

РАЗРАБОТКА ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА М К ИНДИВИДУАЛЬНЫМ БЕЛКАМ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСА ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ИММУННОГО БЛОТТИНГА В ФОРМАТЕ «WESTERN BLOT»

АВДОНИНА АЛЕКСАНДРА СЕРГЕЕВНА, аспирант ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» РАМН, начальник научно-производственного отделения «ВИЧ-Блот», зам. начальника отдела перспективных разработок ЗАО «ЭКОлаб», Россия, Московская область, 142530, Электрогорск, ул. Буденного, 1, тел./факс: (49643) 3-13-74, 3-17-45, 3-35-29, e-mail: ekolab-avdonina@mail.ru

МАРДАНЛЫ СЕЙФАДДИН ГАШИМОВИЧ, канд. мед. наук, президент и директор по науке ЗАО «ЭКОлаб», Россия, Московская область, 142530, Электрогорск, ул. Буденного, 1

ЮМИНОВА НАДЕЖДА ВАСИЛЬЕВНА, докт. биол. наук, зам. директора по научной работе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» РАМН, Россия, 105064, Москва, Малый Казенный пер., 5

Реферат. Цель исследования — разработка отечественной тест-системы для выявления антител класса М к индивидуальным белкам цитомегаловируса человека методом иммунного блоттинга в формате «Western blot».

Материал и методы. Культивировали цитомегаловирус штамма AD-169 с целью получения лизатного антигена. Проводили электрофорез лизатного антигена в полиакриламидном геле и электроперенос разделенных белковых молекул на нитроцеллюлозную мембрану с целью получения иммуносорбента. Осуществляли подбор состава реагентов для проведения иммунного блоттинга и выбор времени инкубаций. Оценивали чувствительность и специфичность разработанной тест-системы путем исследования 21 образца смешанной панели сывороток «Anti-CMV Mixed Titer Performance Panel PT C203» (референсный материал) и 48 образцов сыворотки крови человека (клинический материал). **Результаты и их обсуждение.** Разработана иммуноферментная тест-система «ИФА-Блот-ЦМВ-IgM», которая имеет чувствительность и специфичность, не уступающие чувствительности и специфичности своего аналога — тест-системе «Anti-CMV (IgM) Westernblot» (фирма «EUROIMMUN AG», Германия), выгодно отличается от него рядом потребительских характеристик, обеспечивающих ее более эффективное использование. **Выводы.** Новая тест-система предназначена для проведения исследований, подтверждающих положительные результаты скрининга дифференцирующих стадию заболевания при диагностике цитомегаловирусной инфекции.

Ключевые слова: цитомегаловирусная инфекция, антитела класса М, антигены цитомегаловируса, иммунный блоттинг.

Для ссылки: Авдонина, А.С. Разработка иммуноферментной тест-системы для выявления антител класса М к индивидуальным белкам цитомегаловируса человека методом иммунного блоттинга в формате «Western blot» / А.С. Авдонина, С.Г. Марданлы, Н.В. Юминова // Вестник современной клинической медицины. — 2016. — Т. 9, вып. 5. — С.7—14.

DEVELOPMENT OF A TEST KIT FOR DETECTION OF IGM-ANTIBODIES TO INDIVIDUAL CYTOMEGALOVIRUS ANTIGENS BY IMMUNOBLOTTING (WESTERN BLOT)

AVDONINA ALEXANDRA S., postgraduate student of I.I. Mechnikov Scientific Research Institute of Vaccines and Serums of Russian Academy of Medical Sciences, Head of the Department of research and production of «HIV-Blot», deputy-head of the Department of advanced technology of Closed Joint Stock Company «EKOLab», Russia, Moscow region, 142530, Elektrogorsk, Budyonnyi str., 1, tel/fax: (49643) 3-13-74, 3-17-45, 3-35-29, e-mail: ekolab-avdonina@mail.ru

MARDANLY SEYFADDIN G., C. Med. Sci., president and director for science of Closed Joint Stock Company «EKOLab», Russia, Moscow region, 142530, Elektrogorsk, Budyonnyi str., 1

YUMINOVA NADEZHDA V., D. Biol. Sci., deputy-director for scientific activity of I.I. Mechnikov Scientific Research Institute of Vaccines and Serums, Russia, 105064, Moscow, Malyi Kazennyi lane, 5

Abstract. Aim. Development of Russian test kit for detecting IgM-antibodies to individual cytomegalovirus antigens by immunoblotting (Western blot). **Material and methods.** Cytomegalovirus strain AD-169 was cultured to obtain the lysate antigen. Lysate antigen was subjected to electrophoresis in polyacrylamide gel. Then separated proteins were transferred to nitrocellulose membrane to obtain immunosorbent. Selection of the composition of reagents for immune blotting and the time of incubation was performed. Sensitivity and specificity of the new test kit was evaluated by studying 21 samples of the mixed panel of serums «Anti-CMV Mixed Titer Performance Panel PT C203» (reference material) and 48 samples of human serum (clinical material). **Results and discussion.** Test kit «Blot-CMV-IgM» was designed. It has

sensitivity and specificity not conceding one of its analogues, the «Anti-CMV (IgM) Westernblot» (EUROIMMUN AG, Germany). It demonstrates characteristics of more efficient use. **Conclusion.** The new test kit is intended for confirmation of positive screening results and for differentiation the stage of infection in the diagnosis of cytomegalovirus infection.

Key words: cytomegalovirus infection, IgM-antibodies, cytomegalovirus antigens, immunoblotting.

