *Bacillus licheniformis* (один штамм, более 99% гомологии) и *Brevibacillus spp.* (два штамма). Все 3 выделенных штамма были устойчивы к максимальным концентрациям изониазида, стрептомицина, этионамида и этамбутола. Штаммы *Brevibacillus spp.* были дополнительно устойчивы к ПАСК и канамицину. В модельном эксперименте при длительной совместной инкубации МБТ и *B. licheniformis* на «голодной» среде Школьниковой показано, что некоторые клинические штаммы *M. tuberculosis* способны успешно размножаться вместе со штаммом бациллы. Несмотря на то, что концентрация ДНК МБТ в биофильме, образованном бациллой *B. Licheniformis,* была значимо ниже, чем в жидкой среде, наблюдалось нарастание концентрации МБТ в биофильме и в жидкой фазе при выходе штамма *B. licheniformis* в log-фазу роста.

Заключение. Обнаружение бацилл, считающихся сапрофитическими, продуцирующих биофильмы, при посеве мокроты от больных туберкулезом легких может изменить наше представление о безопасности бацилл, используемых в биотехнологии (*B. licheniformis* является биотехнологическим штаммом, источником протеаз и липаз). В тоже время авторами постулируется гипотеза, предполагающая возможность кратковременной персистенции некоторых «сапрофитических» видов бацилл в казеозном содержимом очагов некроза на поздних стадиях туберкулеза легких при возникновении аэробных условий в очаге казеоза. Нельзя исключать, что МБТ, имеющие в составе клеточной стенки до 8% альфа-полиглутаматов, могут иметь определенное сродство и возможность размножаться в биофильмах бацилл, состоящих из гамма-полиглутамата. С учетом того что, выделенные бациллы имеют устойчивость к половине ПТП (по-видимому конститутивную), обнаружение такого факта может значительно изменить наше представление о патогенезе поздних стадий туберкулеза легких в случае присоединения истинной бациллярной микрофлоры к образованию биофильмов *in vivo*, т.е. в кавернах или других крупных очагах туберкулезного поражения легких.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 16-04-00160 А

Литература

1. Orme I.M. A new unifying theory of the pathogenesis of tuberculosis. Tuberculosis (Edinb). 2014 Jan;94(1): 8-14. Flentie, K. N., C. L. Stallings, J. Turk, A. J. Minnaard, and F-F. Hsu. Characterization of phthiocerol and phthiodiolone dimycocerosate esters of M. tuberculosis by multiple-stage linear ion-trap MS. J. Lipid Res. 2016. 57: 142–155.

2. Barton L. Structural and Functional Relationships in Prokaryotes, Springer, New York. 2005. pp. 202–210.

3. Приказ № 109 от 21 марта 2003 г. МИНИСТЕР-

СТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ "О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации"

4. Приказ Минздрава СССР от 8 июня 1978 г. N 558 "Об унификации микробиологических методов исследования при туберкулезе"

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ МИКОБАКТЕРИЙ И БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ: ОТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЭПИДЕМИОЛОГИИ К ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЕ

Огарков О.Б.[1,2,3], Жданова С.Н.[1], Синьков В.В. [1,4], Хромова П.А.[1], Кощеев М.Е.[5], Зоркальцева Е.Ю.[3]

[1]ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», Иркутск, Россия
[2]ФГБОУ ВПО «Иркутский государственный университет», Иркутск, Россия
[3]ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования»
[4]ОГАУЗ «Иркутский областной клинический консультативно-диагностический центр», Иркутск, Россия
[5]ОГБУЗ «Иркутская областная клиническая туберкулезная больница», Иркутск, Россия

Введение. Проведенное ранее исследование (Ogarkov, et al., 2012) выявило «летальную комбинацию» в виде 3-х кратного увеличения частоты встречаемости аллели -336G гена *CD209* в комбинации генотипом Beijing МБТ в аутоптатах умерших от туберкулеза (ТБ), независимо от ВИЧ-статуса.

Цели и задачи. Разработка и клиническая апробация методов индикации клонов СС1 и СС2-W148 генотипа Beijing *M.tuberculosis* и аллели -336G гена *CD209* в мокроте и другом клиническом материале для раннего прогнозирования рисков неблагоприятных исходов ТБ, в том числе при коинфекции с ВИЧ.

Материалы и методы. Для индикации клона СС1 выполнен дизайн праймеров и флуорецентных зондов на высокоспецифическую миссен-мутацию T>G в гене *pks8* в позиции 1884305 (Merker, et al. 2015), аналогичная работа проделана для идентификации генотипа СС2-W148 на основе динуклеотидной делеции в гене *kdpD* (Merker, et al. 2015). Специфичность выбранных мутаций проверяли *in silico* в БД GMTV и TB-ARC project. Определение аллели -336G гена *CD209* проводили, как описано ранее (Ogarkov et al., 2012). ПЦР проводилось на генетическом анализаторе GeneXpert (референтный метод) и ПЦР-РВ тестами собственного дизайна на амплификаторе LightCycler Nano (Roche). Клинический материал (мокрота, ликвор, биоптаты) аликвотировались после стабилизации «Инактивирующим реагентом А» (Синтол). Профили устойчивости к антибиотикам и исходы лечения получали при анализе историй болезней пациентов, проходивших лечение в Иркутской областной клинической туберкулезной больнице, на условиях анонимности. Дизайн исследования одобрен Этическим комитетом ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ.

Основные результаты. Исследовано 360 клинических образцов (мокрота, ликвор, операционный материал) от 186 больных ТБ. Специфичность ПЦР-РВ теста для клона СС1 составила 100%, при чувствительности 91%, а для клона СС2-W148 специфичность составила 100%, при чувствительности 105% относительно референтного метода. Среди 40 случаев выявления клона СС2-W148 в 25% (10/40) клинических образцов наблюдалось присутствие другого генотипа (non-СС2). Аналогично, 38% (8/21) проб, содержащих ДНК клона СС1, представляли из себя микст-генотипы. В дальнейшем анализе микст-генотипы оценивались как моногенотип по доминированию флуоресценции в ПЦР-РВ. За период наблюдения (первая половина 2016 г.) по результатам ПЦР-РВ генотипирования мокроты у двух больных произошла смена генотипов: non-СС1 -> СС1 и non-СС2-W148 -> СС2-W148. В последнем случае наблюдался рецидив туберкулеза у клинически излеченного больного. При смене генотипа МБТ выявлено развитие ШЛУ (СС2-W148) и МЛУ (СС1).

Комплексный анализ проведен для 150 пациентов, после исключения повторных исследований и случаев с отрицательный результат одним из методов ПЦР тестирования. Пациенты значимо не отличались по полу и возрасту, в исследуемой группе было 92 мужчины и 58 женщин, средний возраст больных 40,3±11,3 лет.

Мутации в гене *rpoB*, выявленные анализатором GeneXpert, распределились пополам, в 75 случаях была определена устойчивость рифампицину Rif(+), остальные 75 образцов содержали чувствительные штаммы МБТ Rif(-). Выявлено значимое преобладание ($\chi 2^*=21$; $p<0,01$) клона СС2-W148 среди Rif(+) образцов - 44% (33/75) над 9% (7/75) среди Rif(-). Распределение клона СС1 среди тех же групп сравнения не выявило значимых различий (11 и 10 клонов в Rif(+) и Rif(-) группах соответственно). Ретроспективный анализ результатов устойчивости к ПТП, полученных стандартным методом на среде Левинштейна-Йенсена, выявил только 13 штаммов с полной чувствительностью ко всем противотуберкулезным препаратам, среди них не обнаружено штаммов СС2-W148 и СС1 генотипа Beijing. Выявлено значимое преобладание МЛУ ($\chi 2^*=22,2$; $p<0,01$) среди штаммов СС2-W148 57,5% (23/40) по сравнению с 18,2% (20/110) у остальных штаммов. Среди 22 предШЛУ и ШЛУ штаммов было найдено 9 изолятов клона СС2-W148. В целом, в группе предШЛУ и ШЛУ наблюдалось значимое преобладание 59% (13/22) клонов СС1 и СС2-W148 по отношению ко всем остальным штаммам ($\chi 2^*=36,0$; $p<0,01$). Исследовано распределение аллелей -336A/G гена *CD209* для 107 больных ТБ. Оценена встречаемость «летального» сочетания генотипов совместно для клонов СС1 и СС2-W148 и аллели -336G гена *CD209*. Обнаружено значимое преобладание ($\chi 2^*=7,2$; $p<0,01$) встречаемости мутаций Rif(+) 81,3% (13/16) у больных с аллелью -336G, пораженных МБТ клонов СС1 и СС2-W148, по сравнению с пациентами с аллелью -336A, пораженных иными штаммами 38,3% (18/47).

Заключение. Анализ исходов ТБ в рамках ретроспективного исследования в течение полугода не выявил абсолютных доказательств повышенной «вредоносности» клонов СС1 и СС2-W148 по сравнению с иными

штаммами МБТ по клиническим данным. Однако у больных, пораженных клонами CC1 и CC2-W148, наблюдается значимо большее количество МЛУ и ШЛУ, выявлено значительное количество микст-генотипов, с количественным преобладанием (по результатам ПЦР-РВ) эпидемических клонов. Взаимозависимость носительства аллели -336G гена *CD209* пациентом и Rif(+) мутаций в геноме МБТ, вероятно является результатом селекции лекарственно-устойчивых МБТ, приводящей в конечном итоге к уменьшению эффективности лечения таких пациентов. Клиническая применимость разработанных методов в значительной мере ограничена спецификой течения ТБ в настоящее время. Большинство проанализированных случаев ШЛУ и предШЛУ-ТБ - 71,4% (10/14) развились у больных с ВИЧ, достигших 4 стадии без ВААРТ. Другими словами, повышенная трансмиссивность и (вероятно) вирулентность МБТ эпидемических клонов во многом маскируется широким распространением запущенных случаев и отсутствием у больных приверженности к лечению ВИЧ и ТБ. Исходя из полученных результатов, разработанные подходы по идентификации эпидемических клонов CC1 и CC2-W148 генотипа Beijing требуют дальнейших клинических исследований, в том числе как инструмент выявления нозокомиального суперинфицирования эпидемическими МЛУ и ШЛУ штаммами.

* - $\chi 2$ с коррекцией по Йетсу.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 16-04-00160 А

Литература

1. Ogarkov O., Mokrousov I., Sinkov V., Zhdanova S., Antipina S., Savilov E. 'Lethal' combination of Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype and human CD209 -336G allele in Russian male population. Infect Genet Evol. 2012 Jun;12(4):732-736.

2. Merker M., Blin C., Mona S., Duforet-Frebourg N., Lecher S., Willery E., et al., Evolutionary history and global spread of the Mycobacterium tuberculosis Beijing lineage. Nat. Genet. 2015; 47(3):242-249

ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ТУБЕРКУЛЕЗНОГО ПЛЕВРИТА С ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ

Салимова Н.А.

НИИ легочных заболеваний МЗ Азербайджанской Республики, Баку, Азербайджан

Введение. Туберкулёзный плеврит составляет до 8,0% случаев в структуре туберкулёза органов дыхания. Высокий риск заболевания туберкулёзом у больных ВИЧ-инфекцией требует достоверной верификации этиологии плевральных выпотов у таких пациентов. Выявление туберкулеза в биологических жидкостях до сих пор распространенной клинической проблемой.

Цель: оценка возможности использования молекулярно-генетических методов в ускоренной диагностике туберкулёзного плеврита у больных с сочетанием туберкулёза и ВИЧ – инфекции.

Материалы и методы. Обследованы больные впервые выявленным активным туберкулёзом, сопровождающимся плевральным выпотом. Экссудат плевры изучались молекулярно-генетическими методами. Изоляцию ДНК и амплификацию последовательности нуклеотидов IS6110, являющихся маркерами ДНК микобактерий туберкулёза, производили тест –системами «Амплисенс» (Россия) методом ПЦР в режиме реального времени на анализаторе CFX 96 Touch, Bio-Rad (США).

Результаты исследования. Было обследовано 31 больных экссудативными плевритами не уточнённой этиологии, у которых при первичном обследовании природа плеврита не установлена. У 15 больных плеврит был единственным проявлением активного туберкулёза (изолированный плеврит), в 9 случаях был осложнением туберкулёза органов дыхания, в 7 случаях - проявлением генерализованного туберкулёзного процесса.

Результаты проведённого ПЦР обследования экссудата представлены в табл.1

Таблица 1. Результаты ПЦР исследований у больных с различной распространенностью туберкулезного процесса

Группы больных / Результаты ПЦР	Изолированный плеврит n=15 (%)	ТОД+плеврит* n=9 (%)	Генерализованный туберкулез n=7 (%)	Общий итог n=31 (%)
Обнаружена ДНК МБТ	13 (86,7 %)	5 (55,6 %)	6 (85,7 %)	24 (77,4 %)
Отрицательный	2 (13,3 %)	4 (44,4 %)	1 (14,3%)	7 (22,6 %)

*ТОД+плеврит – туберкулёз органов дыхания, осложнённый плевритом.

Чувствительность ПЦР экссудата у больных изолированным плевритом составила 86,7 %. При исследовании экссудата у больных ВИЧ – инфекцией, чувствительность ПЦР метода была значительно и достоверно выше, чем у ВИЧ – негативных пациентов. Представляет интерес, что при изолированном плеврите ДНК микобактерий туберкулёза в патологическом респираторном материале (экссудат) обнаруживается столь же часто (около 90%), как и в случаях генерализованного туберкулёза с вовлечением плевры.

Выводы. Метод ПЦР делает возможным достоверно выполнять раннюю этиологическую диагностику туберкулёзного плеврита и обладает высокой чувствительностью у больных ВИЧ – инфекцией с плевральным выпотом.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ *M.TUBERCULOSIS*, КОДИРУЮЩИХ ЛЕКАРСТВЕННУЮ УСТОЙЧИВОСТЬ К ИЗОНИАЗИДУ И РИФАМПИЦИНУ У БОЛЬНЫХ С ДЕСТРУКТИВНЫМИ ФОРМАМИ ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ

Салина Т.Ю., Морозова Т.И.

ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» МЗ России, Саратов, Россия

Деструктивные формы туберкулеза характеризуются преимущественно тяжелым течением и недостаточной эффективностью лечения. Большое значение в развитии форм туберкулеза с наличием распада в легочной ткани имеет лекарственная устойчивость *M. tuberculosis*.

Цель - изучение спектра генетических мутаций *M. tuberculosis* (МБТ), кодирующих лекарственную устойчивость (ЛУ) к изониазиду (H) и рифампицину (R) у больных деструктивными формами туберкулеза.

Методы. Проанализировано 196 клинических изолятов ДНК МБТ, выделенных от впервые выявленных больных с деструктивными формами туберкулеза легких. Из них: мужчин было 132 (67,4%), женщин – 64 (32,7%) человека, в возрасте от 23 до 68 лет. Среди клинических форм туберкулеза преобладал инфильтративный туберкулез легких – 141 (71,9%) человек, реже встречался диссеминированный туберкулез легких - 25 (12,8%) и туберкулемы – 11 (5,6%). Другие клинические формы регистрировались в единичных случаях - 19 (9,7%). Выявление ДНК *M. tuberculosis* в мокроте и определение спектра генетических мутаций МБТ, кодирующих ЛУ к H и R проводили методом биологических микрочипов с использованием аппаратно-программного комплекса «Чипдетектор-01» и набора реагентов (ООО «БИОЧИП-ИМБ», Москва).

Результаты. В ходе проведенных исследований методом биологических микрочипов изолированная устойчивость к H установлена у 37 (18,9%) человек, к рифампицину – у 30 (15,3%), множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) выявлена у 67 (34,2%) пациентов. Мутации в генах kat G, inh A, ahpC, кодирующие ЛУ к H, включая МЛУ в целом выявлены у 104 (53,1%) больных и были представлены следующим образом: в гене katG - 85 (81,7%), inhA - (41,4%), ahpC – 8 (7.7%). Самым частым видом мутации, была мутация в гене katG ser315-Thr1, которая была зарегистрирована у 64 (61,5%) H - резистентных штаммов. Среди данной категории пациентов наблюдается большое число сочетанных мутаций в 2 генах (katG+inhA) и нескольких мутаций в одном гене одновременно – у 10 (9,6%) человек. Мутации в гене rpoB в целом, включая МЛУ выявлены у 97 (49,5%) больных. Сочетание от 2 до 4 мутаций одновременно выявлено у 12 (12,4%) человек с устойчивостью к R. Доминирующим видом мутации гена rpoB была ser531-Leu – 39 (40,2%) человек.

Выводы. У больных с деструктивными формами впервые выявленного туберкулеза легких наблюдается высокий уровень МЛУ, регистрируемый методом биологических микрочипов – 34,2%. Среди клинических изолятов M.tuberculosis, выделенных от данной категории пациентов преимущественно встречаются мутации в гене katG (ser315-Thr1) - у 61,5% и в гене rpoB ser531-Leu – в 40,2% случаев. По данным литературы мутации ser315-Thr1 и ser531-Leu, сопряжены с высокой степенью лекарственной устойчивости, выявляемой методом абсолютных концентраций при посеве на твердые питательные среды.

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS,* ИСПОЛЬЗУЯ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЙ МЕТОД TB-SPRINT

Жолдыбаева Е.В.[1], Тарлыков П.В.[1], Аленова А.Х.[2], Сола К.[3]

[1]РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК, г. Астана, Казахстан
[2]РГП «Национальный центр экспертизы лекарственных средств, изделий медицинского назначения и медицинской техники» МЗ РК, Алматы, Казахстан
[3] University of Paris-Sud, Paris, France

Введение. В 2015 году по оценкам ВОЗ (Всемирная Организация Здоровья) было выявлено 10,4 млн. новых случаев заболевания туберкулезом [1]. В настоящее время актуальным остается вопрос по улучшению эпидемической ситуации по туберкулезу как в мире, так и в Казахстане. Особенно основным направлением является борьба с туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью, так как ежегодно наблюдается увеличение новых случаев MDR.

Для сокращения времени диагностики, а также для расширения доступности диагностики ВОЗ разработало три вида диагностики ТБ на основе молекулярных методов: Genotype ®MTBDR plus и MTBDRs/line анализы проб и Xpert MTB/RIF анализ. Тем не менее, каждый из этих методов имеет определенные недостатки, которые ограничивают их использование в качестве комплексных диагностических инструментов.

Метод TB-SPRINT (tuberculosis-spoligo-rifampin-isoniazid typing – современный высокоэффективный метод, основанный на xMAP технологии. TB-SPRINT включает в себя два метода: сполиготипирование и экспресс-метод определения устойчивости к антибиотикам Рифампицину и Иниазиду на основе мутаций в генах rpoB и kat, inhA, соответственно.

Цель и задачи. Проведение генотипирования изолятов *Mycobacterium tuberculosis,* циркулирующих на территории Республики Казахстан, используя технологию xMAP, для одновременного выявления *Mycobacterium tuberculosis,* мутаций, ответственных за устойчивость к лекарственным препаратам, а также обеспечить информа-

цию о генотипе штамма возбудителя, вызывающих заболевание для эпидемиологического понимания.

Материалы и методы. Клинические образцы *Mycobacterium tuberculosis* от пациентов собирали на базе референсной лаборатории Национального центра проблем туберкулеза. Всего было собрано 630 образцов, изолированных от пациентов с диагнозом туберкулез (435 мужчин, 195 женщин). 35,6% из 630 (n=224) являлись «новыми случаями» и 64,4 % (n=401) – «ранее леченные случаи». Из 630 пациентов, 69 % (435 мужчин) и 23 % (145 женщин) были с легочной формой туберкулеза, 50 (8%) с неизвестной формой туберкулеза. Возраст пациентов с диагнозом туберкулез варьировал от 16 до 80 лет, средний возраст составил 37 лет.

ДНК выделяли методом CTAB (Cetyl-Trimethyl-Ammonium-Bromide) [2].

Проводили мультиплексную ПЦР с биотинилированной/не биотинилированной смесью праймеров, (59 Plex анализ), которая позволяет получить 43-спейсорный сполиготип ДНК клинических образцов и известные мутации *rpoB* гена (516, 526, 53), ненапрямую любую мутацию, которая находится в 81-парном промежутке Hot-Spot устойчивости к рифампицину, напрямую мутации *katG* 315, *inh*-7 and *inh*-15.

ПЦР-продукт смешивали с микросферами, на поверхности которых конъюгированы специфические олигонуклеотидные последовательности (зонды). Далее проводилась гибридизация с олигонуклеотидными спаренными микросферами. Эксперименты проводились на оборудовании Luminex 200.

Анализ результатов проводили, используя компьютерную программу Ponent Software (версия 4.0.8460 SP1).

Основные результаты. Суммарный анализ результатов генотипирования клинических изолятов показал, что большая часть исследуемых клинических изолятов (86.4 %) принадлежит генетическому семейству W-Beijing, 5,9 –LAM; 3,3% - URAL; 2,6% - T5-RUS; 0,2% - S, также имеются клинические изоляты (1,6 %) сполиготип которых не относился ни к одному семейству.

Из 630 собранных изолятов микобактерий: 437 были MDR-TB; 129 - чувствительные к антибиотикам; 57 – монорезистентные к изониазиду (monoR-INH); 7 - монорезистентные к рифампицину (monoR-RIF). Из общего числа исследуемых изолятов микобактерий 119 (18,5%) являлись XDR (ШЛУ).

Заключение. Результаты исследований показывают быстрое распространение на территории Казахстана особо опасного генотипа *M. tuberculosis*, известного под названием Beijing, в переводе «Пекинский», которое характерно для MDR изолятов.

Список используемой литературы

1. Global Tuberculosis Report 2016. – Geneva, 2016. – 2014 p.

2. van Soolingen D., de Haas PE., Hermans P.W., van Embden J.D. DNA fingerprinting of Mycobacterium tuberculosis // Methods Enzymol. – 1994. – Vol.235. – P. 196-205.

СЕКВЕНИРОВАНИЕ ГЕНА *PNCA* – НАДЕЖНЫЙ СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ *M.TUBERCULOSIS* К ПИРАЗИНАМИДУ

Андреевская С.Н.[1], Смирнова Т.Г.[1], Андриевская И.Ю.[1], Устинова В.В.[1], Альварес Фигероа М.В.[2], Маслов Д.А.[3], Черноусова Л.Н.[1]

[1] ФГБНУ «Центральный НИИ туберкулеза», Москва, Россия

[2] ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

[3] ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» РАН, Москва, Россия

Введение. Пиразинамид - противотуберкулезный препарат (ПТП) первого ряда, активный в отношении персистирующих *M.tuberculosis* (МБТ) в кислой среде очагов туберкулезного воспаления, что делает его уникальным в ряду других ПТП. Пиразинамид является пролекарственной формой и под действием микобактериального фермента пиразинамидазы/никотинамидазы, кодируемого геном *pncA*, превращается в активный метаболит - пиразиноевую кислоту. Основным механизмом устойчивости к пиразинамиду у МТБ считаются мутации в *pncA*, приводящие к потере активности фермента, вследствие чего не образуется активная форма препарата.