For reference: Avdonina AS, Mardany SG, Yuminova NV. Development of a test kit for detection of IgM-antibodies to individual cytomegalovirus antigens by immunoblotting (Western blot). The Bulletin of Contemporary Clinical Medicine. 2016; 9 (5): 7—14.

Введение. В последние годы возрастает значимость герпесвирусных инфекций, что объясняется их широким распространением, особенностями эпидемиологии и сложностью диагностики, а также увеличением числа лиц со вторичным иммунодефицитом, при котором герпетические инфекции являются оппортунистическими [1].

Среди этих инфекций наибольшую значимость имеет цитомегаловирусная инфекция (ЦМВИ) в связи с широким распространением в человеческой популяции ее возбудителя, значительным разнообразием путей его передачи, крайним полиморфизмом клиники, частотой бессимптомных форм, с одной стороны, и риском развития тяжелых форм, чреватых инвалидизирующими последствиями, — с другой. Увеличивается перечень патологических состояний, в возникновении которых этиологическим фактором является цитомегаловирус (ЦМВ), сегодня он включает серонегативный мононуклеоз, посттрансфузионный синдром, гепатиты, болезни желудочно-кишечного тракта, урогенитальные заболевания, онкогенез и др. Особо следует отметить роль ЦМВ в развитии патологии плода и новорожденного при вертикальном пути заражения — через плаценту или родовые пути [2, 3].

ЦМВИ встречается у людей, живущих на всех континентах, причем во всех слоях населения, хотя у экономически и социально незащищенной части населения все же чаще, чем среди лиц среднего класса и богатых [4].

Средний показатель заболеваемости ЦМВИ в Российской Федерации за период с 2000 по 2014 г., по данным официальной статистики, составил 1,16 на 100 тыс. населения [5].

Частота бессимптомных форм и многообразие проявлений манифестных форм определяют ведущее положение лабораторных исследований в диагностике ЦМВИ, причем одним из наиболее эффективных инструментов лабораторной диагностики служит определение класса и динамики видоспецифических антител в крови пациента [3, 6], позволяющее не только установить сам факт инфицирования, но и определить форму ЦМВИ — первичную острую инфекцию, латентную хроническую инфекцию, обострение хронической инфекции. Известно, что при первичном заражении вирусом через 5—7 сут в крови появляются антитела класса М (IgM) к ЦМВ, через 10—14 сут — низкоавидные антитела класса G (IgG), которые постепенно заменяются высокоавидными. IgM в большинстве случаев исчезают через 1—2 мес, низкоавидные IgG — через 1—3 мес; высокоавидные антитела класса G циркулируют в крови носителя пожизненно. Поэтому при латентной (хронической) инфекции в крови присутствуют только высокоавидные IgG.

При реактивации ЦМВИ или после реинфекции возможно выявление IgM (но уже в меньшем титре и в течение более короткого времени по сравнению с первичной острой ЦМВИ), а также высокоавидных IgG [7].

Серологическое обследование при диагностике цитомегаловирусной инфекции предполагает выявление методом ИФА антител классов М и G к ЦМВ, определение авидности и титра IgG и при необходимости (при недостаточности полученной информации для постановки окончательного диагноза) — проведение иммунного блоттинга (иммуноблота, ИБ), т.е. выявление специфических IgM и IgG к отдельным антигенам ЦМВ, позволяющее отслеживать динамику смены белков в ходе инфекционного процесса, что имеет важное диагностическое и прогностическое значение [1, 8].

Основным методом серологической диагностики ЦМВИ в настоящее время является иммуноферментный анализ (ИФА), позволяющий выявлять наличие соответствующих классов видоспецифических антител, динамику их содержания и авидность. Однако в ряде случаев его результаты не поддаются однозначной интерпретации, особенно при наличии в исследуемых образцах ревматоидного фактора, при избыточном содержании липидов (липидемии), при гиперпродукции IgM у беременных, при перекрестных реакциях с антигенами других возбудителей, при наличии у пациентов аутоиммунных процессов, нарушений обмена веществ и др. В этих случаях необходимо проведение дополнительных исследований, в частности проведение иммунного блоттинга (ИБ) [8].

Иммунный блоттинг — это, по сути, один из вариантов твердофазного иммуноферментного анализа, при котором антитела, присутствующие в исследуемом образце, взаимодействуют с отдельными антигенами возбудителя, нанесенными на полоски нитроцеллюлозной мембраны (стрипы). Образующиеся при этом комплексы «антиген-антитело» связываются затем с конъюгатом — видоспецифическими антителами к иммуноглобулинам человека, мечеными ферментом, и выявляются по цветной реакции с субстратом этого фермента в присутствии соответствующего индикатора; при этом интенсивность реакции определяется содержанием в образце соответствующих антител.

В зависимости от способа нанесения антигенов на нитроцеллюлозную мембрану различают ИБ либо в формате «Western blot» (на мембрану методом электропереноса наносят белки лизата вирусной культуры, подвергнутой электрофорезу), либо в формате «Line blot» (на определенные участки мембраны наносят в определенном порядке только клинически значимые антигены — нативные, синте-

тические или рекомбинантные), возможен также комбинированный формат ИБ («Western-Line blot») [8].

Антигены ЦМВ в зависимости от их способности формировать у человека иммунный ответ подразделяют на три категории:

1) перекрестно-реагирующий антиген с молекулярной массой 65 кДа и неопределенные антигены;

2) низкоспецифичные антигены с молекулярными массами 75, 55, 52 и 38 кДа;

3) высокоспецифичные антигены с молекулярными массами 150, 130 и 28 кДа [9, 10].