Цель: определение значения выявления мутаций в *pncA* штаммов МБТ как диагностического маркера устойчивости к пиразинамиду. В задачи исследования входило сравнение результатов определения устойчивости МБТ к пиразинамиду культуральным методом и пиразинамидазной активности с наличием/отсутствием мутаций в *pncA*.

Материалы и методы. В качестве диагностического материала была использована 161 культура МБТ, полученная от больных туберкулезом легких из клиники ЦНИИТ. Определение фенотипической лекарственной чувствительности (ЛЧ) МБТ проводили в системе BACTEC MGIT 960 (BD, USA) по стандартному протоколу *изготовителя*. Пиразинамидазную активность штаммов МБТ определяли по разработанной в отделе микробиологии ЦНИИТ модификации классического метода Wayne L. (Wayne L.G.L., 1973), позволяющей определять активность фермента непосредственно в пробирках MGIT. ДНК МБТ выделяли с набором «М-Сорб-Туб-Автомат» (Синтол, Россия). Амплификацию *pncA* проводили с праймерами, сконструированными с использованием online-инструмента Primer-BLAST. Продукты ПЦР очищали набором "GeneJET PCR Purification kit" (Thermo Scientific, Waltham, США) и секвенировали по Sanger.

Результаты. На основании культурального определения ЛЧ было выявлено 50 штаммов, чувствительных к ПТП и 111 штаммов, устойчивых к различным сочетаниям ПТП, из которых 29 были чувствительны к пиразинамиду, а 82 - устойчивы. Таким образом, всего в исследование

было включено 79 штаммов МБТ, чувствительных к пиразинамиду, из которых 50 (63%) были чувствительны ко всем ПТП, 6 (8%) - были монорезистентными, 10 (13%) - полирезистентными и 13 (16%) - были устойчивы одновременно к изониазиду и рифампицину, т.е. обладали множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ). Среди 82 штаммов, устойчивых к пиразинамиду, 81 (98,8%) штаммов характеризовались МЛУ, 1 (1,2%) штамм был полирезистентными.

При определении пиразинамидазной активности было показано, что все штаммы МБТ, фенотипически устойчивые к пиразинамиду, имели неактивную пиразинамидазу. Большинство штаммов (76/79, 96,2%), фенотипически чувствительных к пиразинамиду, обладали активной пиразинамидазой.

В результате секвенирования *pncA* мутации в том или ином участке гена были выявлены у всех штаммов, устойчивых к пиразинамиду (100%), а среди чувствительных штаммов - только в одном случае из 79-ти (1,3%). В целом, спектр мутаций в *pncA* был представлен 56 вариантами, которые были расположены на протяженности гена со 2 по 561 кодон. Каждый вариант встречался, как правило, однократно. Чаще всего встречались замены A(11)->G и A(266)->C, каждая у 4 штаммов, и A(188)->C - у 6 штаммов. Как правило, мутации были представлены однонуклеодитными заменами - 46 вариантов у 69 штаммов, также было выявлено 56 вариантов вставок у 10 штаммов и 4 варианта делеций у 4 штаммов.

При сопоставлении результатов, полученных тремя методами, было показано, что все штаммы, фенотипически устойчивые к пиразинамиду, имели неактивную пиразинамидазу и мутации в *pncA*. 76 из 79 чувствительных к пиразинамиду штаммов имели активную пиразинамидазу и ген *pncA* дикого типа. У трех фенотипически чувствительных штаммов с неактивной пиразинамидазой в одном случае была выявлена мутация в *pncA* и в двух случаях ген *pncA* был дикого типа.

Для этих трех штаммов была определена МИК пиразинамида. Было показано, что для обоих штаммов, не имевших мутации в *pncA*, МИК пиразинамида составила 25 мкг/мл и 60 мкг/мл, т.е. была существенно ниже критической концентрации и, скорее всего, отрицательная пиразинамидазная активность была связана с пределом чувствительности цветной реакции при определении активности фермента. В одном случае, при наличии мутации в *pncA*, МИК пиразинамида составила 90 мкг/мл, что было близко к критической концентрации (100 мкг/мл), и, вероятно, данный штамм проявлял себя как клинически устойчивый. Следовательно, на основании определения МИК пиразинамида для штаммов МБТ, показавших несовпадение анализируемых характеристик, было уточнено значение определения мутаций в *pncA*, и было показано, что наличие мутаций в 100% случаев являлось маркером устойчивости штаммов к пиразинамиду, а отсутствие - маркером чувствительности.

Заключение. Таким образом, в результате проведенного исследования было показано, что наличие мутаций в *pncA* и, как следствие, блокировка активности пиразинамидазы, является маркером устойчивости к пиразинамиду. Полученные данные позволяют заключить, что секвенирование *pncA* является надежным диагностическим инструментом для определения устойчивости к пиразинамиду, позволяющим в 100% случаев установить наличие чувствительности/устойчивости к этому препарату.

ГЕНОМНАЯ И ПРОТЕОМНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* КЛАСТЕРА BEIJING B0/W148

Шитиков Е.А.[1], Беспятых Ю.А.[1], Алтухов И.А.[1], Бутенко И.О.[1], Мельникова Н.[2], Журавлев В.Ю.[2], Ильина Е.Н.[1], Говорун В.М.[1]

[1] Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА, Москва, Россия
[2] СПБ НИИ фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия

Введение. На сегодняшний день среди микобактерий туберкулеза (МБТ) генетическое семейство Beijing является наиболее распространенным и характеризуется повышенной трансмиссивностью и лекарственной устойчивостью. Четверть всех штаммов семейства Beijing, циркулирующих на территории России, относится к кластеру Beijing B0/W148, определяемому с использованием IS6110-RFLP типирования.

Цель исследования. Описание особенностей эндемичных штаммов *Mycobacterium tuberculosis* кластера Beijing B0/W148 на геномном и протеомном уровнях.

Материалы и методы. В исследование были включены 7 штаммов МБТ кластера Beijing B0/W148 и 1 референтный штамм H37Rv. Полногеномное секвенирование проводили с использованием секвенатора Roche GS FLX +. Сборку геномов и определение однонуклеотидных полиморфизмов осуществляли с использованием GS *de novo* assembler v 2.5 и GS Reference Mapper, соответственно. Безметочное протеомное профилирование проводили с использованием ABSciex TripleTOF 5600. Идентификацию и квантификацию осуществляли программными пакетами AB SCIEX ProteinPilot v 4.5, Mascot v 2.2.07 и Progenesis v 4.1.

Основные результаты. В ходе филогенетического анализа было установлено сходство между изучаемыми штаммами Beijing B0/W148 и опубликованным полным геномом W-148 (CP012090.1). Полногеномное выравнивание W-148 и H37Rv показало наличие двух крупных хромосомных перестроек в геноме W-148. Первый инвертированный участок затрагивал 559 т.п.о. и располагался межу генами Rv0609a и Rv1135c (приведено в соответствии с геномом H37Rv). Второй инвертированный участок распространялся на 339 т.п.о. и затрагивал участок геномной ДНК между генами Rv3019c и Rv3327. Дополнительно было описано 59 кластер-специфических SNPs, которые могут отчасти объяснить "успешность" представителей кластера, а также быть использованы для мониторинга.

Согласно данным протеомного анализа было идентифицировано 1868 белков Beijing B0/W148 и 1560 для H37Rv. Сравнительный количественный анализ показал статистически значимое различие между штаммами кластера и H37Rv в представленности 192 белков. Функциональный анализ показал различия в представленности белков липидного обмена и белках, участвующих в ответе на гипоксию. Найденные особенности позволяют сделать предложение о лучшей адаптации штаммов кластера к выживанию в макрофагах.

Работа поддержана Российским Научным Фондом грант № 14-15-00689.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТИПИРОВАНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУБЕРКУЛЕЗА У ПАЦИЕНТОВ С ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ

Умпелева Т.В., Еремеева Н.И., Вахрушева Д.В., Белоусова К.В., Красноборова С.Ю.

ФГБУ «УНИИФ» Минздрава России, Екатеринбург, Россия

Введение. В последние годы в Российской Федерации отмечена тенденция роста доли больных туберкулезом в сочетании с ВИЧ инфекцией. В Свердловской области в 2015 году доля больных ВИЧ-инфекцией среди вновь выявленных случаев туберкулеза составила 32,0%. Прекращение распространения туберкулеза и ко-инфекции ВИЧ/ТБ на основе современных научно-обоснованных подходов к профилактике, выявлению, диагностике и лечению туберкулеза является основной целью стратегии борьбы с туберкулезом в Российской Федерации до 2020 года. Для достижения этой цели необходимо более полное понимание характера взаимодействия возбудителей между собой и с организмом хозяина при ко-инфекции.

Цель. Дать молекулярно-генетическую характеристику *M. tuberculosis*, выделенных от больных сочетанной инфекцией ВИЧ/туберкулез и выявить основные эпидемиологически и клинически значимые варианты возбудителя туберкулеза у этой группы больных.

Материалы и методы. Проведен анализ клинических и лабораторных данных 80 пациентов (24 (30,0%) женщин 56(70%) мужчин, средний возраст 33,4 ±7,6 лет), поступивших на лечение в клинику ФГБУ «УНИИФ» в период с 2009 по 2015 г.г. Критерии выбора пациентов:

1. Наличие установленной ВИЧ-инфекции в анамнезе.

2. Наличие культуры *M. tuberculosis*, выделенной из диагностического материла пациентов, методом посева на плотную питательную среду Левенштейна-Йенсена.

55 (68,7%) больных были жителями г. Екатеринбурга, 12 (15,0%) – жителями Свердловской области и 13 (16,3%) – других территорий УрФО.

У 39 (48,7%) больных в анамнезе отмечено инъекционное употребление наркотиков, у 31 (38,7%) отмечены эпизоды пребывания в местах лишения свободы. Сочетание вирусных гепатитов В и С диагностировано у 11 (13,7%) больных, только гепатит С - у 44 (55,5%) больных. От 48 (60,0%) пациентов были получены культуры из респираторного материала (мокрота, промывные воды бронхов) и операционного материала (легкие), у 32 (40,0%) пациентов культуры получены из нелегочного материала (лимфоузлы, костная ткань и др.) По данным историй болезни у 31 (38,7%) больного диагнозы ВИЧ инфекции и туберкулеза были установлены одновременно или в течение одного года, еще у 31 (38,7%) вначале был установлен диагноз ВИЧ-инфекции, и через 2-14 (5,6±4,2) лет был установлен диагноз туберкулез, у 11 (13,8%) больных диагноз туберкулез был первичен, у семи больных (8,8%) дата установления диагноза ВИЧ-инфекции была не известна.

Все культуры, выделенные из диагностического материала, первоначально были классифицированы на группы Beijing и non-Beijing с использованием тест-системы «Амплитуб-Beijing» (НПК «Синтол», Россия). Далее изоляты группы non-Beijing были генотипированы с использованием набора «Сполигочип» (ООО «Биочип-ИМБ», Россия). Для изолятов группы Beijing было проведено MIRU-VNTR типирование (локусы: MIRU26, QUB26, MIRU31, QUB11b, Mtub21, MIRU 40).

Основные результаты. По результатам генотипирования культур *M. tuberculosis*, выделенных от больных сочетанной инфекцией ВИЧ/туберкулез, установлено, что 58 (72,5%) культур принадлежат к группе Beijing, из них 33 (41,2%) были классифицированы как кластер В (наличие 6-7 повторов в локусах MIRU26 и QUB 26), 11 (13,7%) как кластер А (5 повторов в MIRU26 и 8 повторов в QUB 26) и 14 (17,5%) – как другие варианты группы Beijing. В 13 (16,2%) случаях выделены изоляты группы non-Beijing (5 – H4 (URAL), 2 - T1 и по одному: H3, LAM4, LAM9, T5_RUS, U, T1_RUS2). В девяти случаях (11,2%) была выявлена смесь генотипов (Beijing + non-Beijing).

Результаты определения лекарственной чувствительности выделенных культур методом абсолютных концентраций показали наличие множественной лекарственной устойчивости у 46 (79,3%) изолятов, принадлежавших к группе Beijing.

Среди культур, выделенных от больных, ранее не леченных от туберкулеза (46,2%), доля изолятов группы Beijing была ниже, чем в группе ранее леченных больных (50% и 83,3% соответственно, $p \leq 0,01$). Статистически значимого доминирования отдельных генетических кластеров Beijing в этих группах больных не выявлено.

У 30 (37,5%) больных были выявлены как легочная, так и внелегочная локализация туберкулезной инфекции, из них у 28 человек (93,3%) выделенная культура принадлежала генотипу Beijing. Среди 42 (52,5%) изолятов, выделенных от больных с туберкулезом только легочной локализации, генотип Beijing был выявлен в 57,1% случаев (24 человека), у 7 (16,6%) пациентов в респираторном материале была выделена смесь генотипов ($p \leq 0,01$).

Зависимостей между пребыванием в местах лишения свободы, употреблением наркотиков и генотипом возбудителя туберкулеза в данной работе не установлено.

Заключение. Результаты настоящей работы демонстрируют, что у включенных в исследование больных ту-

беркулезом в сочетании с ВИЧ-инфекцией доминируют возбудители туберкулеза кластера Beijing. Степень такого доминирования статистически значимо выше среди ранее леченных больных по сравнению с вновь выявленными и в группе пациентов с множественной локализацией туберкулеза. У пациентов только с легочной локализацией процесса отмечена более высокая доля выявления смеси микобактерий разных генетических групп.

ДЕТЕКЦИЯ *MYCOBACTERIUM LEPRAE* В СОСКОБАХ СО СЛИЗИСТОЙ ПОВЕРХНОСТИ НОСА У БОЛЬНЫХ ЛЕПРОЙ И КОНТАКТНЫХ ЛИЦ

Арнаудова К.Ш., Сароянц Л.В.

ФГБУ «НИИ по изучению лепры» Минздрава России, Астрахань, Россия

Введение. Несмотря на значительное снижение распространенности лепры после внедрения комбинированной химиотерапии, частота выявления новых случаев заболевания лепрой в мире остается высокой. Учитывая, что основной путь передачи инфекции воздушно-капельный [1], изучение наличия микобактерий лепры в носовой полости у здоровых лиц из неэндемических и эндемических областей представляет большой интерес для понимания вопросов эпидемиологии лепры [3]. Было показано, что у многих контактных с больными лепрой лиц, особенно проживающих в эндемических регионах, в назальном секрете обнаруживаются *M.leprae* без явных симптомов болезни [2], т.е. они могут явиться потенциальным источником распространения болезни. Для обследования контактных лиц актуальным остаётся неинвазивный способ идентификации *M.leprae* с высокой чувствительностью и специфичностью. С развитием молекулярно-генетических методов появились широкие возможности в диагностике инфекционных заболеваний, особенно тех, где возбудителя трудно или невозможно культивировать [5].

Цель исследования: идентификация *M.leprae* в носовой полости у больных лепрой и контактных лиц с помощью метода полимеразно-цепной реакции (ПЦР) с блот-гибридизацией.

Материалы и методы. Исследовано 163 соскоба со слизистой поверхности носа, в том числе 63 от больных лепрой, 60 от здоровых и 40 от контактных по лепре лиц. Выделение ДНК осуществляли следующими методами: М1 - выделение ДНК набором реагентов «Проба-НК» (НПФ «ДНК-технология», Москва); М2 - набором реагентов «Проба ГС» (НПФ «ДНК-технология», Москва); М3 - набором реагентов «GenoLyse» («HainLifescience», Германия); М4 - выделение ДНК с помощью 5% бычьего сывороточного альбумина (СБА) (подана заявка на изобретение). Идентификацию *M.leprae* осуществляли с помощью ПЦР с последующей гибридизацией с использованием набора праймеров «GenoType LepraeDR» («HainLifescience», Германия). Метод основан на DNA-STRIP технологии и позволяет молекулярно-генетически идентифицировать M.leprae и ее устойчивость к основным противолепрозным препаратам (рифампицину, офлоксацину, дапсону). Амплификацию проводили в термоциклере «Терцик» («НПФ-ДНК-Технология», Россия). Режим амплификации: 1 цикл 95°С – 15 мин, затем 10 циклов 95°С – 30 сек, 58°С – 2 мин, 30 циклов 95°С – 25 сек, 53°С – 40 сек, 70°С – 40 сек и 1 цикл 70°С – 8 мин.

Гибридизацию ДНК выполняли на автоматическом приборе «GT-Blot-48» («HainLifescience», Германия). Учет результатов осуществляли визуально с помощью прилагаемого к каждому набору шаблона и в автоматическом сканирующем устройстве «GenoScan» («HainLifescience», Германия), принцип работы которого заключается в автоматическом анализе параметров сканированных стрипов.

Результаты. При сравнении методов выделения ДНК самыми чувствительными оказались методы М1 («Проба-НК») и М4. Так, при выделении ДНК из одних и тех же образцов этими методами ДНК *M.leprae* обнаруживалась у 6 больных (9,5%), методом М2 - у 3 больных (4,7%), а методом М3 удалось идентифицировать *M.leprae* в соскобах со слизистой поверхности носа только у одного больного (1,6%). Однако метод М4 является самым простым в исполнении и недорогим. В соскобах со слизистой поверхности носа от контактных по лепре лиц в 2 случаях (5%) в носу обнаруживались ДНК *M.leprae*. Ни в случаях с больными лепрой, ни в случаях с контактными лицами стандартными бактериоскопическими методами микобактерии лепры идентифицировать не удавалось. У здоровых лиц *M.leprae* не обнаруживались. Полученные результаты позволяют оптимизировать мероприятия по эпидемиологическому контролю за лицами контактными с больными лепрой.

Заключение. Для разработки скринингового теста идентификации возбудителя лепры особенно важным является использование неинвазивных методов, таких, например, как соскобы со слизистой поверхности носа. Несмотря на то, что использованный в данной работе набор «GenoType LepraeDR» фирмы «HainLifescience» (Германия) предназначен для идентификации *M.leprae* в биоптатах кожи, нами была апробирована эта тест-система для идентификации микобактерий лепры со слизистой поверхности носа. Использование различных методов экстракции ДНК позволило определить наиболее чувствительные и недорогостоящие методы, сопоставимые, а иногда и превосходящие по эффективности зарубежные аналоги. Внедрение в практическую лепрологию таких молекулярно-генетических методов, как ПЦР и ПЦР с блот-гибридизацией показало их высокую чувствительность и специфичность по сравнению со стандартным классическим методом бактериоскопии, особенно при исследовании соскобов со слизистой поверхности носа.

Таким образом, применение молекулярно-генетических методов может способствовать выявлению заболевания на ранней стадии у контактных с больными лепрой лиц, когда возможно быстрое прерывание эпидемиологической цепочки. Обнаружение M.leprae без клинических проявлений не всегда предполагает субкли-

ническую стадию болезни [4], но способствует выявлению лиц повышенного риска заболевания. Это особенно актуально при лепре, имеющей длительный инкубационный период, и, соответственно, чем раньше будет поставлен диагноз, тем эффективнее будет лечение, с наименьшими экономическими затратами и наименьшим ущербом для здоровья пациентов.

Список используемой литературы:

1. Araujo S., Lobato J., Reis Ede M. et al. Unveiling healthy carriers and subclinical infections among household contact of leprosy patients who play potential roles in the disease chain of transmission // Mem. Inst. Oswaldo Crus. – 2012. – Vol.107. – P.55-59.

2. Guerrero M.L., Arias M.T., Garces M.T., Leon C.I. Developing and using a PCR test to detect subclinical Mycobacterium leprae infection // Pan. Amer. J. Pub. Health. – 2002. – Vol.11.(4). – P.228-234.

3. Rupendra S., Macdonald M., Bjune L. et al. Simplified PCR detection method for nasal Mycobacterium leprae // Int. J. Lepr. – 2001. – Vol.69. – P.299-307.

4. Smith C.S., Noordeen S.K., Richardus J.H. A strategy to halt leprosy transmission // Lancet. Infect. Dis. – 2014. – Vol.14. – P.96-98.

5. Van Beers J.M., Izumi S., Madjid B. et al. An epidemiological study of leprosy infection by serology and polymerase chain reaction // Int. J. Lepr. – 1994. – Vol.62. – P.1-9.

ЧАСТОТА РАСПРОСТРАНЕНИЯ B0/W148 ШТАММОВ В ПОПУЛЯЦИИ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* ИЗ ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ

Жданова С.Н.[1], Огарков О.Б.[1,2,3], Хромова П.А.[1], Зоркальцева Е.Ю.[3], Савилов Е.Д.[1,3], Бадлеева М.В.[4], Кощеев М.Е.[5]

[1]ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», Иркутск, Россия
[2]ФГБОУ ВПО «Иркутский государственный университет», Иркутск, Россия
[3]ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования», Иркутск, Россия
[4]ФГБОУ ВО «Бурятский государственный университет», Улан-Удэ, Россия
[5]ОГБУЗ «Иркутская областная клиническая туберкулезная больница», Иркутск, Россия

Введение. Увеличение частоты множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) возбудителя туберкулеза (ТБ) на фоне высоких уровней заболеваемости и распространенности этой инфекции определяет неблагоприятную эпидемиологическую ситуацию в Иркутской области и ставит регион в группу лидеров в СФО. Немаловажную роль в создавшихся условиях играет генотипическая характеристика микобактерий туберкулеза (МБТ), среди которых доминируют два основных субтипа генотипа Beijing (Жданова и др., 2011). С отдельными клонами этого генотипа связывают эпидемическое развитие эпидемии МЛУ-ТБ в России (Casali et all., 2015; Mokrousov, 2015). Особая роль в развитии МЛУ-ТБ отводится B0/W148 субтипу генотипа Beijing, который может быть идентифицирован разными молекулярно-генетическими методами.

Цель и задачи. Оценить частоту распространенности B0/W148 штаммов в популяции МБТ Иркутской области.

Материалы и методы. Проанализирована выборка из 589 штаммов МБТ, выделенных от больных ТБ, находившихся на лечении в Иркутской областной клинической туберкулезной больнице в 2010-2015 гг. Экстракцию ДНК штаммов МБТ проводили из инактивированных культур набором ДНК-сорб В (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия) согласно протоколу производителя. MIRUVNTR генотипирование проводили по протоколу сайта MIRUVNTRplus. Генотипы семейства Beijing дополнительно субтипировались по участкам генома RD105/RD207, как описано ранее (Жданова С. и др., 2011). Выявление субтипа B0/W148 генотипа Beijing проводили с помощью теста, основанного на обнаружении инсерции инвертированной IS6110, расположенной в межгенной области Rv2664 и Rv2665генов (Mokrousov I et al., 2012). Параллельно был осуществлен тест на выявление W148 (CC2) по собственной разработке, позволяющей идентифицировать наличие специфической для W148 штаммов динуклеотидной делеции 2541-2542delCA в гене *kdpD*, описанной Merker M. et al, (2015). С помощью пакета программ сайта MIRUVNTRplus осуществляли MLVA MtbC 15-9 идентификацию в соответствии со стандартной номенклатурой и филогенетический анализ полученных MIRU-VNTR паттернов. Профили штаммов, верифицированные как генотип Beijing вышеуказанными методами, по 24 локусам MIRU-VNTR сравнивались с базой данных 1550 уникальных MIRU-VNTR паттернов генотипа Beijing, распределенных по семи клональным комплексам (clonal complexes - CCs) (Merker M., 2015). Уровень кластеризации (clustering rate) оценивали по формуле: $CR = (n_c\text{-}c)/n$ где n_c – общее количество кластеризованных штаммов, c – количество кластеров, n – общее количество штаммов. При этом кластером считали филогенетичекую группу, состоящую из двух или более идентичных по 24-м локусам штаммов. Значимость различий между параметрами оценивали с помощью непараметрического критерия $\chi 2$. Различия считали статистически значимыми при $p<0,05$.

Основные результаты. Методом MIRU-VNTR по 24 локусам оценена популяционная структура МБТ в Иркутской области. Доминирующее количество изолятов принадлежало генотипу Beijing – 72,7% (428/589), профили которых характеризовались высоким уровнем кластеризации (CR=0,70). Генотип LAM обнаружен у 10,7% штаммов (63/589), T и Ural имели третье и четвертое место по распространенности – 4,6% (27/589) и 3,2% (19/589) соответственно. Изоляты LAM, T и Ural отличались значительной генетической гетерогенностью. Так же большое генетическое разнообразие давали минорные генотипы X, H, S, Uganda, Cameroon и Haarlem – от 1 до 7 изолятов в выборке. В 2,7% (16/589) случаев были выявлены микст

генотипы МБТ. Не удалось классифицировать используемыми методами 1,7 % (10/589) штаммов.

Штаммы генотипа Beijing принадлежали в основном к двум клональным комплексам: СС1 -50,5% (216/428) и СС2 – 32,2% (138/428), наиболее распространенным в России, но имевшим разнообразные MIRU-VNTR-24профили, в том числе отличающиеся от циркулирующих в европейской части России. Обнаружено практически полное совпадение (153/154) результатов идентификации клона B0/W148 методом выявления специфической инсерции IS6110 и W148 (СС2) – путем определения динуклеотидной делеции в гене *kdpD*. Присутствие B0/W148 в изучаемой коллекции штаммов генотипа Beijing составляло 36,0 % (154/428), большинство из которых принадлежали СС2 –78,6 % (121/154), СС1 - 11,7% (18/154) и СС3 – 6,5% (10/154) и другим клональным комплексам – 3,2 5(5/154). Такое распределение по разным клональным комплексам штаммов, идентифицированных как B0/W148, свидетельствует о генетической неоднородности изучаемой целевой группы МБТ.

На фоне высокого уровня кластеризации (CR=0,68) было выявлено 37 MIRU-VNTR профилей B0/W148 субтипа генотипа Beijing. Кластеризующиеся штаммы B0/W148 были представлены шестью гаплотипами, основным среди них был 100-32 (СС2), который объединил 54,6% (84/154) случаев ТБ. Кроме этого, кластеризованными по данным MIRU-VNTR- 24 профилей были штаммы 99-32 (СС1), 94-32 (СС1), 1075-32 (СС2), 1076-32 (СС2) и 6827-32 (СС2).

Более половины - 59,1% (91/154) штаммов B0/W148 несли МЛУ, что было значительно выше частоты этого показателя в общей изучаемой выборке 43,7% (257/589) ($\chi2$=11,13 p<0,01). Штаммы B0/W148 имели самые высокие показатели МЛУ среди впервые выявленных случаев ТБ. На долю впервые выявленных больных ТБ с B0/W148 приходилось 48,8% (42/86) МЛУ случаев, что также превышало аналогичный уровень в собранной коллекции (29% -138/476), отражающей популяцию больных с первым эпизодом лечения ТБ, получавших стационарный курс терапии ТБ ($\chi2$=3,84 p=0,025).

Заключение. Описанные выше результаты исследования указывают на широкое распространение субтипа B0/W148 генотипа Beijing - 26,1% (154/589) в популяции МБТ Иркутской области. Отличительными чертами, как и в других аналогичных исследованиях, стали повышенные частоты кластеризации и МЛУ у впервые выявленных больных ТБ, свидетельствующие о наличии стабильного резервуара инфекции и реализации активной передачи штаммов со сформированной МЛУ устойчивостью, особенно связанных с MIRU-VNTR гаплотипами 100-32 (СС2) и 99-32 (СС1).

Работа поддержана РФФИ (грант 15-04-00632 А)

ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОТИПОВ МУЛЬТИРЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS,* ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В ОМСКОЙ ОБЛАСТИ

Пасечник О.А.[1], Вязовая А.А.[2], Ляпина Е.С.[3], Витрив С.В.[3], Мокроусов И.В.[2]

[1]ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, Омск, Россия
[2]ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», Санкт-Петербург, Россия
[3]КУЗОО «Клинический противотуберкулезный диспансер», Омск, Россия

Введение. По оценкам ВОЗ, в 2015 году в мире зарегистрировано 10,4 млн. случаев туберкулеза (142,0 случая на 100 тысяч населения), из них 580 000 новых случаев туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ) [1].

Российская Федерация характеризуется неравномерным распределением заболеваемости населения туберкулезной инфекцией и наличием региональных особенностей генетической структуры популяции возбудителя туберкулеза [2, 3]. Сибирский регион традиционно характеризовался значительным уровнем распространенности, заболеваемости и смертности населения от туберкулеза. Заболеваемость туберкулезом населения Омской области значительно превышала средне российский показатель [4]. Применяемые в настоящее время методы генотипирования *M. tuberculosis* помогают контролировать эпидемиологические тенденции, оценивать эффективность профилактических и противоэпидемических мероприятий, качество лабораторной диагностики, определять динамику трансмиссии устойчивых к лекарственным препаратам микобактерий.

Цель исследования – изучение тенденции развития эпидемического процесса туберкулеза и молекулярно-генетическая характеристика МЛУ штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, циркулирующих в Омской области.

Материалы и методы. В основу исследования положено наблюдение за эпидемическим процессом туберкулезной инфекции в Омской области за период 2006 – 2015 гг. Применялись описательно-оценочные методы эпидемиологического исследования.

Изучено 78 культур *M. tuberculosis,* выделенных от впервые выявленных больных туберкулезом органов дыхания в Омской области в 2016 г.: 53 мужчин (67,9%), средний возраст 42,1 года (возрастной диапазон 19-67 лет), 25 женщин (32,1%), средний возраст 38,7 лет (возрастной диапазон 22–77 лет). Из них 49 больных были городскими жителями (62,8%), 25 больных коинфицированы ВИЧ (32,1%). Культивирование *M. tuberculosis* и определение лекарственной чувствительности изолятов к противотуберкулезным препаратам основного и резервного ряда проводили с помощью метода абсолютных концентраций на среде Левенштейна-Йенсена. Выделение и очистку ДНК проводили по van Embden и соавт. [5]. Первоначальную дифференциацию изолятов на группы Beijing и non-Beijing осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), определяя специфическую для генотипа Beijing вставку элемента IS6110 в локусе генома *dnaA-dnaN* [2]. Генотипирование осуществляли методом сполиг-

готипирования [6]. Для классификации профилей сполиготипирования использовали международную компьютерную базу данных SITVIT_WEB.

Результаты. На территории Омской области динамика заболеваемости населения характеризовалась умеренной тенденцией к снижению (Тсн.=-2,52%). В 2015 году заболеваемость туберкулезом находилась на уровне 68,2 на 100 тысяч населения, что на 30,0% ниже среднемноголетнего показателя заболеваемости (88,1 на 100 тыс. населения). Распространенность случаев МЛУ-ТБ составила 37,9 на 100 тысяч населения (Тпр.=1,4%). Хотя заболеваемость населения МЛУ-ТБ на протяжении изучаемого периода была стабильна со среднемноголетним показателем 7,4 на 100 тысяч населения, в контингенте больных туберкулезом доля бактериовыделителей мультирезистентных штаммов *M. tuberculosis* возросла в два раза - с 10,8 % до 21,6%.

В настоящем исследовании 64 (82,0%) из 78 МЛУ штаммов *M. tuberculosis* принадлежали к генотипу Beijing, 2 из которых имели сполигопрофиль SIT1. С помощью мультиплексной ПЦР 25 (39,0%) из 64 штаммов Beijing были отнесены к кластеру B0/W148, циркуляция которого рассматривается как одна из причин активного распространения МЛУ штаммов *M. tuberculosis* в России.

Среди 14 штаммов non-Beijing методом сполиготипирования и других молекулярных маркеров определены следующие генетические семейства: LAM (n=7; 50,0%), Ural (n=5; 35,7%), T (n=2, 14,3%). Выявлены два новых сполиготипа- SIT4109/LAM и SIT3153/T, ранее не встречавшихся в российской популяции *M. tuberculosis*.

Выводы. Несмотря на тенденцию к снижению уровня заболеваемости туберкулезом населения Омской области, эпидемическая ситуация ухудшается, т.к. растет число случаев МЛУ-ТБ. В структуре генетически неоднородных мультирезистентных штаммов *M. tuberculosis* доминируют (82,0%) представители семейства Beijing, 39,0% из них эпидемиологически значимого кластера B0/W148.

Список используемой литературы:

1. WHO Global tuberculosis report 2016/Available at http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/.

2. Mokrousov I, Vyazovaya A, Narvskaya O. Mycobacterium tuberculosis Latin American-Mediterranean family and its sublineages in the light of robust evolutionary markers. J Bacteriol. 2014;196:1833–41.

3. Mokrousov I. Mycobacterium tuberculosis phylogeography in the context of human migration and pathogen's pathobiology: Insights from Beijing and Ural families. Tuberculosis (Edinb). 2015;95(Suppl 1):S167–76.

4. Пасечник О.А., Стасенко В.Л., Блох А.И. Эпидемиологические проявления туберкулезной инфекции в регионах Сибири с различной распространенностью ВИЧ-инфекции. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2015. -Т.14, №5.-С. 31-35.

5. Van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, et al. Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J. Clin. Microbiol. 1993;31:406–409.

6. Kamerbeek J., Schouls L.,Kolk A.,van Agterveld M.,van Soolingen D.,Kuijper S., Bunschoten A.,Molhuizen H.,Shaw R.,Goyal M.,van Embden J.Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J. Clin. Microbiol. 1997, vol. 35, no. 4, pp. 907-914.

ПРИМЕНЕНИЕ СИСТЕМЫ МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА ДЛЯ КОНТРОЛЯ НАД НОЗОКОМИАЛЬНЫМ РАСПРОСТРАНЕНИЕМ ЛЕКАРСТВЕННО-УСТОЙЧИВЫХ ШТАММОВ *M. TUBERCULOSIS*

Скиба Ю.А.[1], Набирова Д.А.[2], Мокроусов И.В.[3], Исмагулова Г.А.[1], Мальцева Э.Р.[1], Жидкеева Р.Е.[1], Найзабаева Д.А.[1], Бисенбай А.О.[1], Юркевич Н.А.[1], Аубакирова М.Б.[4], Сапиева Ж.А.[4], Шмид Д.[2], Айтхожина Н.А.[1]

[1] Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина, Алматы, Казахстан
[2] Центральноазиатский региональный офис CDC/ CAR, Алматы, Казахстан
[3] НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия
[4] Межрайонный противотуберкулезный диспансер города Алматы, Алматы, Казахстан

Введение. Благодаря объединению научного и технического потенциала специалистов нескольких научно-исследовательских и медицинских центров и в ходе реализации ряда проектов и пилотных исследований, посвященных разработке методических и практических основ для системы молекулярно-эпидемиологического мониторинга возбудителей туберкулеза, был накоплен обширный опыт и сделан существенный вклад в понимание эпидемических процессов, протекающих на территории Казахстана. Так, были созданы: пополняемая информационная база данных генетических профилей, установленных при помощи 24-MIRU-VNTR и сполиготипирования, наборы реагентов, разработанные для проведения молекулярно-генетической паспортизации микобактериальных изолятов, а также протоколы на основе редуцированных и развернутых панелей для потокового высокопроизводительного скрининга в 96- и 384-луночном формате.

Цель. Апробация комплекса молекулярно-эпидемиологических разработок для своевременного выявления нозокомиального распространения лекарственно-устойчивых штаммов *M. tuberculosis* и повышения эффективности системы инфекционного контроля в противотуберкулезных медицинских организациях.

Материалы и методы. Объектом исследования являлись клинические изоляты *M. tuberculosis*, собранные с 2006 по 2016 годы как в стационарах города Алматы, так и в регионах Республики Казахстан. Образцы охарактери-

зованы по устойчивости к препаратам 1-го и 2-го рядов с использованием метода культивирования на среде Левенштейна-Йенсена и системы BACTEC MGIT 960. Генотипирование образцов осуществляли с помощью ручного варианта метода 24MIRUVNTR [Supply et al., 2006] и сполиготипирования [Kamerbeek et al.,1994] с последующим сравнением с базами MIRUVNTR*plus* и SITVIT_WEB. Дополнительное типирование по гипервариабельным локусам QUB-18, QUB3232, VNTR-3820, VNTR-4120 применялось в случае недостаточной дифференциации генотипов [Iwamoto et al., 2007; AllixBeguec et al., 2014]. Для выявления генетических детерминант лекарственной устойчивости изолятов на базе лаборатории генома ИМББ им. М.А. Айтхожина применялись система «ТБ-ТЕСТ» производства ООО «БИОЧИПИМБ» (Россия, Москва) и наборы GenoType MTBDRplus (Hain Lifescience, Германия).

Основные результаты. В результате наших исследований в период 2006-2014 годов был выявлен ряд случаев туберкулеза, вызванного не одним, а несколькими штаммами *M. tuberculosis* одновременно. Несомненно, такое явление имеет негативное влияние как на течение заболевания, так и на адекватность противотуберкулезной терапии. Также ранее нами были зафиксированы факты смены генотипа *M. tuberculosis* у пациентов в ходе стационарного лечения, что позволило говорить об эффективности используемых молекулярно-генетических методов в расследовании случаев реинфекции и нозокомиальной трансмиссии. Кроме того, было показано, что выявляемые вторичные генотипы чаще всего относились к субтипу Beijing 94-32, для которого ранее нами была показана ассоциация с множественной лекарственной устойчивостью [Skiba et al., 2015].

В ходе пилотного исследования по изучению нозокомиальной трансмиссии штаммов, проведенного на выборке 250 образцов, выделенных от пациентов с отсутствием конверсии мокроты, нами было подтверждено 16 случаев смены генотипа, а, соответственно, и штамма возбудителя инфекции. Однако дизайн данного исследования предполагал серии дополнительных заборов мокроты, посевов и тестов лекарственной чувствительности культур на протяжении времени пребывания пациента в стационаре. Такой подход оказался дорогостоящим и потребовал значительных расходов материалов и рабочего времени медицинского и лабораторного персонала, а также не позволил своевременно выявлять случаи реинфекции.

В связи с этим нами был начат проект для апробации возможности потоковой генетической паспортизации всего объема изолятов, выделяемого от госпитализируемых пациентов. В настоящее время с применением скрининговой панели из 8 наиболее информативных локусов осуществляется первичное генотипирование всех поступающих образцов. В случае расхождений в генетических профилях культур, полученных от одного и того же пациента в разное время, применяется развернутое генотипирование по 24 основным и 4 дополнительным VNTR локусам, а также анализ генетических детерминант устойчивости с использованием биологических чипов.

Уже на первом этапе работ при сопоставлении получаемых результатов с базой данных по прошлым исследованиям были выявлены записи о трех пациентах, ранее проходивших противотуберкулезную терапию и на момент текущего исследования снова находившихся на стационарном лечении. Установлено, что у первого из пациентов генотипы в обоих исследованиях были идентичными. Однако для второго и третьего пациента были обнаружены четкие различия в генетических профилях изолятов, полученных от них в разное время, что свидетельствует о смене возбудителя инфекции. Развернутое генотипирование также подтвердило расхождение в ряде локусов для первичных и вторичных изолятов.

Также при анализе полученных данных был выявлен отдельный кластер, образованный пятью идентичными профилями, относящимися к семейству LAM. При этом три из них принадлежали одному и тому же пациенту и были выделены от него в разное время. Штаммы с подобными генотипами ранее на территории Казахстана выявлены не были. Десятилетний опыт наблюдений за казахстанской популяцией *M. tuberculosis* и информация, собранная в нашей базе данных более чем о 2000 изолятах, позволили предположить, что данный штамм был завезен относительно недавно. Развернутый MIRUVNTR анализ и сполиготипирование этих изолятов позволили подтвердить их идентичность и установить, что они имеют VNTR-профиль 16113830, сполигопрофиль SIT 20 и относятся к сублинии LAM RD-Rio. Анализ генетических детерминант лекарственной устойчивости не выявил наличия таковых у всех пяти изолятов. К сожалению, установить источник заражения для этих трех пациентов пока не удалось. Однако, зафиксировав недавнее проникновение данного штамма на территорию РК и зная его исходные свойства, в контексте эпидемиологических исследований мы получили возможность в дальнейшем проследить его вероятное распространение в популяции и изменения его чувствительности к антибиотикам.

Заключение. Мы уверены, что результаты этих и других молекулярно-генетических исследований приведут к созданию и внедрению практических решений и инноваций в системе здравоохранения, которые, в конечном счете, позволят предотвратить дальнейшее распространение лекарственно-устойчивых форм туберкулеза.

Раздел 13. ФАРМАКОГЕНЕТИКА И ФАРМАКОГЕНОМИКА

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ CYP2C9*2 И CYP2C9*3 ГЕНА ЦИТОХРОМА CYP2C9 В НЕКОТОРЫХ ЭТНИЧЕСКИХ ГРУППАХ ЖИТЕЛЕЙ СТАВРОПОЛЬСКОГО КРАЯ

Царукян А.А., Батурин В.А., Бобрышев Д.В.

ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ставрополь, Россия

Генетический полиморфизм ферментов метаболизма лекарственных средств может существенно влиять на эффективность и безопасность фармакотерапии. Следовательно, выявление мутантных аллелей генов ферментов биотрансформации лекарственных средств (ЛС) позволит еще до применения лекарственных средств прогнозировать эффективность лечения и развитие нежелательных лекарственных реакций (НЛР) [4]. Изучение генетического полиморфизма позволит объяснить не только индивидуальные, но и межэтнические различия фармакологического ответа. В полиэтничной стране в различных ее регионах может наблюдаться вариативность действия ЛС [1, 2]. При этом можно ожидать различия как эффективности, так и риска осложнений фармакотерапии. Изучение фармакогенетических особенностей различных этнических групп позволит разработать для каждой из них рекомендации по организации фармакотерапии.

Выраженным генетическим полиморфизмом обладает ген *CYP2C9*. Установлено замедление метаболизма CYP2C9 в трех подсемействах *CYP* (1, 2 и 3), причем максимальное количество мутантных «медленных» вариантов зарегистрировано в подсемействе 2 [2].

Наиболее распространенными и хорошо изученными полиморфизмами *CYP2C9* являются аллельные варианты ***CYP2C9*2*** (R144C) и ***CYP2C9*3*** (I359L), ассоциированные с замедлением скорости метаболизма ЛС-субстратов фермента [2, 4].

Цель. Изучить этнические аспекты носительства «медленных» аллельных вариантов гена CYP2C9*2 и CYP2C9*3 у представителей некоторых этнических групп Ставропольского края: славян, армян, карачаевцев, туркменов.

Материалы и методы. В исследование было включено 107 человек, постоянно проживающих на территории края, из них: 25 исследуемых, принадлежащих к этнической группе славян, 25 человек из этнической группы армян, 25 человек из этнической группы карачаевцев, 32 человека, являющихся представителями туркменского этноса. Принадлежность к этнической группе определялась путём анкетирования исследуемых при условии отсутствия смешанных межэтнических браков до третьего поколения предков. Изучался состав аллелей гена *CYP2C9* по полиморфизмам Ile359Leu и Arg144Cys методом ПЦР с использованием диагностических наборов для выявления полиморфизмов в геноме человека «SNP – экспресс» производства НПФ «ЛИТЕХ», Россия. Материалом для выделения ДНК являлась венозная кровь. Достоверность различий значений частот аллелей в этнических выборках определяли по критерию Н Краскала – Уоллиса с помощью пакета статистических программ SPSS 16.0 for Windows. При $p<0,05$ результаты считались статистически значимыми.

Результаты. Выявлены различия частот полиморфных аллелей и генотипов гена *CYP2C9* в этнических группах. Частота клинически значимой аллели 359Leu (*3) достоверно чаще выявляется у армян по сравнению со славянской этнической группой (14% и 6% соответственно) ($p<0,05$). У карачаевцев и туркменов аллель 359Leu (*3) выявлялась соответственно в 10% и 12% случаев, то есть эти группы занимали промежуточное положение по частоте встречаемости аллели 359Leu (*3).

Таблица 1. Распространенность полиморфизмов гена *CYP2C9* у жителей Ставропольского края в зависимости от этнической принадлежности

Этнос	CYP2C9*3 (Ile 359 Leu), %	CYP2C9*2 (Arg 144 Cys), %
Армяне, n=25	14*	14#(##)
Карачаевцы, n=25	10	4**,#
Славяне (русские, украинцы), n=25	6*	12**(«)
Туркмены, n=32	12	6 ##(«)

* $p<0,05$ в сравнении армян и славян;

** $p<0,05$ в сравнении карачаевцев и славян;

\# $p<0,05$ в сравнении армян и карачаевцев; \#\# $p<0,05$ в сравнении армян и туркменов;

« $p<0,05$ в сравнении славян и туркменов.

Для полиморфной аллели 144Cys (*2) также были выявлены достоверные различия в исследуемых группах. Среди карачаевцев носителей полиморфного маркера 144Cys было в 3 раза меньше, чем у славян (4% и 12% соответственно, $p<0,05$), а среди армян аллель 144Cys была выявлена уже в 14% наблюдений ($p<0,05$ по сравнению с группой карачаевцев).

В группе представителей туркменского этноса были выявлены достоверно более низкие значения частоты 144Cys по сравнению с армянами и славянами (6% против 14% у армян, p<0,05; 6% против 12% у славян, p<0,05). При этом в популяции армян частоты полиморфных аллелей 359Leu и 144Cys были максимальны по сравнению с таковыми в других этнических группах. У славян частота клинически значимой аллели 359Leu, ответственной за проявление геморрагического синдрома, была минимальной.

Выводы. На основании полученных данных можно предположить, что армяне обладают генетически детерминированной повышенной чувствительностью к ЛС-субстратам CYP2C9 (непрямые антикоагулянты, НПВС, пероральные гипогликемические средства), а следовательно, и предрасположенностью к развитию НЛР при их назначении [2, 3]. Высокая встречаемость аллельного варианта *CYP2C9*3* у армян может быть прогнозирующим фактором увеличенного риска кровотечений при назначении варфарина. С этой точки зрения, можно рекомендовать применение у армян ЛС-субстратов CYP2C9, начиная с минимальных доз. Это должно учитываться при разработке региональных стандартов фармакотерапии и формуляров лекарственных средств, что является перспективным с точки зрения повышения эффективности и безопасности фармакотерапии, а также может быть экономически оправданным за счет сокращения расходов на коррекцию НЛР.