Наличие антител хотя бы к одному из высокоспецифичных антигенов свидетельствует о том, что у пациента идет активный инфекционный процесс, формирующий иммунный ответ к ЦМВ. Присутствие антител к антигенам pp65 (ранний белок) и gp75 (предранний белок) расценивается как маркер активной репликации вируса. По мере развития инфекционного процесса появляются антитела к белку pp28. Антитела к pp150 обычно вырабатываются при каждом случае ЦМВИ, однако может случиться так, что они не обнаруживаются сразу после первичной инфекции [7, 9].

Иммунный блоттинг может быть использован при диагностике как врожденной, так и приобретенной в любом возрасте ЦМВИ, в том числе у лиц с выраженным иммунодефицитом (при ограничении синтеза антител или при их поликлональной наработке) [8]. К достоинствам ИБ следует отнести также возможность автоматизации как постановки анализа, так и учета его результатов, в том числе с объективизацией оценки интенсивности реакции.

До настоящего времени лабораторная диагностика ЦМВИ в России могла быть обеспечена только импортными наборами для ИБ, высокая стоимость которых существенно ограничивает возможности их широкого использования в практике отечественного здравоохранения. Поэтому разработка соответствующего отечественного продукта, не уступающего по своим характеристикам своему зарубежному аналогу, но значительно более дешевого, достаточно актуальна.

Целью данной работы явилась разработка иммуноферментной тест-системы (на основе натурального лизатного антигена) для выявления антител класса М к индивидуальным белкам ЦМВ методом иммунного блоттинга в формате «Western blot».

Материал и методы. Для получения лизатного антигена использовали ЦМВ штамма AD-169 ф. «АТСС» (США). ЦМВ выращивали на монослое культуры диплоидных клеток фибробластов человека (линия М-22) в присутствии ростовой среды «Игла MEM» фирмы «Биолот» (Россия). Культивирование вируса на клетках осуществляли при температуре 37°C до полного разрушения монослоя клеток в результате цитопатического действия (как правило, в течение 7 сут). Для выделения вируса клеточную культуру подвергали двукратному замораживанию при температуре минус 40°C и оттаиванию при комнатной температуре, воздействию ультразвуком и высокоскоростному центрифугированию (8 000 об/мин в течение 30 мин при t 4°C). Степень чистоты полученного лизатного антигена,

оцененная в вертикальном электрофорезе в полиакриламидном геле (по методу Лэммли), составила не менее 95%. Концентрация белка (по методу Брэдфорда) составила 1,2 мг/мл. До использования полученный лизатный антиген хранили при температуре минус 70°C.

В качестве твердой фазы при изготовлении иммуносорбента была использована нитроцеллюлозная мембрана фирмы «Sartorius» (Германия).

Для получения иммуносорбента применяли следующие методы:

1. Вертикальный электрофорез лизатного антигена цитомегаловируса в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-электрофорез, денатурирующие условия по Лэммли), приводящий к разделению по молекулярному весу смеси биологических макромолекул.

2. Электроперенос разделенных белков из геля на твердую подложку (нитроцеллюлозную мембрану) — блоттинг.

3. Выявление перенесенных на мембрану белков с помощью иммуноферментного анализа с последующей визуальной оценкой результатов исследования.

Для детекции вирусспецифических IgM, связавшихся с антигенами иммуносорбента, использовали козы антитела против иммуноглобулинов человека класса М, конъюгированные со щелочной фосфатазой (фирма «Jakson», США). Для индикации реакции использовали окрашивающий раствор высокой чувствительности фирмы «Kem-En-Tec» (Дания), содержащий 5-бром-1-хлор-3-индолилфосфат и нитроголубой тетразолий.

В качестве референсного материала при оценке чувствительности и специфичности разработанной тест-системы были исследованы образцы смешанной панели «Anti-CMV Mixed Titer Performance Panel PT C203» (фирма «Sera Care Life Sciences», США), включающей 21 образец, из которых 1 отрицательный (№20), 20 содержат IgG к ЦМВ (из них 7 образцов также содержат IgM к ЦМВ — № 1, 2, 4, 12, 15, 17, 19).

В качестве клинического материала при оценке эффективности разработанной тест-системы были использованы 48 образцов, полученных из Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора (г. Москва). Образцы были предварительно протестированы на наличие IgM к ЦМВ с помощью тест-системы «ИФА-ЦМВ-IgM».

Результаты и их обсуждение. Для разработки новой тест-системы потребовалось решение следующих задач:

- определение оптимального количества антигена, которое необходимо наносить на единицу поверхности ПААГ;
- подбор условий электрофореза и электропереноса белков на нитроцеллюлозную мембрану;
- определение условий последующей обработки мембраны;
- оптимизация состава остальных компонентов тест-системы (буферные растворы для отмывки стрипов и разведения сывороток, конъюгат и окрашивающий раствор);

• подбор оптимальных условий проведения анализа (разведение образца, время инкубаций).

Первый и, пожалуй, самый важный этап в разработке новой тест-системы был связан с отработкой технологии изготовления иммуносорбента. Поскольку определяющую роль в этом процессе играет качество лизатного антигена, основное внимание было уделено культивированию ЦМВ и очистке вирусного лизата. Были определены оптимальные условия культивирования ЦМВ, в частности сроки, к которым вирус достигает максимальной цитопатической активности в ростовых клетках, метод высвобождения вируса из клеток, способ очистки полученного лизата, составы вспомогательных растворов.