Список используемой литературы

1. Батурин, В. А. Этнические особенности действия сердечно-сосудистых лекарственных средств у жителей Ставропольского края / В. А. Батурин, А. А. Царукян, Н. В. Яковлева, А. И. Эльканова. – Ставрополь: Изд-во СтГМУ. – 2016. – 120 с.

2. Кукес, В. Г. Метаболизм лекарственных средств: научные основы персонализированной медицины / В. Г. Кукес, С. В. Грачев, Д. А. Сычев, Г. В. Раменская. – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2008. – 304 с.

3. Румянцев, Н.А. Перспективы индивидуализации применения и дозирования пероральных антикоагулянтов и статинов у пациентов в рутинной клинической практике / Н.А. Румянцев, Д.А. Сычев, В.Г. Кукес // Клиническая фармакология и терапия. – 2015. – Т. 24. – № 4. – С 70–74.

4. Rosemary, J. The Pharmacogenetics of CYP2C9 and CYP2C19: Ethnic Variation and Clinical Significance /J. Rosemary, C. Adithan // Current Clinical Pharmacology. – 2007. – 2. – P. 93 –109.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ БИОТРАНСФОРМАЦИИ ОПИОИДНЫХ АНАЛЬГЕТИКОВ И ЕЕ РОЛЬ В ИЗУЧЕНИИ МОДИФИКАЦИОННОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ОБЕЗБОЛИВАНИЯ В КЛИНИЧЕСКОЙ ОНКОЛОГИИ

Боброва О.П.[1,2], Шнайдер Н.А.[1], Зырянов С.К.[3]

[1]ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, Красноярск, Россия

[2]КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер им. А.И. Крыжановского», Красноярск, Россия

[3]ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Введение. Пациенты, страдающие злокачественными новообразованиями (ЗНО), подвержены формированию хронического болевого синдрома на разных стадиях основного процесса, значимо изменяющего показатели качества жизни периода дожития. Имеющийся ступенчатый алгоритм противоболевой терапии, разработанный ВОЗ, в рамках паллиативной терапии, к сожалению, не всегда позволяет должным образом осуществлять анальгетическую терапию из-за влияния большого множества факторов, определяющих межиндивидуальную изменчивость эффективности и безопасности анальгетиков. Известно, что генетическая изменчивость объясняет фенотипическое разнообразие хронического болевого синдрома в 50% случаев. Однако при проведении длительной анальгетической терапии у пациентов с болевым синдромом решающее значение имеет анализ сочетанного влияния различных факторов, обеспечивающих модификационную фенотипическую изменчивость боли.

Цель. Изучить и проанализировать литературные данные по влиянию различных генетических факторов на модификационную фенотипическую изменчивость эффективности и безопасности опиоидных анальгетиков при лечении хронического болевого синдрома при онкопатологии.

Материалы и методы. Проведен литературный обзор отечественных и зарубежных изданий с использованием баз данных: «MedLine», «PubMed», «НЭБ elibrary.ru», «WileyOnlineLibrary», «WebofScience», «OxfordUniversityPress», «SAGEPremier». Глубина поиска полнотекстовых статей на английском и русском языках согласно критериям включения/исключения – 1995-2016 гг. (11 лет).

Результаты. Различная скорость метаболизма опиоидных анальгетиков, предопределяемая генетической изменчивостью ферментов CYP2D6, CYP3A4/5 и UGT2B, диктует индивидуальность в выборе дозового режима у медленных, распространенных (нормальных), промежуточных и быстрых (ультрабыстрых) метаболизаторов. Опиоидные анальгетики-«лекарства» (фентанил, метадон, бупренорфин) у пациентов, являющихся медленными метаболизаторами (носители полиморфизмов *CYP3A4*20, CYP3A4*26, CYP2D6*3-8, CYP2D6*38, CYP2D6*12-21*), могут характеризоваться меньшими эффективными дозами и большей частотой нежелательных побочных реакций (НПР). У анальгетиков-«пролекарств»

(кодеин, трамадол) отсутствие должной функциональной активности ферментов у медленных метаболизаторов предопределяет неэффективное обезболивание, у промежуточных – отмечается 30% снижение эффективности анальгезии, у ультрабыстрых – повышается возможность реализации нейротоксичности. Полиморфизмы гена *UGT2B7* (*840G>A, 900G>A, 802 C>T, 161 C>T),* обеспечивающего глюкоронирование опиоидных анальгетиков, предопределяют отсутствие терапевтической эффективности у 30% пациентов, получающих морфин с целью обезболивания. Недостаточно изучена ассоциация ОНП генов, определяющих фенотипическую изменчивость изоферментов цитохрома CYP450 печени, с эффективностью и безопасностью при назначении гидроморфона, морфина, оксиморфона и тапентадола. Сопроводительное назначение препаратов у онкобольных, являющихся индукторами или субстратами (ингибиторами) вышеуказанных ферментов, в рамках паллиативного лечения может значимо изменять эффективность опиоидной терапии и влиять на профиль безопасности последних. Амиодарон, метоклопрамид, антидепрессанты (пароксетин, сертралин, венлафаксин, флуоксетин, амитриптилин, имипрамин), являясь субстратами CYP2D6*,* ослабляют эффективность опиоидной терапии, что особенно важно при использовании опиоидов – лекарств и пролекарств у медленных и промежуточных метаболизаторов. CYP2D6 метаболизируемые антидепрессанты и антиконвульсант карбамазепин (самоиндуктор) также могут приводить к реализации серотонинового синдрома на фоне терапии трамадолом, индуцируя изофермент CYP3A4*.* Медленные метаболизаторы, носители полиморфизмов *CYP2D6*****4*** и *CYP2D6*****10,*** предопределяют меньшую эффективность терапии тамоксифеном при гормонпозитивном раке молочной железы за счет низкой активности эндоксифена, образующегося под влиянием CYP2D6. Средства сопроводительной терапии (амиодарон, апрепитант, антагонисты кальция, флуконазол, флуоксетин, иматиниб) угнетают активность изофермента CYP3A4, что может оказывать влияние на эффективность анальгетической терапии. Морфин, бупренорфин, дигидрокодеин, дигидроморфин, гидроморфон, оксиморфон подвергаются глюкоронированию, уменьшая риск фармакокинетических взаимодействий, сохраняя фармакодинамические взаимодействия с адъювантными лекарственными средствами: тамоксифеном, диклофенаком, налоксоном, карбамазепином, трициклическими антидепрессантами и бензодиазепинами – ингибиторами UGT2B7, приводящими к фенотипической реализации НПР. Результаты гендерных различий ферментативной активности CYP3A4/A5 и UGT2B являются противоречивыми. Единичные исследования показывают, что генетически детерминированная активность изофермента CYP2D6 выше у мужчин, чем у женщин, однако такой вывод нуждается в уточнении в связи с небольшим объемом выборок.

Заключение. Ассоциативные генетические исследования полиморфизма генов метаболизма опиоидов имеют клинико-прогностическое значение для оценки межиндивидуальных различий, фенотипически реализующихся под действием различных негенетических факторов, включая медикаментозную нагрузку в составе паллиативной и/или сопроводительной терапии. Молекулярная диагностика полиморфизма генов, кодирующих ферменты биотрансформации лекарственных средств в печени, предопределяет индивидуальность (персонификацию) выбора опиоидов с учетом возможной эффективности и безопасности анальгетической терапии в клинической онкофармакологии.

ВЛИЯНИЕ ГЕНОТИПА ПО ПОЛИМОРФНОМУ МАРКЕРУ A6986G ГЕНА CYP3A5 НА ФАРМАКОКИНЕТИКУ АПИКСАБАНА У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ КАРДИОЭМБОЛИЧЕСКИМ ИНСУЛЬТОМ

Крюков А.В.[1], Сычев Д.А.[1], Андреев Д.А.[2], Рябова А.В.[1], Рыжикова К.А.[1], Лоскутников М.А.[3]

[1]ФГБОУ ДПО «РМАНПО» Минздрава России, Москва, Россия
[2]ФГБОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России, Москва, Россия
[3]ГКБ № 67 им. Л.А. Ворохобова, Москва, Россия

Введение. В настоящее время появляются работы, показывающие значение генетических особенностей пациентов в отношении метаболизма и распределения новых оральных антикоагулянтов [1-3]. Однако влияние генотипа по полиморфному маркеру A6986G гена CYP3A5, кодирующего фермент, метаболизирующий апиксабан, широко не исследовалось.

Цель и задачи. Оценить влияние на фармакокинетику апиксабана генотипа по полиморфному маркеру A6986G гена CYP3A5, кодирующего фермент, метаболизирующий апиксабан, у пациентов с фибрилляцией предсердий в остром периоде кардиоэмболического инсульта.

Материалы и методы. В настоящее исследование было включено 17 пациентов с кардиоэмболическим инсультом (14 женщин и 3 мужчин). Перед включением в исследование пациенты или их законные представители подписывали информированное добровольное согласие на участие в исследовании.

Средний возраст пациентов, включенных в фармакокинетическое исследование, составил 76,6 ± 9,5 лет. Пациенты имели высокий риск развития повторного инсульта, средняя сумма баллов по шкале CHA_2DS_2-VASc равна 5,5. Риск кровотечения при применении антикоагулянтов также был достаточно высоким, средняя сумма баллов по шкале HAS-BLED равна 3. Функция почек при оценке по формуле MDRD была снижена, средняя СКФ 55 мл/мин/1,72м2, что соответствует 2 стадии ХБП. Показатели гемостаза, которые определялись в течение госпитализации, не отклонялись от референсных значе-

ний. Средняя продолжительность госпитализации составила 14,5 дня.

Для определения концентрации препарата выполнялся забор венозной крови в вакуумные пробирки с антикоагулянтом ЭДТА-К3 емкостью 6 мл перед приемом 5 мг апиксабана (0 точка) и через 1, 2, 3, 4, 10, 12 часов после приема препарата. Всего в группе пациентов с острым инсультом получено 119 образцов крови для определения концентрации апиксабана.

Концентрацию апиксабана в плазме определяли методом хромато-масс-спектрометрического анализа на высокоэффективном жидкостном хроматографе.

Для проведения генотипирования по полиморфизму CYP3A5 6986A>G (rs776746) использовался метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Для исследования было отобрано 17 образцов крови.

Определение генетических полиморфизмов проводилось в несколько этапов: 1) выделение геномной ДНК из лейкоцитов венозной цельной крови, 2) проведение аллель-специфичной ПЦР, 3) анализ и интерпретация результатов.

Основные результаты. В результате генотипирования по полиморфизму 6986A>G гена CYP3A5 (rs 776746) распределение пациентов по генотипам оказалось следующим: 14 гомозигот с генотипом GG, 3 гетерозиготы с генотипом AG. Фармакокинетика апиксабана в группах с различными генотипами по полиморфному маркеру A6986G гена CYP3A5 статистически значимо не различалась.

Получены фармакокинетические параметры в группах пациентов с GG генотипом и AG генотипом: Cmax 116,5 нг/мл vs 170,0 нг/мл соответственно (p=0,362); AUC (0, τ) 940,1 нг*ч/мл vs 1395,9 нг*ч/мл соответственно (p=0,509); AUC (0, ∞) 2745,8 нг*ч/мл vs 2775,3 нг*ч/мл соответственно (p=0,840); Tmax 3,5 ч vs 2 ч соответственно (p=0,156); t½ 18,4 ч vs 11,1 ч соответственно (p=0,633).

Заключение. Определено, что фармакокинетика апиксабана у пациентов с острым кардиоэмболическим инсультом не зависит от генотипа по полиморфному маркеру A6986G гена CYP3A5, кодирующего фермент, метаболизирующий апиксабан, что указывает на отсутствие необходимости проведения генотипирования по CYP3A5 для прогнозирования антикоагулянтного эффекта апиксабана.

Список используемой литературы

1. Dimatteo C. [и др.]. Pharmacogenetics of dabigatran etexilate interindividual variability // Thrombosis research. 2016 (144). P. 1–5.

2. Dimatteo C. [и др.]. ABCB1 SNP rs4148738 modulation of apixaban interindividual variability // Thrombosis Research. 2016. (145). P. 24–26.

3. Paré G. [и др.]. Genetic determinants of dabigatran plasma levels and their relation to bleeding // Circulation. 2013. № 13 (127). P. 1404–12.

РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ В ИССЛЕДОВАНИИ ВКЛАДА ГЕНОВ БИОТРАНСФОРМАЦИИ ПРОТИВОЭПИЛЕПТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ В ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ТЕРАТОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА

Дмитренко Д.В., Шнайдер Н.А., Бочанова Е.Н.

ФГБОУ ВО «КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, Красноярск, Россия

Введение. Согласно данным международных регистров беременности и эпилепсии, существует повышенный риск развития врожденных пороков развития (ВПР), связанных с приемом противоэпилептических препаратов (ПЭП) во время беременности. Вальпроевая кислота (ВК) является одним из наиболее используемых ПЭП в связи с эффективностью в отношении широкого спектра эпилептических приступов. Женщины, принимающие ВК во время беременности, имеют в 2-16 раз больше шансов родить ребенка с ВПР. Механизмы тератогенеза ВК являются дискутабельными. Одним из механизмов тератогенеза является способность ВК накапливаться в кровотоке плода, достигая более высокой концентрации, чем в материнской крови, и оказывать тератогенное влияние. Если концентрация ВК в крови матери увеличивается на фоне приема высоких доз ВК или в результате носительства полиморфных аллельных вариантов генов, приводящих к «медленному» метаболизму, то увеличивается и приток ВК через плаценту и, соответственно, содержание ВК внутри плода (Utoguchi и Audus, 2000). Клинической значимостью в метаболизме ВК обладает ген *CYP2C9*, расположенный на хромосоме 10q24.1-24.3.

Цель и задачи. Изучение влияния полиморфных аллельных вариантов гена *CYP2C9* изофермента 2С9 цитохрома Р450 печени на концентрацию ВК в крови и тератогенез на фоне приема вальпроатов у женщин фертильного возраста.

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 199 женщин фертильного возраста, страдающих эпилепсией и принимающих препараты ВК. Средний возраст – 27 лет. Проведен ретроспективный анализ жалоб и анамнеза (по амбулаторным картам), анализ суточных доз ВК. Лабораторные методы исследования: терапевтический лекарственный мониторинг (ТЛМ) методом хемилюминесцентного иммуноанализа; молекулярно-генетическое исследование ОНП гена *CYP2C9* методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР RealTime). Проведено исследование полиморфных аллельных вариантов гена *CYP2C9* на хромосоме 10q24.1-24.3, кодирующего изофермент 2С9 цитохрома Р450 печени, включая: аллельный вариант «дикого» типа *CYP2C9*1*, не имеющий мутации в виде однонуклеотидной замены; *CYP2C9*2* (*R144C, c.430 C > T* – однонуклеотидная замена цитозина на тимин в положении 430); *CYP2C9*3* (*I359L, c.1075 A > C* – однонуклеотидная замена аденина на цитозин в положении 1075). Статистическая обработка результатов проводилась с помощью пакетов прикладных программ STATISTICA v. 7.0, SPSS Statistics 17.0, Excel с использованием непараметрических

критериев (Н-критерия Крускала – Уоллиса, Даннета, Ньюмена – Кейлса, Уилкоксона, критерий $\chi 2$). Для всех критериев критическое значение уровня значимости принималось $p \leq 0,05$.

Работа выполнена в рамках комплексных исследований по теме «Эпидемиологические, генетические и нейрофизиологические аспекты заболеваний нервной системы (центральной, периферической и вегетативной) и превентивная медицина» (номер госрегистрации 0120.0807480) на базе неврологического центра эпилептологии, нейрогенетики и исследования мозга Университетской клиники (Красноярск). Исследование одобрено на заседании Локального этического комитета КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России. Включение пациенток в исследование осуществлялось после подписания добровольного информированного согласия.

Результаты. Уровень ВК в плазме крови варьировал от 6 до 176 мкг/сут, медиана – 67 [51; 91] мкг/сут (референсный коридор 50–100 мкг/мл). В 27,0±3,8% случаев уровень ВК находился в субтоксическом и токсическом диапазонах.

Молекулярно-генетическое исследование проведено у 148/199 (74,4%) пациенток, принимающих препараты ВК. Гетерозиготное носительство полиморфного аллельного варианта *CYP2C9*2* (генотип *CYP2C9*1/*2*) выявлено в 18/148 (12,2±2,7%) случаях, гетерозиготное носительство *CYP2C9*3* (генотип *CYP2C9*1/*3*) – в 28/148 (18,9±3,2%) случаях, компаунд-гетерозигота (генотип *CYP2C9*2/*3*) – в 2/148 (1,4±0,9%) случаях. Больший риск замедления метаболизма ВК отмечен у гетерозиготных носительниц аллельного варианта *CYP2C9*2*, несмотря на меньшую частоту его встречаемости в исследуемой выборке по сравнению с *CYP2C9*3 (*13,5 % против 20,3 % соответственно, *p < 0,01*). Однако наибольшая степень корреляции между генотипом и кумуляцией ВК выявлена у компаунд-гетерозигот (r=0,9633) и носительниц мутантного полиморфного аллельного варианта генотипа *CYP2C9*1/*3* (r=0,933). Согласно анализу оценки риска, риск кумуляции в 1,82, 2,1 и 5,46 раза был выше при генотипах *CYP2C9*1/*3, CYP2C9*1/*2* и *CYP2C9*2/*3* соответственно, чем при генотипе *CYP2C9*1/*1*.

Частота случаев кумуляции ВК в крови у женщин-носительниц компаунд-гетерозиготы *CYP2C9*2/*3* была в 8 раз выше, чем при гомозиготном носительстве «дикого» аллельного варианта *CYP2C9*1;* а у гетерозиготных носительниц *CYP2C9*2* и *CYP2C9*3* соответственно в 2,6 раза и 3 раза выше, чем при гомозиготном носительстве «дикого» аллельного варианта *CYP2C9*1*. Тенденция к кумуляции ВК сохранялась у гетерозиготных носительниц мутантного полиморфного аллельного варианта *CYP2C9*2* и после снижения дозировки вальпроатов (в среднем на 16,7% от исходного). Кумуляция уровня вальпроевой кислоты в крови у гетерозиготных носительниц аллельных вариантов *CYP2C9*2* и *CYP2C9*3* регистрировалась даже на фоне приема низких и средних суточных доз. Кумуляция ВК в крови до токсического уровня у носительниц «дикого» аллельного варианта *CYP2C9*1* регистрировалась на фоне высоких пероральных суточных доз препарата.

Дозы ВК на момент зачатия в 41,9±5,3% случаев превышали тератогенный уровень. Частота развития ВПР у плода на фоне приема вальпроатов составила 5,4%. Отношение шансов развития ВПР у пациенток, принимающих вальпроаты, в 1,7 раза выше, чем в целом у женщин с эпилепсией, принимающих ПЭП. ВПР на фоне приема вальпроатов зарегистрированы в суточной дозе ВК свыше 1000 мг. Носительство генотипа *CYP2C9*2/*3* было ассоциировано с кумуляцией ВК до токсического уровня (>100 мкг/мл) и ВПР на фоне приема средне-терапевтических доз вальпроатов.

Выводы. Снижение активности изофермента 2С9 цитохрома Р450 печени у носительниц генотипов *CYP2C9*1/*2* и *CYP2C9*1/*3* требует индивидуального подбора дозы ПЭП широкого спектра действия – вальпроатов. Тератогенный потенциал препаратов ВК у женщин фертильного возраста, страдающих эпилепсией, связан с уровнем их генетически детерминированного метаболизма в печени. Использование методов молекулярной генетики для изучения генетически детерминированных нарушений биотрансформации позволяет осуществить индивидуальный подбор дозы ПЭП для снижения их тератогенного потенциала.

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ГЕНЕТИЧЕСКИМИ ПОЛИМОРФИЗМАМИ ПО CYP2C19 И МЕТАБОЛИЧЕСКИМ ОТНОШЕНИЕМ 5-ГИДРОКСИОМЕПРАЗОЛ/ОМЕПРАЗОЛ В МОЧЕ У ПАЦИЕНТОВ С ЯЗВЕННОЙ БОЛЕЗНЬЮ

Денисенко Н.П.[1,2], Сычев Д.А.[1], Сизова Ж.М.[2], Смирнов В.В.[2,3], Гришина Е.А.[1], Рыжикова К.А.[1]

[1]ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования», Москва, Россия

[2]ФГБОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова», Москва, Россия

[3]ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА, Москва, Россия

Введение. Изофермент системы цитохрома Р-450 2С19 (CYP2C19) является основным в биотрансформации ингибиторов протонной помпы [1]. Носительство генетических полиморфизмов CYP2C19*2, CYP2C19*3 и CYP2C19*17 связано с изменением скорости метаболизма омепразола, что влияет на эффективность лечения больных язвенной болезнью [2]. Основным метаболитом омепразола при биотрансформации под действием CYP2C19 является 5-гидроксиомепразол [3]. Отношение концентрации 5-гидроксиомепразола к концентрации омепразола (метаболическое отношение) в моче предлагается использовать как показатель активности изофермента CYP2C19 [4].

Цель. Установить зависимость между генетическими полиморфизмами CYP2C19*2, CYP2C19*3 и CYP2C19*17 и метаболическим отношением 5-гидроксиомепразол/омепразол в моче.

Материалы и методы. В исследование было включено 36 пациентов с язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки, принимающих омепразол 20 мг 2 раза в сутки, из них 13 мужчин (36%), 23 женщины (64%). Средний возраст пациентов составил 51,5±14 лет. Для выделения ДНК и проведения фармакогенетического тестирования по CYP2C19*2, CYP2C19*3 и CYP2C19*17 с помощью ПЦР в режиме реального времени производился забор 6 мл периферической венозной крови. Образцы мочи собирались однократно спустя три дня приема омепразола на четвертый день (либо позднее) между 6 и 9 часами утра натощак перед очередным приемом препарата. Определение концентрации омепразола и 5-гидроксиомепразола проводилось с помощью методики высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией на приборе Agilent 1290 Infinity. Для статистической обработки данных применялись непараметрические методы в программе SPSS Statistics 22.

Основные результаты. Среди 36 пациентов 18 (50%) оказались нормальными метаболизаторами (CYP2C19*1/*1), 9 (25%) – быстрыми метаболизаторами (CYP2C19*1/*17), 7 (19%) – промежуточными метаболизаторами (CYP2C19*1/*2, CYP2C19*2/*17, CYP2C19*3/*17) и 2 (6%) – медленными метаболизаторами (CYP2C19*2/*2). Распределение генотипов соответствовало равновесию Харди – Вайнберга (p>0,05). Метаболическое отношение 5-гидроксиомепразол/омепразол в моче оказалось наибольшим у пациента с генотипом быстрого метаболизатора CYP2C19*1/*17 и составило 3,24. Наименьшее метаболическое отношение обнаружено у пациентов с генотипами CYP2C19*2/*2 и CYP2C19*1/*1 – 0,424 и 0,423 соответственно. Было обнаружено статистически достоверное различие по метаболическому отношению (тест Манна – Уитни) между нормальными и быстрыми метаболизаторами (p=0,007), между нормальными и объединенной группой медленных и промежуточных метаболизаторов (p=0,015), а также при множественном сравнении в тесте Крускала – Уоллиса (p=0,007).