Электрофоретический анализ белкового состава полученного лизатного антигена показал наличие в нем белков с молекулярными массами 150 килодальтон (кДа), 130, 75, 65, 55, 52, 38, 28 кДа. Было установлено, что для более полного электрофоретического разделения белков по молекулярному весу необходимо использование двухфазного ПААГ с концентрацией акриламида 11,7% в нижней фазе и 4% в верхней фазе.

На втором этапе были определены оптимальный состав реагентов для проведения анализа (раствор для разведения сывороток, промывочный раствор, конъюгат) и проведена собственно отработка схемы постановки ИБ. Были установлены оптимальное разведение исследуемого образца, время инкубации стрипов с сывороткой, конъюгатом и окрашивающим раствором.

Итогом разработки явилась тест-система «ИФА-Блот-ЦМВ-IgM» следующего состава:

1. Иммуносорбент — полоски (стрипы) из нитроцеллюлозной мембраны с сорбированными на них методом электропереноса индивидуальными белками (антигенами) ЦМВ: pp150, pp130, gp75, pp65, gp55, pp52, p38, pp28; в виде контрольной линии нанесены антитела козы против IgM человека — для контроля правильности проведения реакции.

2. Конъюгат — козы антитела против иммуноглобулинов M человека, конъюгированные со щелочной фосфатазой.

3. Окрашивающий раствор 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат и нитроголубой тетразолий.

4. 5-кратный концентрат промывочного раствора [ПР(×5)].

5. Раствор для разведения сывороток (PPC).

6. Референс-стрип (или его фотография) — стрип с проявленным белковым профилем антигена ЦМВ.

Результаты теста оцениваются визуально, интерпретация результатов для каждого исследованного

образца осуществляется в зависимости от того, к каким антигенам ЦМВ были выявлены антитела (табл. 1).

Чувствительность и специфичность разработанной тест-системы вначале были оценены на сыворотках панели «Anti-CMV Mixed Titer Performance Panel PTC203» (фирма «Sera Care Life Sciences», США). Результаты этого исследования приведены в табл. 2.

Результаты, приведенные в табл. 1, показывают полное совпадение оценок сывороток панели, полученных в исследовании, с их паспортными характеристиками.

Для оценки эффективности разработанной тест-системы были исследованы 48 сывороток, полученных в Федеральном центре гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора (г. Москва). Предварительное исследование на наличие антител класса M к ЦМВ в скрининговой тест-системе «ИФА-ЦМВ-IgM» (показало наличие IgM в 16 образцах (№ 1—16) и отсутствие IgM в 18 образцах (№ 33—48). Результаты скрининга в ИФА 14 образцов (№ 17—33) были неопределенными (оптическая плотность в пределах «серой» зоны). Результаты ИБ приведены в табл. 3.

Как следует из представленных в табл. 3 данных, из 16 образцов, предварительно оцененных в ИФА как положительные, получили подтверждение положительной оценки 11 образцов, 3 образца были оценены как отрицательные (в них не были выявлены антитела ни к одному из антигенов ЦМВ) и для 2 образцов ИБ дал неопределенный результат (не были выявлены антитела к высокоспецифичным антигенам ЦМВ).

Из 14 образцов, получивших в ИФА неопределенную оценку, 2 образца были оценены в ИБ как положительные, 7 — как отрицательные, и при исследовании 5 образцов в ИБ также был получен неопределенный результат. Все 18 образцов, отрицательных по предварительной оценке в ИФА, получили отрицательную оценку и по результатам ИБ.

Отрицательный результат ИБ при первично положительном или неопределенном результате скринингового тестирования может являться свидетельством ложноположительной реакции в ИФА. При выявлении IgM данный факт не редкость [8]. Неопределенный результат ИБ при первично положительном или неопределенном результате скринингового тестирования может говорить о том, что исследуемый образец был получен в период сероконверсии или реактивации инфекции, и наработка вирусспецифических антител еще не произо-

Таблица 1

Интерпретация результатов иммунного блоттинга в тест-системе «ИФА-Блот-ЦМВ-IgM»

Результат	Интерпретация результата
Выявлены антитела как минимум к одному из высокоспецифичных антигенов (pp150, pp130, pp28) в сочетании с антителами к другим антигенам	Положительный
Выявлены антитела к двум и более низкоспецифичным антигенам (gp75, gp55, pp52, p38) и/или перекрестно-реагирующему антигену pp65	Неопределенный
Не выявлены антитела ни к одному из антигенов ЦМВ либо выявлены антитела только к перекрестно-реагирующему антигену pp65	Отрицательный

**Результаты исследования сывороток панели «Anti-CMV Mixed Titer Performance Panel PT C203»
в тест-системе «ИФА-Блот-ЦМВ-IgM»**