Заключение. Таким образом, обнаружена взаимосвязь между генетическими полиморфизмами по CYP2C19 и фенотипированием фермента CYP2C19 по метаболическому отношению (5-гидроксиомепразол/омепразол) в моче. Использование метаболического отношения 5-гидроксиомепразол/омепразол в моче для определения активности CYP2C19 может быть перспективно.

Список литературы

1. Hagymási K., Müllner K., Herszényi L., Tulassay Z. Update on the pharmacogenomics of proton pump inhibitors. Pharmacogenomics. 2011; 12 (6): 873-88.

2. Yang J.C., Lin C.J. CYP2C19 genotypes in the pharmacokinetics / pharmacodynamics of proton pump inhibitor-based therapy of Helicobacter pylori infection. Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. 2010; 6 (1): 29-41.

3. Baldwin R.M., Ohlsson S., Pedersen R.S. et al. Increased omeprazole metabolism in carriers of the CYP2C19*17 allele; a pharmacokinetic study in healthy volunteers. Br J ClinPharmacol. 2008; 65 (5): 767-74.

4. Nevado J.J., Peñalvo G.C., Dorado R.M., Robledo V.R. Simultaneous determination of omeprazole and their main metabolites in human urine samples by capillary electrophoresis using electrospray ionization-mass spectrometry detection. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2014; 92: 211–219.

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНОГО ВАРИАНТА ГЕНА СЕРОТОНИНОВОГО РЕЦЕПТОРА HTR2A (rs6313) С РИСКОМ РАЗВИТИЯ АНТИПСИХОТИК-ИНДУЦИРОВАННЫХ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ: ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОСПЕКТИВНОГО ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Насырова Р.Ф., Сосин Д.Н., Тепляшина В.В., Ершов Е.Е., Иващенко Д.В., Незнанов Н.Г.

ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский психоневрологический институт им. В.М. Бехтерева» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Антипсихотик-индуцированные метаболические нарушения существенно снижают качество жизни пациентов и их приверженность к психофармакотерапии. В настоящее время фармакогенетические исследования используются для оптимизации подбора психофармакотерапии. В нашей стране имеется существенный недостаток проспективных многоцентровых исследований, которые, несомненно, являются методологически более сложными, но вместе с тем дают возможность получить валидные фармакогенетические маркеры с возможностью их внедрения в клиническую практику.

Целью настоящего проспективного обсервационного фармакогенетического исследования является анализ генетической предрасположенности пациентов европеоидной расы, проживающих на территории Северо-Западного региона, к развитию метаболических нарушений при приеме антипсихотиков в режиме монотерапии.

Материалы и методы. Исследование проводилось в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации об этических принципах проведения медицинских исследований с участием людей в качестве субъектов (2000 г.). Для проверки соответствия пациентов критериям включения/невключения был проведен скрининг госпитализированных пациентов в СПб ГБУЗ «Психиатрическая больница №1 им. П.П. Кащенко» (Санкт-Петербург) (главный врач – д-р мед. наук О.В. Лиманкин). В процессе

исследования было скринировано 110 пациентов. В исследование были включены 84 пациента; полностью завершили – 72 человека (из них 12 (16,67%) – женщины и 60 (83,33%) – мужчины). Средний возраст завершивших исследование составил 35,65±5,87 лет. Пациенты, включенные в исследование, были разделены на группы по получаемому антипсихотику: типичный антипсихотик (I генерации) – в режиме монотерапии принимали 37,5% (n=27) пациентов, завершивших проспективное фармакогенетическое исследование, атипичный (II генерации) – 62,5% (n=45).

Наблюдение проводилось за период двух визитов: Визит 1 на момент включения пациента в исследование и Визит 2 через 8-10 недель антипсихотической терапии. 31,2% пациентов получали антипсихотики первой генерации, 68,8% – антипсихотики второй генерации. На каждом Визите оценивались метаболические изменения (индекс массы тела, вес, объем талии и бедра), а также проводилась психометрическая оценка с помощью шкал: PANSS, CGI-S, CGI-I. Средняя продолжительность наблюдения составила 9,3±3,24 недель. Генотипирование осуществлялось с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (Real-TimePCR). Все пациенты были генотипированы по полиморфизму: *HTR2A* (rs6313). Выделение ДНК осуществлялось комплектом реагентов «АмплиПрайм РИБО-преп» фирмы «ИнтерЛабСервис» (Россия). ПЦР-исследование проводилось с использованием наборов реагентов для определения полиморфизмов фирмы «Синтол» (Россия) с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени на приборе RotorGene 6000/Q (QIAGEN, Германия). Статистическая обработка проводилась с помощью статистического пакета программы SPSS 22.0.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета статистических программ SPSS 19.0. Различия считались достоверными при уровне значимости $p<0,05$.

Результаты. Серотониновые рецепторы в настоящее время рассматриваются как перспективные для генотипирования у пациентов, получающих антипсихотики, но тем не менее доказательная база для них не является достаточной. У пациентов в исследовании установлены частоты генотипов по полиморфному варианту серотонинового рецептора *HTR2A* (rs6313): C/C – 6,94% (5); C/T – 61,11% (44); T/T – 31,94% (23) и соответствие закону Харди – Вайнберга очень слабое (p=0,018); частоты аллелей: C – 37% (54); T – 63% (90). Следует подчеркнуть, что, несмотря на несопоставимое распределение (примерно 1:2) пациентов, принимавших антипсихотик I или II генераций, результаты предварительного проспективного исследования зарегистрировали в 2-х группах одинаковую долю обследованных ($p>0,05$), изменивших массу тела на 7% и более при приеме антипсихотика: 9 (33,33%) и 14 (31,11%). Далее все пациенты независимо от принимаемого антипсихотика были разделены на 2 группы: I группа – пациенты, у которых за время проспективного исследования было зарегистрировано при приеме антипсихотика изменение массы тела 7% и более от исходной величины, и II группа – пациенты, у которых за время проспективного исследования было зарегистрировано при приеме антипсихотика изменение массы тела менее 7%.

При генотипировании пациентов с антипсихотик-индуцированным набором веса и без такового выявлена ассоциация полиморфизма гена серотонинового рецептора *HTR2A* (rs6313) с развитием метаболических нарушений при приеме антипсихотиков ($p<0,05$). У пациентов без антипсихотик-индуцированного изменения массы тела частоты генотипов распределились следующим образом: C/T – 82,61% (19); T/T – 17,39% (4); генотипа C/C в данной группе идентифицировано не было. У пациентов с набором веса при приеме антипсихотиков данное распределение было таковым: T/T – 57,14% (28); C/T – 28,57% (14); C/C – 14,29% (7). При этом можно сделать вывод о протективной значимости аллели C, соответственно аллель T *HTR2A* (rs6313) является предиспонирующей (OR=0,71; CI=0,136-0,998; $p<0,05$) в отношении развития антипсихотик-индуцированных метаболических нарушений.

В соответствии с задачами исследования было изучено распределение генотипов *HTR2A* (rs6313) в популяции пациентов с психическими расстройствами шизофренического спектра, соответственно, нуждающихся в длительном приеме антипсихотиков, европеоидной расы, проживающих на территории Северо-Западного региона. На настоящий момент прогенотипировано 174 образца ДНК пациентов по изучаемому полиморфному варианту гена фармакодинамического фактора. По полиморфному варианту серотонинового рецептора *HTR2A* (rs6313) установлены частоты генотипов в популяции пациентов, страдающих расстройствами шизофренического спектра: C/C – 33,33% (58); C/T – 50,00% (87); T/T – 16,67% (29) и равновесие Харди – Вайнберга не соблюдено (p=0,036); частоты аллелей: C – 58% (203); T – 42% (145).

Выводы. Полученные предварительные результаты популяционного и проспективного обсервационного когортного фармакогенетического исследования антипсихотик-индуцированных метаболических нарушений у пациентов, постоянно проживающих в Северо-Западном регионе Российской Федерации, расширяют фундаментальные знания в области фармакогенетики антипсихотиков относительно влияния полиморфизма изучаемого гена на риск развития антипсихотик-индуцированных метаболических нарушений. Увеличение выборки позволит повысить значимость полученных предварительных результатов в отношении ассоциации изучаемого кандидатного гена с метаболическими нарушениями при приеме антипсихотиков. Продолжение исследования и расширение панели генов-кандидатов позволит выявить генетические предикторы метаболических нарушений у больных с психическими расстройствами, принимающих антипсихотики, что позволит разработать фармакогенетические методы оптимизации психофармакотерапии.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – докторов наук (МД-7471.2016.7).

ИЗУЧЕНИЕ АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНА CYP2C9 С ПАРАМЕТРАМИ БЕЗОПАСНОСТИ ФЕНАЗЕПАМА У ПАЦИЕНТОВ С НЕОСЛОЖНЕННЫМ СИНДРОМОМ ОТМЕНЫ АЛКОГОЛЯ

Иващенко Д.В.[1,2], Рыжикова К.А.[1], Созаева Ж.А.[1], Агузаров А.Д.[2], Матис О.А.[2], Галактионова Т.Е.[2], Денисов Ю.В.[2], Петросян Ю.Е.[2], Гришина Е.А.[1], Савченко Л.М.[1,2], Брюн Е.А.[1,2], Сычев Д.А.[1]

[1] ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава РФ, Москва, Россия

[2] ГБУЗ «Московский научно-практический центр наркологии» ДЗМ, Москва, Россия

Введение. Феназепам – транквилизатор из группы бензодиазепинов, широко применяемый при различных расстройствах в психиатрии, неврологии, наркологии. При купировании синдрома отмены алкоголя (СОА) феназепам часто применяется в качестве основного психотропного препарата. В настоящее время не изучен вклад генетических факторов в безопасность феназепама.

Цель. Изучить ассоциации полиморфных вариантов гена *CYP2C9* на показатели безопасности терапии феназепамом у больных с синдромом отмены алкоголя (СОА).

Материал и методы. В исследование включено 73 пациента с неосложненным СОА. Состояние участников оценивалось дважды: в первые 24 часа после госпитализации и на 6-е сутки лечения. Во время наблюдения больные получали детоксикационную терапию и феназепам в средней суточной дозе 6,33+/-2,1 мг. Оценка безопасности проводилась на 6-й день при помощи шкалы оценки выраженности побочных эффектов UKU Scale. От пациентов было получено 5 мл венозной крови, из которой была выделена ДНК. Детекция полиморфных вариантов *CYP2C9*2* (rs1057910, C>T, генотипы: CT+TT) и *CYP2C9*3* (rs1799853, A>C, генотипы: AC+CC) проводилась при помощи метода ПЦР в реальном времени.

Результаты. Аллель *CYP2C9*2* была выявлена у 16 (21,9%) пациентов, аллель CYP2C9*3 – у 10 (13,6%) пациентов. Сравнение каждой группы с гомозиготами «дикого» типа установило, что носители *CYP2C9*3* отличались более высоким общим баллом шкалы UKU (12,3±5,1 vs 8,3±6,0; p=0,053). Носители аллели *CYP2C9*2* чаще отмечали такие побочные эффекты, как нарушения аккомодации глаз (12,6% vs 10,5%; p=0,032). У носителей аллели *CYP2C9*3* значимо чаще выявлялись снижение настроения (60% vs 27%; p=0,026), эмоциональное безразличие (10% vs 1,6%; p=0,038), гиперсаливация (20% vs 1,6%; p=0,001), запор (20% vs 0%; p=0,002), ортостатическое головокружение (30% v 14,2%; p=0,042), тахикардия (30% vs 6,2%; p=0,003).

Заключение. Нами установлены значимые ассоциации полиморфных вариантов *CYP2C9* с показателями безопасности терапии феназепамом у больных с неосложненным СОА. Наличие аллелей *CYP2C9*2* и *CYP2C9*3* было связано с большей частотой побочных эффектов получаемой терапии.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНДИВИДУАЛЬНОГО ТИПА БИОТРАНСФОРМАЦИИ ИЗОНИАЗИДА У БОЛЬНЫХ С ВПЕРВЫЕ ВЫЯВЛЕННЫМ ТУБЕРКУЛЁЗОМ ЛЁГКИХ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Галкина К.Ю., Иванова Д.А., Иванушкина Т.Н., Носова Е.Ю., Краснова М.А., Хахалина А.А., Исакова А.И., Сафонова С.Г.

ГБУЗ «Московский научно-практический центр борьбы с туберкулёзом» ДЗМ, Москва, Россия

Введение. Изониазид является основным препаратом при лечении туберкулеза. Возникновение токсических реакций на фоне приёма данного препарата связывают с наличием мутаций в таких генах человека, как NAT2 (C481T, G590A, G857A) и CYP 2E1 (c1/c1).

Цель исследования. Определение типа ацетилирования у больных с впервые выявленным туберкулезом с помощью молекулярно-генетических тестов.

Задачи исследования:

1. Определить доли быстрых и медленных ацетиляторов среди взрослых в изучаемой выборке пациентов;

2. Определить взаимосвязь развития токсического гепатита с наличием конкретного сочетания мутаций;

3. Определить частоту возникновения побочных реакций на фоне приема изониазида у быстрых и медленных ацетиляторов.

Материал и методы исследования. Исследовали 120 проб ДНК человека, выделенных из венозной крови и слюны, полученных от 120 больных, находящихся на лечении в клиниках №№1 и 2 и филиалах МНПЦ борьбы с туберкулезом.

Экстракцию ДНК осуществляли с помощью систем «М-Сорб-Туб-Автомат» (ООО «Синтол», Россия) для автоматического выделения ДНК на роботизированной станции Freedom EVO (TECAN, Швейцария) и «М-Сорб» (ООО «Синтол», Россия).

Для выявления мутаций в генах NAT2 (C481T, G590A, G857A) и CYP2E1 (c1/c1) использовали молекулярные тесты «ПФ-БИОЧИП» (ООО «БИОЧИП ИМБ», Россия) и ПЦР в реальном времени ООО «Синтол» (Россия).

Данные генетических исследований сравнивали с биохимическими показателями крови (уровень аланин- и аспартатаминотрансферазы до и через два месяца после начала приёма изониазида). Также обращали внимание на наличие сопутствующих заболеваний, таких как ВИЧ-инфекция, гепатит В и С, сахарный диабет и вредных привычек (употребление алкоголя и курение).

Результаты исследования. Из 120 пациентов 53 (44%) человека были медленными ацетиляторами и 67 (56%) – быстрыми. Генотипы распределились следующим образом. Среди 67 быстрых ацетиляторов 21 (31%) были гомозиготами, и обе аллели гена NAT2 не содержали мутации. Остальные 46 (69%) были гетерозиготами, у которых одна аллель не содержала мутации, а другая содержала либо замену C481T – тип S1/N (n=24), либо G590A – тип S2/N (n=20), либо G857A – тип S3/N (n=2). Ген CYP2E1 содержал мутацию у 5 больных, причем у двоих из них ген NAT2 был в гомозиготном состоянии, а у троих – в гетерозиготном (один с генотипом S2/N и двое – с генотипом S1/N).

Среди 53 медленных ацетиляторов сочетания мутаций были следующими: у 25 (47%) пациентов обе аллели гена NAT2 содержали замену C481T – тип S1/ S1, у 5 (9%) обе аллели гена NAT2 содержали замену G590A – тип S2/S2, у 19 (36%) наблюдалось сочетание замен C481T и G590A – тип S1/S2, у двоих (4%) – сочетание замен C481T и G857A – тип S1/S3 и у двоих (4%) – G590A и G857A – тип S2/S3. Ген CYP2E1 содержал мутацию у 4 больных (один с генотипом NAT2 S1/S1, один с генотипом S1/S3 и двое – с генотипом S1/S2).

В целом строгой взаимосвязи развития токсического гепатита с наличием конкретного сочетания мутаций не выявлено, а имел значение именно тип ацетилирования (быстрый или медленный).

Токсический гепатит развился у 30 из 53 пациентов с медленным типом ацетилирования (57% случаев). У одного больного при приёме изониазида повышения аминотрансфераз не наблюдалось, но препарат был отменен из-за сильных головных болей у пациента. У остальных 23 больных с медленным типом ацетилирования непереносимости изониазида не наблюдалось.

Среди 67 больных с быстрым генотипом ацетилирования непереносимость изониазида наблюдалась в 11 случаях (16,4%). Причём у одного из таких больных был гепатит С, один из пациентов выкуривал 20-30 сигарет в день и один помимо курения (до 20 сигарет в день) до поступления в стационар злоупотреблял алкоголем. Ранее доказано, что наличие вирусных гепатитов и вредных привычек является негативными факторами, ведущими к возникновению побочных реакций при приеме таких препаратов, как изониазид. В остальных случаях развитие токсического гепатита может быть обусловлено наличием мутаций в других генах, например, таких как GSTT, GSTM, MDR1.

Таким образом, риск развития осложнений на фоне приема изониазида у пациентов с медленным генотипом ацетилирования возрастает в 2,96 раза.

Заключение. Результаты проведенного исследования показали, что применение генетических тестов является обоснованным и может помочь назначить пациенту адекватный режим химиотерапии с учетом его индивидуальных особенностей метаболизма в короткие сроки.

Выводы:

1. Доли быстрых и медленных ацетиляторов среди взрослых в изученной выборке составили 56 и 44% соответственно.

2. Чёткой взаимосвязи развития токсического гепатита с наличием конкретного сочетания мутаций не выявлено, а имеет значение именно тип ацетилирования (быстрый или медленный).

3. Токсический гепатит развился у 57% больных с медленным типом ацетилирования.

4. В группе больных с быстрым типом ацетилирования развитие токсического гепатита наблюдалось у 11 пациентов (16,4%).

5. Риск развития осложнений на фоне приема изониазида у пациентов с медленным типом ацетилирования возрастает в 2,96 раза.

6. Применение генетических тестов является обоснованным и может помочь назначить пациенту адекватный режим химиотерапии с учетом его индивидуальных особенностей метаболизма.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА CTLA-4 (+49A>G) – ПРЕДИКТОР РАННЕГО НАЗНАЧЕНИЯ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ У БОЛЬНЫХ РАННИМ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ, НЕ ОТВЕЧАЮЩИХ НА ТЕРАПИЮ МЕТОТРЕКСАТОМ

Гусева И.А.[1], Лучихина Е.Л.[1], Абрамов Д.Д.[3], Сорока Н.Е.[2], Демидова Н.В.[1], Александрова Е.Н.[1], Новиков А.А.[1], Самаркина Е.Ю.[1], Трофимов Д.Ю.[2], Каратеев Д.Е.[1], Насонов Е.Л.[1]

[1] ФГБНУ «НИИР им. В.А. Насоновой», Москва, Россия

[2] ООО «НПФ ДНК-Технология», Москва, Россия

[3] Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» ФМБА России

Введение. Один из основных базисных противовоспалительных препаратов (БПВП) – метотрексат (МТ) – является «золотым стандартом» терапии ревматоидного артрита (РА). Однако лечение МТ не всегда бывает эффективным согласно критериям EULAR (European League Against Rheumatism). Широкое внедрение терапии генно-инженерными биологическими препаратами (ГИБП) обусловило прогресс в фармакотерапии РА, особенно на ранних его стадиях. В соответствии с принципами «Treat to Target» (лечение до достижения цели, т.е. ремиссии), при недостаточном ответе на МТ рекомендуется быстрое переключение с монотерапии МТ на комбинированную терапию МТ+ГИБП (как правило, вначале назначается ингибитор TNF-α). Такая стратегия особенно эффективна у больных с ранним активным РА.

Цель. Изучить, асссоциированы ли полиморфизмы генов иммунного ответа и фолатного обмена с назначени-

ем, особенно ранним, ГИБП в связи с неэффективностью монотерапии МТ.

Материалы и методы. Молекулярно-генетическое исследование было проведено в двух группах больных РА.

Первая группа включала 121 больного из программы «РАДИКАЛ» (**Р**анний **А**ртрит: **Д**иагностика, **И**сход, **К**ритерии, **А**ктивное **л**ечение) с длительностью заболевания 5,0 [3,0; 9,0] мес., hs-СРБ 9,3 [3,0; 21,4] мг/л, с позитивностью по антителам к циклическим цитруллинированным пептидам (АЦЦП) в 61,2% случаев. Все пациенты получали МТ с эскалацией дозы до 20-25 мг/нед. При необходимости добавляли другие БПВП. При неэффективности БПВП больным был назначен ГИБП. Больные проспективно наблюдались в течение 4-х лет. Исследование выполнено до 2012 г.

Вторая группа включала больных РА из проспективного исследования «РЕМАРКА» (**Р**оссийское иссл**Е**дование **М**етотрекс**А**та и биологических препаратов при **Р**аннем а**К**тивном **А**ртрите) с длительностью заболевания 7,0 [4,0; 11,5] мес., hs-СРБ 27,0 [9,7; 61,0] мг/л, с позитивностью по АЦЦП в 96,0% случаев. Всем пациентам первоначально был назначен МТ с быстрой эскалацией дозы до 20-25 мг/нед. При неэффективности назначали комбинированную терапию МТ+ГИБП. Каждые 3 месяца эффективность терапии контролировали по индексам DAS28, SDAI, CDAI. Ретроспективно в генетическое исследование включены первые 45 пациентов с известной тактикой лечения.

Генотипирование полиморфизмов генов *PTPN22* (+1858 C >T, rs2476601)*, TNFAIP3* (rs6920220, rs10499194)*, CTLA-4* (+49A>G, rs231775), *TNFA* (-308A>G, rs1800629), *IL-6* (-174G>C, rs1800795)*, IL-6R* (+358A>C, rs8192284)*, IL-10* (-592A>C, rs1800872, -1082 A>G, rs1800896), *MCP-1 / CCL2* (+2518A>G, rs1024611), *MTHFR (+677C/T,* rs1801133, *+1298A/C,* rs1801131) выполнено методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ, PCR-RT) с использованием оригинальных сиквенс-специфических праймеров и проб, меченных различными флюоресцентными метками (НПФ «ДНК-Технология»). Автоматическая регистрация и интерпретация полученных результатов проводились на отечественном инновационном детектирующем амплификаторе ДТ-96 (ООО «ДНК-Технология»). Генотипирование проводилось согласно инструкции фирмы-изготовителя наборов. При проверке работоспособности созданных тест-систем в качестве референсного метода определения генотипа образцов использовали автоматическое секвенирование ДНК по Сэнгеру с применением автоматического секвенатора ABI PRISM®310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Высокоразрешающее генотипирование аллелей гена *HLA-DRB1* осуществлено на автоматическом секвенаторе 3130I Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

При статистической обработке материала для оценки информативности исследованных генетических полиморфизмов в качестве предикторов эффективности терапии был использован метод бинарной логистической регрессии с вычислением отношения шансов с 95% доверительными интервалами (OR [95% CI]). Ответ, основанный на динамике индекса DAS28, был представлен двумя бинарными переменными: «неудовлетворительный ответ» и «хороший ответ».