Номер образца	Паспортные характеристики (оценка в тест-системе «Abbott Architect CMV IgM»)		Результат ИБ в тест-системе «ИФА-Блот-ЦМВ-IgM»	
	Коэффициент реактивности*	Оценка образца	Наличие антител к антигенам	Оценка образца
PTC-203-01	3,8	Положительный	pp130, pp65, gp55, p38	Положительный
PTC-203-02	4,7	Положительный	pp65, pp55, p38, pp28	Положительный
PTC-203-03	0,2	Отрицательный	Антител не выявлено	Отрицательный
PTC-203-04	4,4	Положительный	pp65, pp55, p38, pp28	Положительный
PTC-203-05	0,1	Отрицательный	Антител не выявлено	Отрицательный
PTC-203-06	0,3	Отрицательный	Антител не выявлено	Отрицательный
PTC-203-07	0,2	Отрицательный	Антител не выявлено	Отрицательный
PTC-203-08	0,2	Отрицательный	Антител не выявлено	Отрицательный
PTC-203-09	0,2	Отрицательный	Антител не выявлено	Отрицательный
PTC-203-10	0,2	Отрицательный	Антител не выявлено	Отрицательный
PTC-203-11	0,1	Отрицательный	Антител не выявлено	Отрицательный
PTC-203-12	1,9	Положительный	pp150, pp130, gp 75, pp65, gp55, p38	Положительный
PTC-203-13	0,5	Отрицательный	Антител не выявлено	Отрицательный
PTC-203-14	0,6	Отрицательный	Антител не выявлено	Отрицательный
PTC-203-15	1,4	Положительный	pp150, pp130, gp 75, pp65, gp55, p38	Положительный
PTC-203-16	0,6	Отрицательный	Антител не выявлено	Отрицательный
PTC-203-17	3,9	Положительный	pp130, pp65, gp55, p38	Положительный
PTC-203-18	0,1	Отрицательный	Антител не выявлено	Отрицательный
PTC-203-19	3,1	Положительный	pp130, pp65, gp55, p38	Положительный
PTC-203-20	0,1	Отрицательный	Антител не выявлено	Отрицательный
PTC-203-21	0,6	Отрицательный	Антител не выявлено	Отрицательный

Примечание: *коэффициент реактивности — коэффициент, полученный из отношения величины оптической плотности (ОП) в лунке с исследуемым образцом к пороговой величине ОП. Коэффициенты $\geq 1,0$ считаются реактивными (согласно паспортным данным на образцы панели).

Результаты исследования сывороток в тест-системе «ИФА-Блот-ЦМВ-IgM»

№ п/п	Предварительная оценка в ИФА	Результат ИБ								Оценка образца
		Наличие антител к антигенам								
		pp150	pp130	gp75	pp65	gp55	pp52	p38	pp28	
1	Положительный	+	+	+	+	+	+	+	+	Положительный
2	Положительный	-	-	-	+	+	-	-	-	Неопределенный
3	Положительный	-	+	+	+	+	-	+	-	Положительный
4	Положительный	+	-	+	+	+	+	+	+	Положительный
5	Положительный	-	-	-	-	-	-	-	-	Отрицательный
6	Положительный	+	+	+	+	+	+	+	+	Положительный
7	Положительный	+	-	-	+	+	-	+	+	Положительный
8	Положительный	-	-	-	+	+	-	-	+	Положительный
9	Положительный	-	-	-	+	+	+	+	-	Неопределенный
10	Положительный	-	+	+	+	+	-	+	-	Положительный
11	Положительный	+	-	+	+	+	-	-	+	Положительный
12	Положительный	-	-	-	+	+	-	+	+	Положительный
13	Положительный	+	-	-	+	+	+	-	+	Положительный
14	Положительный	-	-	-	-	-	-	-	-	Отрицательный
15	Положительный	-	+	-	+	-	+	+	+	Положительный
16	Положительный	-	-	-	+/-	-	-	-	-	Отрицательный
17	Неопределенный	-	-	-	+	+	-	+	-	Неопределенный
18	Неопределенный	-	-	-	-	-	-	-	-	Отрицательный
19	Неопределенный	-	-	-	-	-	-	-	-	Отрицательный
20	Неопределенный	-	-	-	+	+	+	+	-	Неопределенный
21	Неопределенный	-	-	-	+	+	-	+	-	Неопределенный
22	Неопределенный	-	-	-	-	-	-	-	-	Отрицательный
23	Неопределенный	-	-	-	-	-	-	-	-	Отрицательный
24	Неопределенный	-	-	-	-	-	-	-	-	Отрицательный

№ п/п	Предварительная оценка в ИФА	Результат ИБ								Оценка образца
		Наличие антител к антигенам								
		pp150	pp130	gp75	pp65	gp55	pp52	p38	pp28	
25	Неопределенный	-	-	-	+	+	-	+	-	Неопределенный
26	Неопределенный	-	-	-	+	+	-	+	-	Неопределенный
27	Неопределенный	-	-	-	+	+	+	-	+	Положительный
28	Неопределенный	-	-	-	-	-	-	-	-	Отрицательный
29	Неопределенный	-	-	-	-	-	-	-	-	Отрицательный
30	Неопределенный	+	-	-	+	+	+	-	+	Положительный
31	Отрицательный	-	-	-	-	-	-	-	-	Отрицательный
32	Отрицательный	-	-	-	-	-	-	-	-	Отрицательный
33	Отрицательный	-	-	-	-	-	-	-	-	Отрицательный
34	Отрицательный	-	-	-	-	-	-	-	-	Отрицательный
35	Отрицательный	-	-	-	-	-	-	-	-	Отрицательный
36	Отрицательный	-	-	-	-	-	-	-	-	Отрицательный
37	Отрицательный	-	-	-	-	-	-	-	-	Отрицательный
38	Отрицательный	-	-	-	-	-	-	-	-	Отрицательный
39	Отрицательный	-	-	-	-	-	-	-	-	Отрицательный
40	Отрицательный	-	-	-	-	-	-	-	-	Отрицательный
41	Отрицательный	-	-	-	-	-	-	-	-	Отрицательный
42	Отрицательный	-	-	-	-	-	-	-	-	Отрицательный
43	Отрицательный	-	-	-	-	-	-	-	-	Отрицательный
44	Отрицательный	-	-	-	-	-	-	-	-	Отрицательный
45	Отрицательный	-	-	-	-	-	-	-	-	Отрицательный
46	Отрицательный	-	-	-	-	-	-	-	-	Отрицательный
47	Отрицательный	-	-	-	-	-	-	-	-	Отрицательный
48	Отрицательный	-	-	-	-	-	-	-	-	Отрицательный

шла в полном объеме. В данном случае необходимо повторное обследование пациента через 1—2 нед.