Результаты. В первой группе («РАДИКАЛ») через 4 года проспективного наблюдения 14 из 121 пациента получали ГИБП в связи с неэффективностью БПВП. Из всех изученных полиморфизмов только *CTLA-4* (+49A>G) был выявлен в качестве предиктора назначения биологической терапии (OR=6,1 [95% CI 1,4-26,2], p=0,01). ГИБП чаще получали пациенты с генотипом GG по сравнению с пациентами с генотипами AA/AG (5/14, 28,6% и 9/107, 8,4% соответственно).

Во второй группе («РЕМАРКА») через 3 месяца монотерапии МТ 23 из 45 (51,1%) пациентов имели хороший ответ и продолжили монотерапию МТ. У 22 пациентов (48,9%) был выявлен неудовлетворительный ответ на МТ, и этим пациентам был добавлен ГИБП (МТ+ГИБП). Носителям по крайней мере одной аллели G (AG/GG) ГИБП был назначен чаще, чем носителям гомозиготного генотипа AA (20/22, 90,9% и 13/23, 56,5%, соответственно), OR=7,7 [95% CI 1,4-40,9], p=0,017). Кроме того, через 3 месяца монотерапии МТ полиморфизм *CTLA-4* (+49A>G) (генотипы AG/GG vs AA соответственно) был ассоциирован с индексами активности DAS28 (3,6±1,1 and 4,6±1,6, p=0,04), SDAI (11,1±7,2 and 20,2±12,1, p=0,018), CDAI (10,6±7,1 and 18,6±10,6 , p=0,025), числом болезненных суставов (3,1±3,1 and 7,1±5,1, p=0,016), числом припухших суставов (2,7±2,5 and 5,3±4,9 p=0,024) и hs-CRP (6,3±12,1 and 21,8 ±37,1 p=0,018).

Заключение. Проведенное исследование позволило установить, что полиморфизм гена *CTLA4* ассоциирован с более тяжелым РА и может служить предиктором раннего назначения ГИБП у больных с ранним активным РА.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ В ПРАКТИКЕ ЭПИЛЕПТОЛОГА

Якунина А.В., Повереннова И.Е., Вельдяксова Е.Д.

ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Самара, Россия

Противоэпилептическая терапия сопряжена с длительностью приема, нередко использованием высоких суточных дозировок и политерапией. Максимальный терапевтический эффект достигается при поддержании в крови стабильной равновесной концентрации противоэпилептического препарата (ПЭП) в пределах референсного коридора. Превышение верхней границы значений может приводить к возникновению нежелательных явлений, а снижение концентрации ПЭП ниже нижней границы – к потере эффек-

тивности препарата. На уровень ПЭП в крови могут влиять индивидуальные генетически-детерминированные особенности метаболизма человека. Клинической значимостью в метаболизме ВК обладает ген *CYP2C9*, у которого имеются несколько аллельных вариантов. Нормальным «диким» вариантом этого гена считается *CYP2C9*1*, фермент которого осуществляет полноценную метаболизацию лекарственного препарата. С медленной метаболизацией ВК ассоциированы аллельные варианты *CYP2C9*2* (с.430 *C>T*; однонуклеотидная замена цитозина на тимин в положении 430) и *CYP2C9*3* (с.1075 *A>C*; однонуклеотидная замена аденина на цитозин в положении 1075).

Цель исследования. Изучить клиническую целесообразность использования фармакогенетического тестирования гена *CYP2C9* при назначении вальпроевой кислоты.

Материалы и методы. В исследование было включено 23 больных эпилепсией, получающих ВК. Методами исследования являлись: клинико-анамнестический с оценкой эффективности лечения и нежелательных явлений, оценка суточных доз ВК, молекулярно-генетическое исследование полиморфных аллельных *CYP2C9,* терапевтический лекарственный мониторинг (ТЛМ). Всем пациентам было проведено определение Cmin (остаточной концентрации ВК) до приема очередной разовой дозы. Референтные значения концентрации вальпроевой кислоты в плазме составляют 50-100 мкг/мл.

Результаты. Фармакогенетическое тестирование гена *CYP2C9* показало, что среди них гомозиготное носительство полиморфного «дикого», без мутации аллельного варианта *CYP2C9*1/*1* (нормальный метаболизатор ВК) было у 14 пациентов, четверо оказались гетерозиготными носителями аллельного варианта *CYP2C9*1/*2* (медленный метаболизатор ВК), у пятерых пациентов диагностирован гетерозиготный полиморфный аллельный вариант *CYP2C9*1/*3* (медленный метаболизатор ВК). Совокупный анализ результатов ТЛМ и фармакогенетического тестирования представлен в таблице. Показательно, что референтные (нормальные) значения ВК в плазме крови достигаются у носителей различных аллельных вариантов гена *CYP2C9* при приеме различных доз ВК. При приеме рекомендованных инструкцией среднетерапевтических дозировок ВК (около 20 мг/кг) у «нормальных» метаболизаторов ВК (генотип *CYP2C9*1/*1)* плазменная концентрация ВК Cmin находилась в пределах референтных значений, у «медленных» метаболизаторов ВК (генотипы *CYP2C9*1/*2* и *CYP2C9*1/*3)* – превышала верхнюю границу референтного коридора, находясь в токсическом диапазоне. Допустимыми среднетерапевтическими дозировками ВК согласно результатам показателей плазменной концентрации были более низкие суточные дозы, чем рекомендуемые общепопуляционные.

Таблица. Зависимость показателей метаболизма ВК от генотипа *CYP2C9*

Средняя суточная дозировка ВК, принимаемая пациентами, сопряженная с результатами ТЛМ	Генотип *CYP2C9*		
	*CYP2C9*1/*1* *n=14*	*CYP2C9*1/*2* *n=4*	*CYP2C9*1/*3* *n=5*
Дозировка ВК, дающая референтные (нормальные) значения Cmin в плазме крови	19,7 мг/кг	15,2 мг/кг	14,7 мг/кг
Дозировка ВК, дающая значения Cmin в плазме крови ниже референтных	15,6 мг/кг	-	-
Дозировка ВК, дающая значения Cmin в плазме крови выше референтных	26,4 мг/кг	18,5 мг/кг	19,1 мг/кг

У пациентов – медленных метаболизаторов чаще, чем в группе нормальных метаболизаторов, возникали нежелательные явления при приеме ВК. Рациональная коррекция принимаемых дозировок позволяла купировать нежелательные явления.

Выводы. Таким образом, фармакогенетическое тестирование является реальным инструментом персонализированного назначения препаратов ВК у больных эпилепсией. Генотипирование аллельных вариантов *CYP2C9* позволяет прогнозировать метаболизм лекарственного препарата и подбирать индивидуальные дозировки и режим назначения для достижения максимального эффекта без нежелательных явлений. ТЛМ, в свою очередь, позволяет контролировать индивидуальную оптимальность лечения препаратами ВК.

Список литературы

1. Дмитренко Д.В., Шнайдер Н.А., Егорова А.Т., Бочанова Е.Н., Веселова О.Ф., Кантимирова Е.А., Садыкова А.В., Шаповалова Е.А. Эпилепсия и беременность. Москва: Медика; 2014. 144 с.

2. Журавлева М.В., Кукес В.Г., Прокофьев А.Б., Архипов В.В., Олефир Ю.В., Сереброва С.Ю., Соколов А.В., Сычев Д.А.. Эффективность и безопасность применения лекарственных средств: значение и возможности клинической фармакологии. Клиническая фармакология. 2015; 2: 20-24.

3. Шнайдер Н.А., Дмитренко Д.В., Говорина Ю.Б., Муравьева А.В., Котловский Ю.В., Бочанова Е.Н., Фатеева Е.А., Дедюк Н.А., Мустафаева А.В. Влияние полиморфизмов гена CYP2C9 на уровень вальпроевой кислоты в крови у женщин репродуктивного возраста с эпилепсией. Фармакогенетика и фармакогеномика. 2015; 2: 24-28.

4. Ghodke-Puranik Y., Thorn C.F., Lamba J.K. et al. Valproic acid pathway: pharmacokinetics and pharmacodynamics. Pharmacogenetics and genomics. 2013; 23 (4): 236-41.

ЧАСТОТА НОСИТЕЛЬСТВА CYP2C9*2 И CYP2C9*3 СРЕДИ БОЛЬНЫХ ЭПИЛЕПСИЕЙ В ВОСТОЧНОЙ И СЕВЕРО-ВОСТОЧНОЙ СИБИРИ

Шнайдер Н.А.[1], Дмитренко Д.В.[1], Бочанова Е.Н.[1], Николаева Т.Я.[2]

[1]ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, Красноярск, Россия

[2]ФГОАУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова», Якутск, Республика Саха (Якутия), Россия

Введение. Изофермент 2С9 цитохрома Р450 принимает достаточно активное участие в процессах окисления антиконвульсантов в печени, влияет на развитие дозозависимых нежелательных лекарственных явлений. Носительство полиморфизмов *CYP2C9*2* и *CYP2C9*3* гена *CYP2C9*, кодирующего данный фермент, требует снижения дозировки или отмены ряда антиконвульсантов. Генетически детерминированные межиндивидуальные различия по этому показателю позволяют выделить группы индивидуумов, различающихся по активности изофермента 2С9. Молекулярная диагностика носительства полиморфизмов гена *CYP2C9* весьма актуальна в различных регионах нашей страны, где проживают различные этнические группы населения.

Цель исследования. Изучить частоту носительства однонуклеотидных полиморфизмов *CYP2C9*2* и *CYP2C9*3* среди детей и подростков, больных эпилепсией, в Восточной и Северо-Восточной Сибири.

Материалы и методы. Исследование проведено в рамках комплексных исследований по теме: «Эпидемиологические, генетические и нейрофизиологические аспекты заболеваний нервной системы (центральной, периферической и вегетативной) и превентивная медицина» (гос. рег. 0120.0807480). Исследование одобрено Локальным этическим комитетом КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого. В исследование включены 159 человек: 1-я группа – 41 русский, проживающий на территории Красноярского края; 2-я группа – 64 тувинца, проживающего на территории Республики Тыва; 3-я группа – 54 якута, проживающего на территории Республики Саха (Якутия). Включение пациентов в исследование осуществлялось после подписания добровольного информированного согласия официального представителя ребенка. Молекулярно-генетическое исследование проводилось методом ПЦР в режиме реального времени с использованием образцов олигонуклеотидных меченных флюорофором агентов (технология TaqMan, «Rotor-Gene 6000», Corbet Life Science, Австралия). Проведено исследование ОНП гена *CYP2C9* на хромосоме 10q24.1-24.3: аллельный вариант «дикого» типа *CYP2C9*1*; полиморфный аллельный вариант *CYP2C9*2 (R144C, c.430 C>T)*; полиморфный аллельный вариант *CYP2C9*3 (I359L, c.1075 A>C)*. ПЦР-исследование проводилось на базе Межкафедральной лаборатории медицинской генетики и Центральной научно-исследовательской лаборатории КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого. Генотипы были определены в зависимости от наличия или отсутствия продукта амплификации с использованием двух ДНК-зондов (в 2 направлениях полиморфизма *CYP2C9*), каждый из которых содержал флуоресцентный знак и супрессоры флуоресценции. Наличие того или иного изучаемого полиморфизма (*CYP2C9*2* или *CYP2C9*3*) определялось наличием флуоресценции в амплифицированной смеси. Отрицательный контроль был включен в каждом эксперименте, где матрица ДНК для ПЦР была заменена на дистиллированную воду. Описательная статистика для качественных учетных признаков представлена в виде процентных долей. Для проверки гипотезы о равенстве долей использовали критерий $\chi 2$ с процедурой попарного сравнения (Мараскуило). Статистическая обработка результатов проводилась с помощью пакетов прикладных программы ExcelSTAT.

Результаты и обсуждение. В результате статистической обработки полученных данных нами показано, что гомозиготный генотип *CYP2C9*1/*1* доминировал во всех группах. При этом статистически значимо чаще встречался у якутов (88,9%) и тувинцев (81,5%) в сравнении с русскими (65,0%). Гетерозиготные генотипы *CYP2C9*1/*2* и *CYP2C9*1/*3* статистически значимо преобладали в группе русских (18,0% и 15,0% соответственно) в сравнении с якутами (7,4% и 3,7% соответственно) и тувинцами (6,0% и 12,5% соответственно). Гомозиготное носительство аллели *CYP2C9*2* выявлено только в группе русских с процентным соотношением 2,5%, а гомозиготное носительство мутантной аллели *CYP2C9*3* не зарегистрировано ни в одной из этнических групп. Компаунд-гетерозигота (генотип *CYP2C9*2/*3*) встречалась только среди русских с частотой 2,5%.

Частота носительства *CYP2C9*1/*2* (18,0%) среди русских детей и подростков с эпилепсией, проживающих на территории Красноярского края, превышает таковую в целом по России (11,1–14,3%) и в странах Европы (15,7%), но сопоставима с аналогичными данными в Турции (18,04%) и Италии (16,8%). Частота встречаемости генотипа *CYP2C9*1/*3* (15,0%) сопоставима с данными, полученными в странах Европы (15%) и в Италии (14,5%), но превышает показатели в целом по России (6,6–11,9%). Частота носительства компаунд-гетерозигот *CYP2C9*2/*3* (2,5%) сопоставима с таковой в Италии (2,0%) и Узбекистане (3,3%).

В якутской этнической группе частота носительства гетерозиготного генотипа *CYP2C9*1/*2* (7,4%) сопоставима с данными в среднем по России (7,4%), но вдвое меньше, чем в европейской части России (11,1–14,3%) и Европе (15,7%), при этом вдвое превышает показатели по эвенкийской и чукотской этническим группам (3%) и Узбекистану (3,3%). Гетерозиготный генотип *CYP2C9*1/*3* (3,7%) наиболее близок по частоте носительства к японской этнической группе (1,7–5,0%), но значительно ниже частоты в целом по России (6,6–11,9%), Европе (15,0%), Корее (12,0%), Китаю (6,0%), а также среди народов Крайнего Севера России (эвенкийская и чукотская этнические группы – 7,0% и 9,0% соответственно). Отсутствие гомози-

готных носителей полиморфизмов *CYP2C9*2* и *CYP2C9*3* в исследуемых этнических группах Восточной и Северо-Восточной Сибири среди детей и подростков с эпилепсией сопоставимо с полученными данными в Корее, Китае и Узбекистане.

Частота носительства гетерозиготного генотипа *CYP2C9*1/*3* среди тувинской этнической группы (12,5%) близка к общероссийской (11,9%) и корейской (12,0%) популяциям, но превышает таковую в якутской (3,7%), эвенкийской (7,0%) и чукотской (9,0%) этнических группах. По частоте встречаемости гетерозиготного генотипа *CYP2C9*1/*2* (6,0%) полученные нами данные занимают промежуточное положение между показателями по европейской части России (14,3%), странам Европы (15,7%) и народам Крайнего Севера России (3,0%) и Узбекистана (3,3%).

Выводы. Этнические особенности по частоте носительства *CYP2C9*2* и *CYP2C9*3*, ассоциированных с замедлением метаболизма антиконвульсантов, в регионах Восточной и Северо-Восточной Сибири (Красноярском крае, Республике Тыва и Республике Саха (Якутия)) можно объяснить генетическим дрейфом, естественным отбором, адаптацией популяции к местным условиям окружающей среды. Основными причинами низкой распространенности *CYP2C9*2* и *CYP2C9*3* в якутской этнической группе являются относительная транспортная изолированность региона, формирование региональных генетических изолятов. Полученные результаты позволяют говорить о том, что дозирование антиконвульсантов у детей и подростков необходимо осуществлять с позиции персонализированной медицины и с учетом этнического аспекта. Например, назначение вальпроатов, дифенина и др. с печеночным путем метаболизма с участием изофермента *CYP2C9* в русской этнической группе больных одного из крупнейших регионов РФ (Красноярского края) необходимо осуществлять наиболее взвешенно и осторожно, с учетом большей частоты встречаемости «медленных» метаболизаторов.

ИМЕННОЙ УКАЗАТЕЛЬ

А

Agafonov A.P. – 290
Alexander Swidsinski – 348
Andreieva S.V. – 129
Bodnev S.A. – 290
Dedkov V.G. – 290
Francesca Ceccherini-Silberstein – 86
Gerlich W.H. – 87
Gert Bellen – 394
Gilbert GG Donders – 394
Glebe D. – 63,86
Kateryna Ruban – 394
Korets K.V. – 129
Maleev V.V. – 290
Pedro Vieira-Baptista – 394
Pyankov O.V. – 290
Ruzhinskay E.E. – 129
Safonova M.V. – 290
Shipulin G.A. – 290
Svitrigaile Grinceviciene – 394
Tallo T. – 40
Zupanič Pajnič I. – 410
Абакушин Д.Н. – 136,166
Абакушина Е.В. – 136,166
Абдуллаев А.О. – 176,181
Абдулхакимов А.Р. – 474
Абдурахманова Н.Н. – 145,161
Абдурашитов М.А. – 183
Абдухамедов Н.А. – 458
Абрамов Д.Д. – 216,526
Абрамович А.В. – 311
Аванесова Р.С. – 313
Аветисян Л.Р. – 250
Агафонова Е.Ю. – 337
Агеева М.Р. – 212,237
Агузаров А.Д. – 525
Адельшин Р.В. – 505
Адян Т.А. – 426
Ажикина Т.Л. – 180
Азаренко Г.Н. – 162
Азнабаев М.Т. – 441
Айтхожина Н.А. – 516
Акимова С.В. – 211
Акишев А.Г. – 183
Аксенова Л.Ю. – 289
Акулич И.С. – 408
Аланазарова Б.Р. – 147
Алаторцева Г.И. – 43
Алатырев А.Г. – 171
Александрова Е.Н. – 526
Александрова Н.М. – 298,493
Александрова Н.А. – 499
Алексеева Е.А. – 146
Алексеенко В.В. – 343
Аленова А.Х. – 509
Алимов А.В. – 485,486
Алсалих Н.Д. – 81
Алтухов И.А. – 511
Альварес Фигероа М.В – 475,490,495,498,499,500,501, 502,504,510
Альхова Ж.В. – 310,315
Алябьева Н.М. – 241,243
Амзаева Е.Ю. – 381
Амосова И.В. – 244
Андосова Л.Д. – 91,116
Андреев А.А. – 274
Андреев Д.А. – 520
Андреева Н.В. – 398
Андреева С.А. – 232
Андреева Ю.Ю. – 188
Андреевская С.Н. – 510
Андрей Тулупов – 438
Андриевская И.Ю. – 510
Андрющенко С.В. – 269
Анисенко А.Н. – 134
Анисимов А.П. – 316,335,342
Анисимова Н.С. – 362
Антипин Д.А. – 377
Антипова О.В. – 47
Антипушина Д.Н. – 211
Антонов А.С. – 295
Антонова О.В. – 496
Апалько С.В. – 442
Арнаудова К.Ш. – 513
Арсеньева Т.Е. – 342
Арсланбаева Л.Р. – 496
Арсланова Л.В. – 229
Артебякин С.В. – 218
Архангельская И.В. – 341
Асадуллина О.А. – 229,262
Асия Шорина – 438
Ассесорова Ю.Ю. – 147
Астахова Е.М. – 454,477
Асцатурова О.Р. – 386,406
Аубакирова М.Б. – 516
Афанасьев М.В. – 46
Афанасьева В.С. – 247
Афанасьева О.И. – 247
Ахмедова Г.М. – 492
Ахметова В.Л. – 427

Б

Бабаханова Н.Н. – 147
Бабенко О.В. – 146
Бабушкина Н.П. – 53
Багдалова Ф.А. – 390
Бадлеева М.В. – 505,514
Баженов А.И. – 62
Бажукова Т.А. – 399
Базарова Г.Х. – 299
Базарова М.В. – 396
Базыкин Г.А. – 293
Балась А.Н. – 113
Балахонов С.В. – 299,315,323,324,332
Балахонцева Л.А. – 52,450

Баранов В.С. – 442
Баранова А.В. – 132
Баранова М.П. – 130
Баранова С.В. – 446
Барановская И.Л. – 227
Барбитов Ю.А. – 442
Барило В.Н. – 504
Бархатова О.И. – 210,211
Барыкин В.И. – 222
Барышева Н.Н. – 119,388
Басов Е.А. – 323,324
Батурин В.А. – 518
Бачалдин С.Л. – 400
Башнина Е.Б. – 442
Баязитова Л.Т. – 249
Баязутдинова Г.М. – 437
Бездверная Н.А. – 446
Безяева Г.П. – 111,115
Беленикин М.С. – 62
Белобородова Е.В. – 53
Белова А.В. – 386,406
Белогрудов В.А. – 313
Белогрудова Е.И. – 313
Белопольская М.А. – 55,398
Белоусова К.В. – 512
Белоусова Л.В. – 215
Белых С.И. – 449
Белькова Н.Л. – 261,332,505
Беляндинов М.Р. – 201
Бендус И.В. – 488
Бениаминов А.Д. – 157
Берденникова В.В. – 408
Бердюгина О.В. – 148,494
Березкина И.С. – 198
Бермишева М.А. – 153,427
Берсенева О.С. – 442
Бескоровайная Т.С. – 440
Беспятых Ю.А. – 511
Биканов Р.А. – 430
Бикбов М.М. – 435
Бисенбай А.О. – 516
Благодатских К.А. – 302
Благодатских С.А. – 309,335
Благодатских С.А. – 309,335
Близнец Е.А. – 428,434
Блинникова А.Ю. – 285
Бобкова М.Р. – 448
Бобоев К.Т. – 145,161,174,182206,431
Боброва О.П. – 519
Бобрышев Д.В. – 518
Бобылев А.А. – 256
Богомолова О.А. – 265
Богословская Е.В. – 466,469,484
Богун А.Г. – 309,335
Бодунова Н.А. – 151
Болотина Е.С. – 377,379,381
Болтунова О.В. – 270
Болтунова О.С. – 371
Большунова Е.А. – 253
Бондарева В.П. – 235
Бондарь А.А. – 192
Боравлёва Е.Ю. – 219,322
Борисов Н.М. – 130,134
Борисов С.Е. – 496
Бородина Т.Н. – 331
Ботвинкин А.Д. – 50
Бочалгин Н.О. – 323
Бочанова Е.Н. – 521,529
Брага Э.А. – 195
Бредер В.В. – 132
Брезгин С.А. – 48,54,63,65
Бровкина О.И. – 150
Бруснигина Н.Ф. – 119,388
Брюн Е.А. – 525
Буданова А.А. – 315
Будиловская О.В. – 360
Буздин А.А. – 130,134
Бузицкая Ж.В. – 234,244
Букаева А.А. – 425
Буланенко В.П. – 237
Булатова К.В. – 44,56,70
Бунева В.Н. – 446
Бурганова А.Н. – 262
Бургасова О.А. – 77
Бурденый А.М. – 195
Бурнатова Е.Н. – 218
Бурханов Р.А. – 285
Бурцева Е.И. – 216,233
Бутакова А.Е. – 452
Бутвиловская В.И. – 201
Бутенко И.О. – 511
Бутина Т.Ю. – 482
Быков Ю.Н. – 408
Быстрова Т.Н. – 47,66
Быченкова Т.А. – 432

В

Вагайцева К.В. – 411
Вайтович М.А. – 215
Валдохина А.В. – 223,237,498
Валиев Р.Р. – 427
Валиулин И.Р. – 270
Валишин Д.А. – 229,262
Ванушко В.Э. – 144
Вартанян Р.В. – 233
Василиева О.В. – 296
Васильев Е.В. – 159,162,181
Васильева В.А. – 39
Васильева Е.А. – 302,308
Васильева О.А. – 198
Васильева О.В. – 283
Васильева Т.А. – 434,439
Васин А.В. – 227
Вахрушева Д.В. – 512
Вашукова С.С. – 398
Вельдяксова Е.Д. – 527
Венгеров Ю.Я. – 223,240
Вербов В.Н. – 74
Веремейчик В.М. – 422
Веркина Л.М. – 300

Вершинина М.Г. – 231
Веселова О.А. – 267,273
Ветрова Н.В. – 430
Вехова Е.В. – 444
Викторова Н.А. – 208
Винчковская Е.Е. – 270,371
Витрив С.В. – 515
Витязева С.А. – 299
Владимирова Л.Ю. – 138
Владимирова Н.Б. – 93
Владыко А.С. – 78
Власов А.В. – 313
Власов В.В. – 180,192
Власов Е.В. – 476,477
Власова М.А. – 400
Водолажский Д.И. – 137,138,425
Водопьянов А.С. – 294,300,304,308,318,341
Водопьянов С.О. – 294,300,304,318,331
Волкова В.М. – 77
Волкодав А.А. – 403
Волова Л.Ю. – 451
Волох О.А. – 306
Волынкина А.С. – 283,301,303
Воробьева Д.А. – 259
Воронова Е.А. – 89,350
Воронцова Г.А. – 452
Воропаев В.В. – 289
Воротников И.В. – 195
Ворошилина Е.С. – 93,355
Воскресенская А.А. – 439
Вязовая А.А. – 492,495,501,515
Вялых И.В. – 218

Г

Гайнетдинов И.В. – 180
Гайфуллин Н.М. – 130
Галактионова Т.Е. – 525
Галанина Е. – 438
Галиева А.Т. – 262
Галиуллин Н.И. – 49
Галич Е.А. – 449
Галкина К.Ю. – 525
Гамбарян А.С. – 219,322
Гапонова Т.В. – 39
Гаража А.В. – 130,134
Гаращенко Н.Е. – 50
Гарина Е.О. – 216,233
Гарипова Э.З. – 436
Гасич Е.Л. – 67,82,85,100,101,456,457,472
Гашникова М.П. – 454,476,477
Гашникова Н.М. – 454,476,477
Геворкян Ю.А. – 265,425
Гельм Ю.В. – 166
Герасимов В.В. – 49
Герасимова А.А. – 492
Герасимова Н.А. – 351
Гилязова И.Р. – 161
Гинтер Е.К. – 434
Гинцбург А.Л. – 250
Гладких А.С. – 323,324,332
Глазко И.И. – 382
Глазкова Д.В. – 466,469,484
Глотов А.С. – 442
Глотов О.С. – 442
Глускер А.А. – 130
Гнусарева О.А. – 330
Говорун В.М. – 511
Головачёва Е.Г. – 247
Головешкина Е.Н. – 358,362,365,366
Головюк А.В. – 128
Голуб Е.В. – 189,205
Голубева Л.А. – 494
Гомберг М.А. – 358
Гончаревская З.Л. – 120
Гончарова И.А. – 53
Гончарова Н.И. – 221,23
Гончарова С.А. – 210
Гоптарь И.А. – 223,469
Горбенко А.С. – 181
Гордеев А.В. – 250
Гордеева С.А. – 256
Гордиев М.Г. – 150
Гордиенко И.В. – 235
Горелов А.В. – 222,259
Горина Л.Г. – 210
Городин В.Н. – 60
Горохов В.В. – 451
Горская О.А. – 478
Грезина Л.А. – 451
Грибкова Н.В. – 239,257,346
Грибовская Н.В. – 225
Григорьева Л.Н. – 452
Григорьева М.В. – 201
Григорьева Т.Д. – 398
Григорьева Ю.В. – 218
Григорьева Я.Е. – 396
Грицаев С.В. – 193
Гришина Е.А. – 522,525
Громов К.Б. – 448,455
Грядунов Д.А. – 361,496
Гудымо А.С. – 448
Гусев О.А. – 150
Гусева А.Н. – 263,267,273
Гусева И.А. – 526
Гусева Н.П. – 246,287,315,328
Гуськова Н.К. – 356
Гутковская Е.А. – 154
Гущин А.Е. – 348,352,353,357,358,362,364,365,366,368,369,372,373,374,375,378

Д

Давидович Е.С. – 183
Дадалова О.Б. – 225
Двинских Н.Ю. – 194
Девяткин А.В. – 396
Дегтярев С.Х. – 183
Дедков В.Г. – 499
Дементьева Е.А. – 361
Дементьева Н.Е. – 55
Демидова Н.В. – 526

Демидчик Ю.Е. – 203
Демкин В.В. – 390
Демчук Н.С. – 485,486
Денисенко Н.П. – 522
Денисов Ю.В. – 525
Денисова Е.В. – 107,371,394
Дентовская С.В. – 316
Дербугов Д.Н. – 126
Дерябин Д.Г. – 361,385
Деулина М.О. – 108,109
Дехнич Н.Н. – 256
Джардемалиева Н.Ж. – 125,349
Джемилева Л.У. – 435,436
Джиоев Ю.П. – 50
Дианова Т.В. – 94,95
Дитковская Л.В. – 442
Дмитренко Д.В. – 521,529
Дмитриев А.А. – 157,187
Дмитрюкова М.Ю. – 96,99,108,109,123
Добродеев А.Ю. – 192
Докшина И.А. – 188
Долгова Е.А. – 475,495
Долгушин С.А. – 446
Домонова Э.А. – 222,403,404,475
Донская М.А. – 214
Доценко В.В. – 43
Дрижун Ю.С. – 193
Дрозд А.М. – 456,457
Дроздова Ю.В. – 227
Дроков М.Ю. – 39
Дружков М.О. – 150
Дубинина Т.А. – 442
Дубков Н.А. – 78
Дубняк Д.С. – 39
Дубровина И.А. – 253
Дуванова Е.А. – 102
Дудина К.Р. – 55
Дунаева Е.А. – 155,158
Дурасова А.Л. – 279
Дурыманов А.Г. – 230
Дутова А.А. – 79
Духанина Н.С. – 390
Дюкина Т.В. – 381
Дятлов И.А. – 288

Е

Евдокимов А.А. – 183
Евсеенко В.А. – 221
Евстигнеева Н.П. – 351
Егиазарян Л.А. – 300
Егорова А.А. – 244
Егорова Е.А. – 279
Егорова М.А. – 227
Егорова С.А. – 266
Ежова М.И. – 341
Елекова Е.Ю. – 107,270
Елизарова И.А. – 493
Елькина М.А. – 215,217,237,256,259
Енаева М.В. – 117
Еникеев Р.Ф. – 150
Епанчинцева А.В. – 230
Епифанова Н.В. – 264,278
Ергучева И.Д. – 276
Еремеева Н.И. – 512
Еременко Е.И. – 289
Еремин В.Ф. – 67,82,85,100,101,456,457,472
Ерёмина Г.А. – 60
Ерошенко Г.А. – 306,315,328
Ершов Е.Е. – 523
Ершов Ф.И. – 232
Есаулкова А.Ю. – 279
Есютина Е.И. – 381
Ефимова И.Ю. – 425
Ефремов Г.Д. – 201

Ж

Жалейко З.П. – 251,275,280
Жданова С.Н. – 505,507,514
Жевелюк Е.А. – 128
Желенина Л.А. – 442
Желонкина Н.В. – 126
Животова В.А. – 223
Жидкеева Р.Е. – 516
Жикривецкая С.О. – 430
Жинжило Т.А. – 201,207
Жолдыбаева Е.В. – 509
Жуженко И.А. – 138
Жук А.А. – 394
Жукова О.В. – 378
Журавлев В.Ю. – 492,495,511
Журенкова О.Б. – 396

З

Завалишина Л.Э. – 188
Завьялов А.А. – 192
Загидуллина А.Ш. – 436
Заднепровская Н.В. – 371
Заднова С.П. – 320
Зайдуллин И.С. – 436
Зайцев А.А. – 211,311
Зайцева Е.В. – 268
Зайцева Н.Н. – 467,482
Закамова Е.В. – 131
Заклязьминская Е.В. – 425
Залетаев Д.В. – 146,165,170,175,188
Замулаева И.А. – 111,115
Заплатников А.Л. – 403
Запорожченко И.А. – 180
Зарецкий А.Р. – 128,144
Зарипова А.З. – 249
Заруцкая Г.Н. – 390
Захаренков И.А. – 256
Зверев В.В. – 43,264,276,278
Земскова Е.Ю. – 412
Зенин И.В. – 225
Зенинская Н.А. – 288
Зима А.П. – 225
Зименков Д.В. – 496
Зимина А.В. – 79
Зимина В.Н. – 490
Зинич Л.С. – 196,318

Зинченко Р.А. – 434,439
Злобин В.И. – 50
Знойко О.О. – 55
Зоркальцева Е.Ю. – 507,514
Зорников Д.Л. – 355
Зотина Е.Н. – 188
Зубкова А.Д. – 446
Зуева А.Г. – 108,109
Зуева А.П. – 48,54,63,65,72,73
Зыкова Т.А. – 265,356
Зырянов С.К. – 519
Зырянова Д.П. – 477

И

Ибрагимова Г.Р. – 392,393
Ибрагимова М.К. – 167
Иванов И.Н. – 413,421
Иванов М.В. – 132
Иванов М.К. – 480
Иванов П.Л. – 412
Иванов С.А. – 316
Иванов А.М. – 208
Иванова Д.А. – 525
Иванова Н.В. – 390
Иванова Т.И. – 135
Иванушкина Т.Н. – 525
Иванчик Н.В. – 245,256
Ивахнишина Н.М. – 400
Иващенко Д.В. – 523,525
Иващенко Т.Э. – 442
Ивлев В.В. – 454,476,477
Игнатова К.Ю. – 93
Игнатьева М.Е. – 83
Игнашкин М.А. – 416
Измайлов А.А. – 161
Икрамов О.А. – 161
Ильин А.А. – 126
Ильина Е.Н. – 511
Ильичева Т.Н. – 230
Ирина Сергеева – 438
Исаев П.А. – 126
Исаева А.В. – 198
Исаева Г.Ш. – 249
Исаева Е.И. – 232
Исаева Н.В. – 275
Исаева О.В. – 59,60,80,83
Исакова А.И. – 496,525
Исмагулова Г.А. – 516
Исматова Л. – 454

К

Кабанов С.Н. – 138
Кадникова Л.А. – 309,335
Кадырова О.Ю. – 485,486
Кадышев В.В. – 439
Казаева Е.В. – 476
Казакбаева Х.М. – 182
Казакова Е.С. – 329
Казакова Л.А. – 270,371,394
Казакова С.А. – 165
Казанцева П.В. – 167
Казеннова Е.В. – 448
Казубская Т.П. – 195
Калабанова Е.А. – 138
Калашникова Н.А. – 264
Калинин А.В. – 311,330
Калинин Д.В. – 126,128,129
Калинина О.В. – 55,74
Калугина Е.Ю. – 231
Каменева О.А. – 106
Канивец И.В. – 428
Капицкая К.Ю. – 180
Каприн А.Д. – 166
Капустин С.И. – 193
Карандашова И.В. – 40,42,44,56,57,64,70,72,73,75,77
Карань Л.С. – 75,396
Каратеев Д.Е. – 526
Каримов С.С. – 454,458
Каримов Х.Я. – 145,161,174,182,206,431
Карлсен А.А. – 40,59,60,83
Карпов А.Б. – 183
Карпушкина А.В. – 442
Касницкая Т.Н. – 78
Касоян К.Т. – 198
Касымов О.Т. – 43
Касьян Ж.А. – 310,329
Касьян И.А. – 329
Катосова Л.К. – 241
Кафтырева Л.А. – 266
Качко В.А. – 144
Кашина И.Ю. – 174,186
Кашинцев К.Ю. – 130,134
Кашников А.Ю. – 264
Кекеева Т.В. – 170,188,207
Керимов Р.А. – 170,175
Керус Е.В. – 193
Ким Д.Г. – 358
Ким С.С. – 259
Кипень В.Н. – 139,140,141,142,143,420
Киреев Д.Е. – 447,448,455,459,460,462,463,464,465,488
Киреев М.Н. – 306
Киреева Е.В. – 253
Кирилина Е.С. – 89
Кириченко А.А. – 462
Кирьянов С.А. – 62,151,171,199
Киселева В.И. – 111,115
Киселева И.В. – 253,254
Кисина В.И. – 362,378
Кисличкина А.А. – 335
Киссель А.В. – 208
Кит О.И. – 265
Кичатова В.С. – 59,80,83
Клавдиенко Е.В. – 287
Климашевская С.Н. – 74
Климентова Е.А. – 161
Климова Е.А. – 55
Клотченко С.А. – 227
Клушкина В.В. – 83
Книжник Т.А. – 60
Кобяков А.И. – 215
Ковалев Д.А. – 296,303

Коваленко В.В. – 110
Коваленко К.А. – 90
Кодиров Б.А. – 474
Кожанова Т.В. – 83
Кожарская О.В. – 400
Козина А.Н. – 55
Козлов Р.С. – 211,243,256
Козлова В.М. – 146,197
Козлова Ю.О. – 439
Козырь А.В. – 288
Кол Н.В. – 416
Колбасеева О.В. – 50
Колесников А.В. – 288
Колесников Е.Н. – 137
Колесникова Е.А. – 119
Колесникова И.О. – 84
Колобухина Л.В. – 216
Колодяжная Л.В. – 232
Колосова Н.П. – 221,230
Колпаков А.В. – 207
Колюбаева С.Н. – 208
Комарова С.В. – 42
Комарова Ю.В. – 94
Комбарова Т.И. – 309,335
Комиссаров А.Б. – 234
Кондратьева Е.И. – 250
Кондратьева Т.Т. – 197
Конова З.В. – 39
Конова М.В. – 194
Коновалова К.А. – 215
Коновалова Н.В. – 302
Коноплева М.В. – 62
Конторщикова К.Н. – 91
Конторщикова Л.Д. – 116
Копейкина Н.И. – 381
Копылов П.Х. – 309,316,342
Корзун В.М. – 299
Корниенко И.В. – 413,421
Королева Е.Г. – 247
Королева И.С. – 223,225
Королева М.А. – 223,225
Королева О.М. – 39
Короткова А.Ф. – 270,394
Корытко Т.Е. – 442
Кострома И.И. – 193
Костюк С.А. – 203
Костюнин К.Ю. – 505
Костюшев Д.С. – 48,54,63,64,65
Косякова К.Г. – 106
Кот Л.А. – 311
Котенев Е.С. – 283,301,311
Котенева Е.А. – 289,311,314,330
Котова В.О. – 52,45
Котова С.А. – 422
Кочмарева Г.Ю. – 159,162
Кошечкин С.И. – 390
Кощеев М.Е. – 505,507,514
Кравцова О.В. – 261
Кравцова Т.А. – 498,502,504
Кравченко А.В. – 108,109,470,483
Красильникова Е.А. – 316
Красноборова С.Ю. – 512
Краснов Г.С. – 126,128,129,157,187
Краснов Я.М. – 246,306,310,315,337,339
Краснова И.А. – 381
Краснова М.А. – 525
Краснослободцев К.Г. – 216,233
Красовский С.А. – 250
Краус О.А. – 215
Кретова Е.Ю. – 164
Кретова И.А. – 113
Кривенцова А.А. – 429
Кривенцова Н.В. – 429
Крикунова Л.И. – 111,115,135
Крицкий А.А. – 320
Кругликов В.Д. – 341
Круглова Е.А. – 479
Кружкова И.С. – 233
Крупнова Э.В. – 206
Крутикова Е.В. – 253,254
Крылова Л.Ю. – 496
Крылова Н.А. – 210
Крынская И.А. – 439
Крысанова А.А. – 348
Крюков А.В. – 520
Крюкова М.Г. – 188
Кубанова А.А. – 385
Кудрявцева А.В. – 126,128,129,157,187
Куевда Д.А. – 97,121
Куземцева С.В. – 215
Кузнецов В.В. – 183
Кузнецов Д.Ю. – 427
Кузнецова А.В. – 452
Кузнецова Д.А. – 302
Кузнецова Е.Б. – 165,170,175
Кузнецова И.В. – 482
Кузнецова Н.А. – 284
Кузьмина Л.А. – 39
Куимова У.А. – 470,483
Куклин Е.С. – 93
Кулагин В.В. – 488
Кулагина Е.В. – 496
Кулешов К.В. – 223,263,268,270,296,375
Кулешова О.Б. – 121
Куличенко А.Н. – 289,296,301,303,340
Куличенко Т.В. – 241
Культин А.Ю. – 418
Кунсбаева Г.Б. – 161
Куралех Н.С. – 381
Курочкина Д.Е. – 267,273
Кутырев В.В. – 299,306,315,328,339
Кухтина Н.Б. – 231
Кушлинский Н.Е. – 207
Кюрегян К.К. – 43,59,60,68,81,83

Л

Лага В.Ю. – 455
Лазарева А.В. – 243
Лактионов К.К. – 132
Лактионов П.П. – 180,192

Лапо Т.П. – 239,257,346
Лаповок И.А. – 448,460,463
Латыпов Р.Р. – 92
Лебедев П.В. – 488
Лебедева Е.Б. – 64
Лебедева Л.А. – 251,275,280
Лебедева М.С. – 256
Лебедева Н.Н. – 117
Лебедева С.А. – 308,342
Лебедева Ю.А. – 121
Леви Д.Т. – 495,499
Левина И.А. – 113
Левина Т.А. – 151,199
Левченко Д.А. – 341
Легостаев В.М. – 265
Леденева М.Л. – 292,319
Лейнсоо А.Т. – 361
Лексикова Т.В. – 446
Лемасова Л.В. – 319
Лешкина Г.В. – 103,104,122,123
Липатников А.Д. – 48,63,65
Липатова Л.А. – 215
Липова Е.В. – 382
Лисицкая Я.В. – 283,301
Литвяков Н.В. – 167,170
Личная Е.В. – 74
Лобанова Н.Н. – 442
Лобашова Г.П. – 498,501,502,504
Лобов С.Л. – 435,436
Логинов В.И. – 195
Лойфман Е.А. – 452
Ломакина Н.Ф. – 219,322
Лопатухин А.Э. – 448,464,465
Лоскутников М.А. – 520
Луданный Р.И. – 498,499,501,502,504
Лукашев А.Н. – 60
Лухверчик Л.Н. – 43
Лучихина Е.Л. – 526
Лысенкова М.Ю. – 222
Львов Н.И. – 212,244
Любина Л.В. – 111,115
Лядов В.К. – 188
Ляпина Е.С. – 515
Ляшова О.Ю. – 310

М

Маджидова Е.Н. – 431
Мазуренко Н.Н. – 164
Майновская О.А. – 174,186
Майская Н.В. – 309,335
Макаов А.Х.-М. – 434
Макарова М.А. – 266
Макарова М.В. – 496
Макарова Н.Г. – 398
Максимов С.Л. – 490
Максимова С.С. – 72,73,76
Максютов Р.А. – 221
Малахаева А.Н. – 328,336
Малеев В.В. – 396
Маленов М.Т. – 396
Маливанова Т.Ф. – 164
Маликова Н.Н. – 161,206
Малинина С.В. – 258
Малинникова Е.Ю. – 68,83
Малов И.В. – 50
Малов С.И. – 50
Малыгина О.Г. – 399
Малышев Б.С. – 183
Мальцева Э.Р. – 516
Мальчиков И.А. – 218
Мамон А.П. – 229
Мамонова Н.А. – 64
Мандзяк Т.В. – 261
Мануйлов В.А. – 40,80
Маньковская С.В. – 190
Марахонов А.В. – 439
Маркарян А.Ю. – 218
Маркелов М.Л. – 223,469,499
Марков А.В. – 53
Марковский А.В. – 168,169
Марченко В.Ю. – 221,230
Марьин М.А. – 288
Маслов А.А. – 137
Маслов Д.А. – 510
Матис О.А. – 525
Матосова С.В. – 240
Махамедов Б. – 396
Махова М.А. – 119,388
Махова Т.И. – 357,362,364,365
Машкина Е.В. – 90
Маянский Н.А. – 241,243
Медведев В.С. – 189
Медведева Е. – 276
Медетханова Ф.Г. – 390
Мелёхина Е.В. – 222
Мельникова Н. – 157,511
Мельникова Н.В. – 157
Мельнов С.Б. – 139,140,141,142,143
Мескина Е.Р. – 276
Метелин А.В. – 425
Миктадова А.В. – 90
Микулович Ю.Л. – 502,504
Милейко В.А. – 132
Милихина А.В. – 241
Милованова И.И. – 488
Миловидова Т.Б. – 440
Мингажева Э.Т. – 173,177
Минкина Г.Н. – 104
Мирджамалова Ф.О. – 476
Миронов К.О. – 155,158,223,225,240
Миронова Л.В. – 323,324,332
Миронович О.Л. – 426
Миташок И.С. – 138
Михайленко Д.С. – 201,207
Михайлов Е.П. – 299
Михайлов И.А. – 176
Михайлов М.И. – 43,59,60,68,81,83
Михайлова Г.Ф. – 189,205
Михайлова И.А. – 274
Михайлова С.М. – 197

Михайлова Ю.В. – 47
Михалёв М.А. – 159,162
Михаленко Е.П. – 206
Михальцова Е.Д. – 39
Михеев В.Н. – 221,230
Мишин Е.С. – 413,421
Мкртчян Л.С. – 111,115,135
Мозеров С.А. – 194
Моисеева Т.И. – 233
Мокроусов И.В. – 491,492,501,515,516
Монахова Е.В. – 325
Моренец Т.М. – 60
Морозкин Е.С. – 180
Морозова О.А. – 90
Морозова О.В. – 232,278
Морозова С.Е. – 106
Морозова Т.И. – 509
Москвитина Э.А. – 331
Мохаммад А.Д. – 161
Музыка А.Д. – 222
Мукашева Е.А. – 216,233
Мунасыпов Ф.Р. – 202
Муранкина В.Р. – 476,477
Мурзабаева Р.Т. – 229
Мурзабулатова И.Х. – 229,262
Мурзакова А.В. – 448,455,459,462,464,465,488
Мусаева Т.Д. – 234,248
Мусатов Д.В. – 400
Мустафаев Х.М. – 92
Мустафина Л.К. – 147
Мухина Т.Н. – 309
Мысливцева Г.А. – 235
Мякошина Л.А. – 208
Мясищева Е.А. – 468