Для сравнения чувствительности и специфичности новой тест-системы с аналогичным импортным набором было проведено исследование 16 образцов

(8 положительных по наличию IgM к ЦМВ и 8 отрицательных) в тест-системах «ИФА-Блот-ЦМВ-IgM» и «Anti-CMV (IgM) Westernblot» фирмы «EUROIMMUN AG» (Германия). Полученные при этом результаты представлены в табл. 4.

Таблица 4

Результаты сравнительных испытаний тест-систем «Anti-CMV (IgM) Westernblot» и «ИФА-Блот-ЦМВ-IgM»

Тест-система	№ образца	Результат ИБ								Оценка образца
		Наличие антител к антигенам								
		pp150	pp130	gp75	pp65	gp55	pp52	p38	pp28	
«Anti-CMV (IgM) Westernblot»	1	-	+	+	+	+	-	+	-	Положительный
«ИФА-Блот-ЦМВ-IgM»		-	+	+	+	+	-	+	-	Положительный
«Anti-CMV (IgM) Westernblot»	2	+	-	-	+	+	-	+	+	Положительный
«ИФА-Блот-ЦМВ-IgM»		+	-	-	+	+	-	+	+	Положительный
«Anti-CMV (IgM) Westernblot»	3	-	-	-	+	+	-	+	+	Положительный
«ИФА-Блот-ЦМВ-IgM»		-	-	-	+	+	-	+	+	Положительный
«Anti-CMV (IgM) Westernblot»	4	+	-	+	+	+	-	-	+	Положительный
«ИФА-Блот-ЦМВ-IgM»		+	-	+	+	+	-	-	+	Положительный
«Anti-CMV (IgM) Westernblot»	5	+	+	+	+	+	+	+	+	Положительный
«ИФА-Блот-ЦМВ-IgM»		+	+	+	+	+	+	+	+	Положительный
«Anti-CMV (IgM) Westernblot»	6	-	-	-	+	+	-	-	+	Положительный
«ИФА-Блот-ЦМВ-IgM»		-	-	-	+	+	-	-	+	Положительный
«Anti-CMV (IgM) Westernblot»	7	-	+	-	+	-	+	+	+	Положительный
«ИФА-Блот-ЦМВ-IgM»		-	+	-	+	-	+	+	+	Положительный
«Anti-CMV (IgM) Westernblot»	8	+	-	+	+	+	+	+	+	Положительный
«ИФА-Блот-ЦМВ-IgM»		+	-	+	+	+	+	+	+	Положительный
«Anti-CMV (IgM) Westernblot»	9	-	-	-	-	-	-	-	-	Отрицательный
«ИФА-Блот-ЦМВ-IgM»		-	-	-	-	-	-	-	-	Отрицательный
«Anti-CMV (IgM) Westernblot»	10	-	-	-	-	+/-	-	-	-	Отрицательный
«ИФА-Блот-ЦМВ-IgM»		-	-	-	-	+/-	-	-	-	Отрицательный
«Anti-CMV (IgM) Westernblot»	11	-	-	-	-	-	-	-	-	Отрицательный
«ИФА-Блот-ЦМВ-IgM»		-	-	-	-	-	-	-	-	Отрицательный
«Anti-CMV (IgM) Westernblot»	12	-	-	-	-	-	-	-	-	Отрицательный
«ИФА-Блот-ЦМВ-IgM»		-	-	-	-	+/-	-	-	-	Отрицательный

Тест-система	№ образ-ца	Результат ИБ								Оценка образца
		Наличие антител к антигенам								
		pp150	pp130	gp75	pp65	gp55	pp52	p38	pp28	
EUROIMMUN	13	-	-	-	-	-	-	-	-	Отрицательный
«ИФА-Блот-ЦМВ-IgM»		-	-	-	-	-	-	-	-	Отрицательный
«Anti-CMV (IgM) Westernblot»	14	-	-	-	-	+/-	-	-	-	Отрицательный
«ИФА-Блот-ЦМВ-IgM»		-	-	-	-	-	-	-	-	Отрицательный
«Anti-CMV (IgM) Westernblot»	15	-	-	-	-	-	-	-	-	Отрицательный
«ИФА-Блот-ЦМВ-IgM»		-	-	-	-	-	-	-	-	Отрицательный
«Anti-CMV (IgM) Westernblot»	16	-	-	-	-	+/-	-	-	-	Отрицательный
«ИФА-Блот-ЦМВ-IgM»		-	-	-	-	+/-	-	-	-	Отрицательный

Как следует из табл. 4, в проведенных испытаниях было получено полное совпадение итоговых оценок исследованных образцов по наличию антител класса М ко всем отдельным антигенам ЦМВ, в том числе и к антигенам gp75 и pp150, учет наличия антител к которым не предусмотрен инструкцией по применению набора фирмы «EUROIMMUN».

Заключение. Полученные результаты позволяют сделать заключение о том, что новая тест-система для проведения подтверждающих и дифференцирующих исследований в диагностике ЦМВИ методом иммунного блоттинга имеет чувствительность и специфичность, не уступающую импортному аналогу. Более того, с учетом данных последних лет, согласно которым антигены pp150 и gp75 играют очень важную роль в процессе взаимодействия ЦМВ с организмом хозяина [1, 11], выявление антител к ним, несомненно, повышает эффективность исследования и может рассматриваться как очевидное преимущество новой тест-системы перед ее аналогом.

Прозрачность исследования. Исследование не имело спонсорской поддержки. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать.

Декларация о финансовых и других взаимоотношениях. Все авторы принимали участие в разработке концепции, дизайна исследования и в написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами. Авторы не получали гонорар за исследование.

ЛИТЕРАТУРА

1. Современные аспекты герпесвирусной инфекции. Эпидемиология, клиника, диагностика, лечение и профилактика: метод. рекомендации / Правительство Москвы, Департамент здравоохранения; сост. Н.В. Каржас [и др.]. — М.: Спецкнига, 2012. — 128 с.
2. Германенко, И.Г. Цитомегаловирусная инфекция у детей: учеб.-метод. пособие / И.Г. Германенко, А.П. Кудин. — Минск: БГМУ, 2009. — 34 с.
3. Цитомегаловирусная инфекция. Эпидемиология, клиника, диагностика, лечение и профилактика: метод. пособие / Правительство Москвы, Комитет здравоохранения. — М., 2001. — 44 с.
4. Марданлы, С.Г. Цитомегаловирусная инфекция / С.Г. Марданлы, Г.И. Кирпичникова, В.А. Неверов. — Электрогорск: ЗАО «ЭКОлаб», 2011. — 32 с.
5. Марданлы, С.Г. Эпидемиологический надзор за инфекциями TORCH-группы на основе современных технологий лабораторной диагностики: автореф.

дис. ... д-ра мед. наук / Марданлы Сейфаддин Гашимов. — М., 2016. — 49 с.

6. Проблемы лабораторной диагностики цитомегаловирусной инфекции у ВИЧ-инфицированных пациентов / В.И. Шахильдян [и др.]. — URL: <http://www.hivrussia.org/pub/2006/07.shtml>
7. Цитомегаловирусная инфекция у взрослых (исключая больных ВИЧ-инфекцией): клинические рекомендации / И.В. Шестакова, Н.А. Малышев, В.В. Лебедев [и др.]. — М.: Национальное научное общество инфекционистов, 2014. — 74 с.
8. Долгих, Т.И. Стратегия и методическое обеспечение диагностики инфекционных заболеваний / Т.И. Долгих. — Омск: Омская государственная медицинская академия, 2007. — 57 с.
9. Маркина, М.В. Иммуноблот в диагностике инфекционных заболеваний. Новые возможности: практ. руководство по интерпретации полученных результатов / М.В. Маркина, В.В. Романов. — URL: http://www.labdiagnostic.ru/docs/specialists/immunoblot_infect.shtml
10. Manifestations of Cytomegalovirus Infection / ed. P. Price, N. Makwana, S. Brunt // Ch. 7. Cytomegalovirus Tegument Proteins and the Development of Novel Antiviral Therapeutics / John Paul III Tomtishen. — InTech, 2013. — 140 p.
11. Kalejta, R.F. Tegument Proteins of Human Cytomegalovirus / R.F. Kalejta // Microbiology and Molecular Biology Reviews. — 2008. — Vol. 72(2). — P.249—265.

REFERENCES

1. Karazhas NV ed. Sovremennye aspekty herpesvirusnoj infekcii: epidemiologija, klinika, diagnostika, lechenie i profilaktika: metodicheskie rekomendacii [Modern aspects of herpesvirus infection: the epidemiology, clinical features, diagnosis, treatment and prevention: methodical recommendations]. Moscow: Speckniga [Moscow: Special book]. 2012; 128 p.
2. Germanenko IG. Cytomegalovirusnaja infekcija u detej: uchebno-metodicheskoe posobie [Cytomegalovirus infection in children: a teaching aid]. Minsk: BGMU [Minsk: Belarusian State Medical University]. 2009; 34 p.
3. Malyshev ON et al. Cytomegalovirusnaja infekcija: epidemiologija, klinika, diagnostika, lechenie i profilaktika: metodicheskoe posobie [Cytomegalovirus infection: the epidemiology, clinical features, diagnosis, treatment and prevention: methodical aid]. Government of Moscow, Health Committee. 2001; 44 p.
4. Mardanly SG, Kirpichnikova GI, Neverov VA. Cytomegalovirusnaja infekcija [Cytomegalovirus infection]. Elektrogorsk: ЗАО «ЭКОлаб». 2011; 32 p.
5. Mardanly SG. Epidemiologicheskij nadzor za infekcijami TORCH-gruppy na osnove sovremennyh tehnologij laboratornoj diagnostiki [Epidemiological surveillance of infections TORCH-group on the basis of modern technologies