Н

Набирова Д.А. – 516
Навбатникова Е.В. – 390
Нагибина М.В. – 223,240
Нагимова Ф.И. – 49
Наговицина А.С. – 188
Наговицына Е.Б. – 400
Назарова Е.Л. – 188
Назарова С.В. – 403
Назырова Е.А. – 229
Найденова Е.В. – 327
Найзабаева Д.А. – 516
Нарвская О.В. – 492
Насекина Е.А. – 403
Насонов Е.Л. – 526
Насхлеташвили Д.Р. – 130
Насырова Р.Ф. – 523
Наталья Лемская – 438
Науменко Н.С. – 386,406
Неверов А.Д. – 42,293
Невинский Г.А. – 446
Незнанов Н.Г. – 523
Немира А.С. – 82
Немировченко В.С. – 165
Немцова М.В. – 196,201,207
Немченко У.М. – 261
Неродо Г.А. – 356
Нестеренко В.Г. – 62
Нестеренко Л.Н. – 43
Нестерова О.Ю. – 176
Нетесов С.В. – 40,80
Нетесова Н.А. – 183
Никитин А.Г. – 150
Никитина С.Г. – 72,73
Никитюк Н.Ф. – 336
Никифорович П.А. – 106
Николаева П.А. – 181
Николаева Т.Н. – 102
Николаева Т.Я. – 529
Никонов А.П. – 386,406
Никонова А.А. – 276
Никонова А.Н. – 398
Никонорова И.В. – 89,350
Новиков А.А. – 526
Новиков Н.Ю. – 194
Новикова Е.Н. – 381
Новикова Н.А. – 264,278
Новицкий В.В. – 198
Новожилов В.А. – 408
Новоселов А.В. – 485,486
Номоконова В.Б. – 169
Носик М.Н. – 465,470,483
Носов Н.Ю. – 306,328
Носова Е.Ю. – 496,525
Нургалиева А.Х. – 202
Нурляминова З. – 454
Нурматов З.Ш. – 43
Нурматов А.З. – 43

О

Образцова Е.В. – 247
Образцова О.А. – 361
Обухова В.Г. – 400
Оводова Ю.В. – 117
Огарков О.Б. – 505,507,514
Одинцова Е.С. – 446
Олейников И.П. – 294,300,304,318
Оленев А.С. – 442
Ольнева Т.А. – 268,270,271
Ольховский И.А. – 155,158,159,162,181
Олюнина Е.А. – 102
Омариева Э.Я. – 241
Омельченко Д.О. – 466,469,484
Омонова У.Т. – 431
Ооржак Н.Д. – 83
Орадова А.Ш. – 41,42,125,349,396
Орлов Е.Н. – 429
Орлова К.А. – 119,388
Осадчая М.Г. – 162
Осидак Л.В. – 247
Осин А.В. – 310
Осин Н.С. – 432
Осина Н.А. – 246,310,327,329,334
Оспельникова Т.П. – 232
Останкова Ю.В. – 40,69

Осташкин А.С. – 164
Островская Н.А. – 285
Островская О.В. – 400
Остяк А.С. – 299

П

Павлов А.Е. – 416
Павлов В.Н. – 161
Пак И.В. – 231
Панарина Л.В. – 111,115
Пандырева О.Н. – 384
Паносян С.Р. – 403
Паньков А.П. – 485,486
Парамонов А.И. – 50
Паркина Н.В. – 213,271
Паровичникова Е.Н. – 39
Парфенова О.В. – 467,49
Пасашкова Ю.А. – 285
Пасечник О.А. – 515
Пасова И.А. – 166
Пашкевич А.М. – 200
Пекшева О.Ю. – 467
Пепеляева А.В. – 107
Перелыгина И.В. – 468
Перепечина И.О. – 415
Перетокина И.В. – 496
Петренко Е.В. – 343
Петрин А.Н. – 434
Петрина Н.Е. – 434
Петров В.В. – 447,463
Петрова Н.В. – 434,439
Петрова Н.П. – 361
Петровская И.В. – 235
Петросян Ю.Е. – 525
Петруша О.А. – 276
Петухова Е.В. – 213,222
Пехов В.М. – 416
Печковский Г.А. – 311,330
Пидченко Н.Н. – 296,318
Пильщикова Н.С. – 416
Пименов Н.Н. – 42
Пимкина Е.В. – 223
Писанов Р.В. – 294,325
Писарева М.М. – 76,234,248
Писаренко С.В. – 296,301,303
Пичурина Н.Л. – 331
Платонов А.Е. – 223,225,240
Платонов В.В. – 442
Платонов М.Е. – 335
Платонова Н.М. – 144
Плеханова Н.Г. – 292,319
Плотко Е.Э. – 93,355
Плотникова М.А. – 227
Плотникова О.И. – 449
Плотникова Ю.К. – 479
Повереннова И.Е. – 527
Погодина А.В. – 261
Поддубная И.В. – 188
Поддубская Е.В. – 130,170,175
Подзолкова Н.М. – 403
Подколзин А.Т. – 270
Подчуфарова Д.Е. – 117
Поздеева Н.А. – 439
Позднякова А.С. – 495
Поздышев Д.В. – 469,484
Покровский А.В. – 128
Полев Д.Е. – 442
Полунина Т.А. – 287
Полуэктова М.В. – 135
Полькин В.В. – 189
Поляк М.Е. – 425
Поляков А.В. – 426,428,434,437,440
Поляков А.П. – 106
Поляков А.С. – 208
Поляков В.С. – 218
Полякова И.В. – 442
Полянина А.В. – 47,66
Полянская М.А. – 442
Помелова В.Г. – 432
Померанцева Е.А. – 430
Поморгайло Е.Г. – 179
Пономарева А.А. – 180,192
Пономарева А.С. – 323,324,332
Пономарева О.А. – 479
Пономаренко А.А. – 186
Попа А.В. – 165
Попов С.А. – 498,502,504
Попова А.А. – 108,109,110
Попова А.Ю. – 339
Попова И.Л. – 138
Попова Н.Н. – 39
Попович Ю.С. – 214
Порсохонова Д.Ф. – 392,393
Портенко С.А. – 246
Портнягина У.С. – 256
Поспехова Н.И. – 174,186,197
Поступайло В.Б. – 336
Потемкин И.А. – 60,81
Прадед М.Н. – 258
Прасолова М.А. – 480
Предеус А.В. – 442
Прилипов А.Г. – 219,322
Припутневич Т.В. – 250
Присяжнюк Е.Н. – 275
Прокопенко А.В. – 490,495,500
Прокофьева Д.С. – 173,177
Пронин А.Ю. – 117
Пронина И.В. – 195
Проскокова Т.Н. – 437
Прохоренко Т.С. – 198
Пудова Е.А. – 126,187
Пузырев В.П. – 53
Пунченко О.Е. – 106
Путков С.Б. – 211
Пчелкина Е.В. – 285

Р

Рагимов А.А. – 201
Ракин А.В. – 308
Раков А.В. – 284

Раковская И.В. – 210,211,375
Ракчеева О.В. – 222
Расулов У.М. – 474
Расулов Ф.Х. – 474
Рачина С.А. – 256
Ревизор А.О. – 479
Резник В.И. – 251,275,280
Резниченко Н.А. – 234
Рентеева А.Н. – 217,237
Роговская С.И. – 120
Рогожина Ю.А. – 426
Рождественский Е.Н. – 299
Рожнова С.Ш. – 263
Романенко В.В. – 83
Романов А.В. – 211
Романова И.В. – 378
Романова Л.В. – 331
Романова О.В. – 442
Романова Т.Ю. – 39
Романюк Т.Н. – 96,99,103,104,108,109,121,122,123
Рубина А.Ю. – 201
Рубцов В.А. – 179
Рудая Я.А. – 235
Руденко В.В. – 165,170,175
Руденко Л.Г. – 253,254
Руденкова Т.В. – 203
Руднева Н.С. – 353,365,367,389
Румянцев С.А. – 130,134
Румянцева В.А. – 426
Румянцева Т.А. – 365,372,373,374,375
Рыбаков Е.Г. – 186
Рыжиков А.Б. – 221,230
Рыжикова К.А. – 520,522,525
Рыжов К.А. – 483
Рыкова Е.Ю. – 180,192
Рыковская О.А. – 345
Рыманова И.В. – 483
Рычкова Л.В. – 261
Рябко А.К. – 288
Рябова А.В. – 520
Рябухин И.В. – 218
Рябченко Н.И. – 135
Рябчиков Д.А. – 195
Ряднинская Н.В. – 439
Рязанова А.Г. – 289,340

С

Саакян С.В. – 146
Саблина В.Н. – 381
Савватеева Е.Н. – 201
Савельев В.Н. – 283,296
Савельева И.В. – 296
Савельева О.Н. – 436
Савилов Е.Д. – 514
Савинова Т.А. – 243
Савичева А.М. – 348,360,368,401
Савосина Л.В. – 251,275,280
Савочкина Ю.А. – 368,502,504
Савченко А.П. – 331
Савченко В.Г. – 39
Савченко Л.М. – 525
Савченко С.С. – 292,295,319
Сагакянц М.М. – 345
Садова Н.В. – 403
Садритдинова А.Ф. – 187
Садыкова Г.К. – 219,322
Сайбурхонов Д.С. – 454
Сайбурхонов С.С. – 458
Сайфуллин М.А. – 396
Сакаева Д.Д. – 150,173,177
Сакалкина Е.В. – 271
Салимов Э.Л. – 201
Салимова Н.А. – 508
Салина Т.Ю. – 509
Самаркина Е.Ю. – 526
Самерханов И.И. – 298
Самусенко И.А. – 274
Сандырева Т.П. – 463
Санникова Л.Б. – 485,486
Сапаргалиева А.Д. – 125,349
Сапиева Ж.А. – 516
Саприна Т.В. – 198
Сараев К.Н. – 90
Сароянц Л.В. – 513
Сафина К.Р. – 293
Сафонова А.П. – 475
Сафонова С.Г. – 496,525
Сафронов В.А. – 339
Сашина Т.А. – 264,278
Саяпина Л.В. – 336
Свердлова Е.С. – 94,95
Свиридова А.А. – 471
Свитина С.П. – 193
Святченко С.В. – 221
Северская Н.В. – 126
Седых С.Е. – 446
Селезнева Т.С. – 215
Сельчук В.Ю. – 195
Семененко Т.А. – 62
Семенков А.В. – 425
Семенов А.В. – 40,69
Семенов С.И. – 72,73,76
Семижон П.А. – 78
Семин Д.Ю. – 126
Семячкина А.Н. – 426
Сеничкина А.М. – 334
Серебрякова Е.А. – 442
Серков И.Л. – 117
Серова Е.А. – 159
Сивец Н.В. – 239,257,346
Сивков А.В. – 201
Сигин В.О. – 170
Сидоров А.В. – 43
Сидоров Д.В. – 201
Сидорова Ж.Ю. – 193
Сизова Ж.М. – 522
Сизова Т.В. – 469
Сильвейстрова О.Ю. – 222
Симакова А.И. – 225
Симирский В.В. – 203

Симирский В.Н. – 63
Симонова О.А. – 175
Синицына О.В. – 110
Синцова К.С. – 248
Синьков В.В. – 46,505,507
Ситник Т.Н. – 214
Сиянова Е.А. – 250
Скачкова Т.С. – 403,404
Скворцова Т.Э. – 180
Скиба Ю.А. – 516
Скляр И.В. – 72,73,75
Скобло Л.Е. – 119,388
Славнова Е.Н. – 106,133
Слепцова С.С. – 72,73,76
Слонимская Е.М. – 167
Смелянская М.Г. – 162
Сметанникова Н.А. – 183
Смирнов В.В. – 522
Смирнов С.Ю. – 200
Смирнова В.С. – 240,403,404
Смирнова Н.И. – 320,337
Смирнова Т.Г. – 510
Смирнова Т.Ю. – 240
Смольник Н.С. – 142,143
Смоляницкая А.И. – 417
Смоляницкий А.Г. – 417
Снежкина А.В. – 126,128,129,187
Снежко Т.А. – 138
Снытков Е.В. – 139,140,141,420
Соболева Н.В. – 59,80,83
Созаева Ж.А. – 525
Соков Д.Г. – 130,134
Соколов Ю.В. – 476
Соколова И.Н. – 197
Соколова М.В. – 62
Сола К. – 509
Солдаткина Н.В. – 425
Солдатова И.А. – 240
Соловьев С.Ю. – 46
Соловьева Н.С. – 492
Соломенцев В.И. – 309,335
Соломка В.С. – 385
Солонин С.А. – 60
Сорока Н.Е. – 526
Сорокин М.И. – 130,134
Сосин Д.Н. – 523
Сосинович С.В. – 67,85,100,101,456,457,472
Сочивко Д.Г. – 302
Спичак Т.В. – 259
Степаненко Л.А. – 50
Степанов А.В. – 329
Степанов В.А. – 411,423
Степанов О.А. – 128
Страмбовская Н.Н. – 79,168,169
Стрельников В.В. – 132,146,165,170,175,188,197,207
Стринкевич Э.А. – 239
Стуколова О.А. – 396
Субботина Т.Н. – 155,158,159,162,181
Субоч Е.И. – 200
Судариков А.Б. – 176,181
Судоплатова Е.В. – 350
Сулейменов Е.М. – 113
Султанов И.Р. – 161
Султанова Ш.Х. – 182
Сунцова М.В. – 130,134
Сурганова В.И. – 351
Суслов А.П. – 62
Суслопаров И.М. – 221,23
Суханова Л.Н. – 365
Счеслёнок Е.П. – 78
Сысолетина И.П. – 452
Сычев Д.А. – 81,520,522,525
Сыченкова Н.И. – 135

Т

Тагирова З.Г. – 271
Танас А.С. – 146,165,170,175,188
Тарасенко Н.В. – 53
Тарлыков П.В. – 509
Татимов М.З. – 137
Тахирова З.Р. – 153
Темирлиева Р.О. – 285
Тепляшина В.В. – 523
Теребнева Л.А. – 120
Тимофеева Т.А. – 322
Тимошенко Т.В. – 412
Тимошина О.Ю. – 368,502,504
Тимошичева Т.А. – 244
Тимошкина Н.Н. – 137,138,425
Тимощук Г.И. – 371
Титова А.А. – 208
Титова С.В. – 300,318,325,345
Титоян К.Х. – 435
Тихомиров Д.С. – 39
Тихонов А.А. – 201
Тихонов С.Н. – 296,318
Тихонова Н.Н. – 76
Ткачев В.С. – 130,134
Ткачев Г.А. – 151,199
Ткаченко Г.А. – 292,319
Томская Ю.О. – 217,237
Торовкова Т.В. – 449
Торопова Н.Е. – 131
Торопчин М.И. – 336
Тотменин А.В. – 454,476,477
Тотолян Арег А. – 69
Третьяк И.В. – 203
Трофимов Д.Ю. – 250,526
Трофимов Е.И. – 197
Троценко О.Е. – 52,45
Трусова И.В. – 281
Трухачев А.Л. – 302,308,342
Трушакова С.В. – 216,233
Тузиков С.А. – 192
Туполева Т.А. – 39,62
Туркин Е.Н. – 492
Туркина И.А. – 107,394
Туркунова М.Е. – 442
Тучков И.В. – 287
Тыртова Л.В. – 442

Тюпкина О.Ф. – 249
Тюрин Ю.А. – 249

У

Удина И.Г. – 422
Умпелева Т.В. – 512
Ундрицов В.М. – 429
Ундрицов И.М. – 429
Уразов Н.Г. – 49
Уралова Н.О. – 474
Урусов Ф.А. – 466,469,484
Усенова О.П. – 113
Усович Т.О. – 200
Устинов Д.В. – 292,295
Устинова В.В. – 510
Устюжанин А.В. – 371,394,485,486
Устюжанина А.В. – 371,394
Усубов Э.Л. – 435
Уткин Д.В. – 306
Ушакова А. – 276

Ф

Файзулоев Е.Б. – 276
Фалеева Т.Г. – 413,421
Федорова Е.А. – 253,254
Федорова М.В. – 396
Федорова М.С. – 126,128,129,187
Федорова Т.Ф. – 437
Федотов В.В. – 183
Федотов В.П. – 437
Федотова Ю.А. – 179
Федяков М.А. – 442
Феранчук С.И. – 323,324,332
Филин А.В. – 425
Филиппова Ю.Н. – 274,381
Фириченко С.В. – 104
Фомина Е.Г. – 78
Фомина О.В. – 377,379,381
Фомина-Чертоусова Н.А. – 429
Франк Г.А. – 188
Франциянц Е.М. – 356
Фридман М.В. – 190
Фролов С.А. – 174,186

Х

Хайруллина А.М. – 107
Хайруллина Г.А. – 348,357,358,369,373,375,378
Хайтович А.Б. – 84,343
Халидова Х.Р. – 392,393
Хаммадов Н.И. – 493
Харбутли М.А. – 470
Харин В.Е. – 275
Харьков В.Н. – 411,423
Хасанова Р.Р. – 435,436
Хахалина А.А. – 525
Хашимов Л.Х. – 188
Хидиятова И.И. – 441
Хидиятова И.М. – 441
Хлебникова О.В. – 439
Ховалыг А.Б. – 425
Ходырев Д.С. – 150
Хоржевский В.А. – 181
Хорохорина В.А. – 135
Хохлова Н.М. – 264
Христюхина О.А. – 263
Хромова П.А. – 505,507,514
Хунафина Д.Х. – 262
Хунхеева Ж.Ю. – 323,324
Хусаинова Р.И. – 427
Хуснутдинов Ш.М. – 202
Хуснутдинова Т.А. – 368
Хуснутдинова Э.К. – 153,161,173,177,202,427,435,436,441

Ц

Царева Н.С. – 311,330
Царукян А.А. – 518
Целипанова Е. – 276
Цепенко В.В. – 205
Цуканов А.С. – 186
Цыбовский И.С. – 422
Цыганко Е.В. – 281
Цыганкова О.И. – 289,314,330
Цыганов М.М. – 167
Цыренова Т.А. – 505

Ч

Чагарян А.Н. – 245
Чазова Т.А. – 249
Чеботарева И.В. – 126
Чеботарёва Н.В. – 206
Чекан В.Л. – 239
Чекмарев А.С. – 382
Чекрыгина Е.В. – 283
Челдышова Н.Б. – 320
Челышева Д.С. – 195
Чемисова О.С. – 345
Ченцов В.Б. – 240
Чердынцева Н.В. – 167,180,192
Черемных Н.В. – 405
Черемухина Е.П. – 403
Черкасова Л.В. – 285
Черневская О.М. – 119,388
Черненко П.А. – 132
Черниченко М.А. – 201
Черноусова Л.Н. – 510
Чернуха М.Ю. – 250
Чернышов Д.В. – 240
Честков А.В. – 361
Чиркова Т.В. – 135
Чуб Е.В. – 80
Чугунова О.Л. – 222
Чудакова Л.В. – 434
Чуланов В.П. – 40,42,44,48,54,56,57,63,64,65,70,72,73,75,77
Чурина М.А. – 69
Чухрова А.Л. – 439
Чхиквадзе Н.В. – 195

Ш

Шабалова И.П. – 103,198
Шабанова Е.С. – 442
Шагимарданова Е.И. – 150
Шагинян И.А. – 250

Шайхуллина Л.Р. – 262
Шайхутдинова Р.В. – 159,162
Шайхутдинова Р.З. – 316
Шалепо К.В. – 348
Шамсиддинова М.А. – 431
Шанько А.В. – 62
Шарапова Н.А. – 246,306,315
Шардаков В.И. – 188
Шарипова И.П. – 92
Шарова И.Н. – 327
Шаскольский Б.Л. – 361
Шахгильдян В.И. – 475
Шахова К.А. – 91,116
Швед Н.Ю. – 442
Шелыгин Ю.А. – 174,186
Шемшура А.Б. – 465,488
Шемякин И.Г. – 288
Шепетько М.Н. – 206
Шигапова Л.Х. – 150
Шилова Н.В. – 439
Шинкаркина А.П. – 126,194
Шипицына Е.В. – 348,360,368
Шиповалов А.В. – 230
Шипулин Г.А. – 44,57,121,155,158,223,225,237,240,263,267,268,270,271,273,296,396,460,463,465,469,498,499,502,504
Шипулина О.Ю. – 96,99,103,104,108,109,115,120,121,122,123,213,222,223,240,403,404,475
Широкова Н.А. – 430
Широкорад В.И. – 130,134
Шитиков Е.А. – 511
Шкаврова Т.Г. – 205
Школина Т.В. – 78
Шмелева Н.П. – 239
Шмелёва Н.П. – 257,346
Шмид Д. – 516
Шнайдер Н.А. – 519,521,529
Шокарев Р.А. – 429
Шопаева Г.А. – 41,42
Шошокин В.А. – 49
Шпак И.М. – 292,295
Шпилевая М.В. – 361
Шубин В.П. – 174,186
Шубин Ф.Н. – 284
Шумкова Э.Н. – 125,349
Шуралев Э.А. – 493

Щ

Щагина О.А. – 437
Щаюк А.Н. – 206
Щеглова К.А. – 193
Щелканова Е.Ю. – 337
Щелокова В.Г. – 215

Э

Эгамова С.К. – 161,206
Эйдельштейн И.А. – 211
Эйдельштейн М.В. – 211
Эсауленко Е.В. – 74

Ю

Юдкин Д. – 438
Юлия Максимова – 438
Юркевич Н.А. – 516
Юрлова О.В. – 408
Юсупова Л.Ф. – 202

Я

Ядрихинская М.С. – 475
Якимова М.В. – 200
Яковчук Е.Е. – 60
Якунина А.В. – 527
Якунина М.А. – 256
Ямангулова Н.Р. – 202
Яровая Ж.Ю. – 483
Ярош Е.В. – 62
Ярыгина М.Б. – 299
Яцышина С.Б. – 212,213,215,217,237,241,256,258,259
Яшечкин Ю.И. – 315,327

IX Всероссийская научно-практическая конференция

с международным участием

«МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА 2017»

СБОРНИК ТРУДОВ

Под редакцией академика РАН В.И. Покровского

ГЕНЕРАЛЬНЫЙ СПОНСОР: ООО «ИнтерЛабСервис»

ТОМ I

ООО фирма «Юлис»,
392010, г. Тамбов, ул. Монтажников, 9.
Тел.: 8 (4752) 756-444 (многоканальный).
http://www.yulis.ru, e-mail: info@yulis.ru

Сдано в набор 06.02.2017. Подписано в печать 20.03.2017.
Гарнитура Myriad Pro. Формат 60x90/8.
Печать офсетная. Усл. печ. л. 68
Тираж 600 экз. Заказ № 99623.

ISBN 978-5-98407-012-6