- of laboratory diagnostics]. Avtoreferat dissertacii [Thesis of the PhD dissertation]. Moscow. 2016; 49 p.
6. Shahgil'djan VI et al. Problemy laboratornoj diagnostiki citomegalovirusnoj infekcii u VICH-inficirovannyh pacientov [The problems of laboratory diagnostics of cytomegalovirus infection in HIV-infected patients.]. URL: <http://www.hivruussia.org/pub/2006/07.shtml>
 7. Citomegalovirusnaja infekcija u vzroslyh (iskljuchaja bol'nyh VICH-infekciej): klinicheskie rekomendacii [Cytomegalovirus infection in adults (excluding HIV-infected patients): clinical guidelines]. Moskva: Nacional'noe nauchnoe obshhestvo infekcionistov [Moscow: National Scientific Society of infectious diseases]. Moscow. 2014; 74 p.
 8. Dolgih TI. Strategija i metodicheskoe obespechenie diagnostiki infekcionnyh zabolevanij [Strategy and methodical support of diagnostics of infectious diseases]. Omsk. 2007; 57 p.
 9. Markina MV, Romanov VV. Immunoblot v diagnostike infekcionnyh zabolevanij: novye vozmozhnosti (Prakticheskoe rukovodstvo po interpretacii poluchennyh rezul'tatov) [Immunoblot in the diagnosis of infectious diseases: new opportunities (Practical guidance on the interpretation of the results)]. URL: http://www.labdiagnostic.ru/docs/specialists/immunoblot_infect.shtml.
 10. Tomtishen JP. Cytomegalovirus Tegument Proteins and the Development of Novel Antiviral Therapeutics, chapter 7 in book «Manifestations of Cytomegalovirus Infection» (Edited by Price P, Makwana N and Brunt S). InTech. 2013; 140 p.
 11. Kalejta RF. Tegument Proteins of Human Cytomegalovirus. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2008; 72 (2): 249–265.

© Е.В. Алексеева, 2016

УДК 616-001.8-036.81-07:616.153.466.64-074

DOI: 10.20969/VSKM.2016.9(5).14-25

ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ПЛАЗМЕ КРОВИ У БОЛЬНЫХ В КРИТИЧЕСКОМ СОСТОЯНИИ ПРИ ГИПОКСИИ

АЛЕКСЕЕВА ЕЛЕНА ВЛАДИМИРОВНА, канд. мед. наук, врач-анестезиолог-реаниматолог отделения общей реаниматологии ФГБУ «Центральная клиническая больница с поликлиникой» УДП РФ, Россия, 121359, Москва, ул. Маршала Тимошенко, 15, тел. 8-910-442-11-37, e-mail: aev_69@mail.ru

Реферат. Цель исследования — изучение содержания в плазме крови основных компонентов глутаматергической нейромедиаторной системы: глутаминовой кислоты и глутамина при развитии гипоксии у больных в критическом состоянии. **Материал и методы.** Анализированы данные обследования и лечения в отделении реаниматологии двух групп больных. Группа I ($n=19$) — пациенты с наличием гипоксии. Группа II ($n=9$) — больные с отсутствием гипоксии. Критериями гипоксии являлись сниженный уровень насыщения гемоглобина кислородом в верхней полой вене и повышенная концентрация лактата в плазме крови. Концентрация аминокислот в плазме крови определена методом высокоэффективной жидкостной хроматографии — масс-спектрометрии. Группы сопоставлены по содержанию глутаминовой кислоты и глутамина. Статистическая обработка данных проведена с применением компьютерной программы Statistica 12. **Результаты и их обсуждение.** Сниженное содержание глутаминовой кислоты в группе I зарегистрировано в 5 раз чаще ($r=0,833$), чем в группе II. Выраженность полиорганной дисфункции и частота неблагоприятного исхода была выше у больных со сниженным содержанием глутаминовой кислоты как в общей выборке пациентов ($p=0,0181$, отношение шансов = 5), так и в группе I (отношение шансов = 4,4). Варианты сочетанных изменений содержания глутаминовой кислоты и глутамина у больных в критическом состоянии при нарастании тяжести гипоксии отражают формирование гиподисфункции глутаматергической нейромедиаторной системы. **Заключение.** Развитие гипоксии у больных в критическом состоянии ассоциировано с формированием гиподисфункции глутаматергической нейромедиаторной системы — наиболее неблагоприятным ее состоянием в отношении прогноза течения патологического процесса. Неотложная коррекция гиподисфункции глутаматергической нейромедиаторной системы, возможно, является одним из путей восстановления клеточных механизмов адаптации к выживанию больных в критическом состоянии в условиях гиперметаболизма.

Ключевые слова: глутаминовая кислота, гипоксия, больные в критических состояниях.

Для ссылки: Алексеева, Е.В. Изменение содержания глутаминовой кислоты в плазме крови у больных в критическом состоянии при гипоксии / Е.В. Алексеева // Вестник современной клинической медицины. — 2016. — Т. 9, вып. 5. — С.14—25.

GLUTAMIC ACID CHANGES IN PLASMA OF CRITICAL PATIENTS WITH HYPOXIA

ALEKSEEVA ELENA V., C. Med. Sci., anesthesiologist-resuscitator of the Department of intensive care unit of Central Clinical Hospital with Out-Patient service, 121359, Moscow, Marshal Timoshenko str., 15, tel. 8-910-442-11-37, e-mail: aev_69@mail.ru

Abstract. Aim. To study the main components of glutamatergic neurotransmitter system in plasma in critical patients with hypoxia. **Material and methods.** We have analyzed the data of examination and treatment of 2 groups of patients of Intensive Care Unit. Group I ($n=19$) patients presented hypoxia. Group II ($n=9$) — patients without hypoxia. Criteria of hypoxia were the following: reduced level of hemoglobin saturation with oxygen in the superior vena cava and increased lactate concentration in plasma. Amino acid content in was detected by the method of high performance liquid chromatography — mass-spectrometry. The groups were compared by the content of glutamic acid and glutamine. Statistical data processing was carried out using software Statistica 12. **Results and discussion.** The content of glutamic acid was lower in patients of group I (5-fold lower, $r = 0,833$) compared to those in group II. Intensity of multiple organ