

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН
НАЦИОНАЛЬНОЕ НАУЧНОЕ ОБЩЕСТВО ИНФЕКЦИОНИСТОВ
БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ЮЖНО-КАЗАХСТАНСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ
БУХАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИНСТИТУТ**

**ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРАКТИЧЕСКИЕ ВОПРОСЫ
ИММУНОЛОГИИ И ИНФЕКТОЛОГИИ**

*Сборник научных статей участников
Международной научно-практической конференции*

*г. Уфа
3-5 октября 2018 г.*

Том 1

**Уфа
2018**

ОСОБЕННОСТИ БЕРЕМЕННОСТИ И РОДОВ У ПАЦИЕНТОВ С ВАРИКОЗНО РАСШИРЕННЫМИ ВЕНАМИ ТАЗА Джарилкасимова Г.Я., Дустова Н.К., Бабаджанова Г.С., Ихтиярова Г.А. (г. Бухара, Узбекистан)	104
ПРЕВЕНТИВНЫЕ СКРИНИНГИ-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДЛЯ НАСЕЛЕНИЯ В УСЛОВИЯХ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО РИСКА Досыбаева Г.Н., Намазбаева З.И. (г. Шымкент, г. Караганда, Республика Казахстан)	111
ОЦЕНКА РЕЗИСТЕНТНОСТИ ВИЧ ПО МОЛЕКУЛЯРНО- ГЕНЕТИЧЕСКОМУ МЕТОДУ «СУХАЯ КАПЛЯ КРОВИ» Жумамуродов С.Т., Ёдгорова Н.Т. (г. Ташкент, Республика Узбекистан)	124
ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ПЦР ИССЛЕДОВАНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА «СУХАЯ ПРОБИРКА» Жумамуродов С.Т., Ёдгорова Н.Т., Орынбаева З.Н. (г. Ташкент, Республика Узбекистан)	130
ИССЛЕДОВАНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ГОРМОНОВ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЛИМФОЦИТОВ К КОРТИЗОЛУ В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С УВЕИТАМИ ГЕРПЕТИЧЕСКОЙ ЭТИОЛОГИИ И НА ФОНЕ РЕВМАТИЧЕСКОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ Зайнутдинова Г.Х. (г. Уфа, Россия)	138
ИНФЕКЦИОННАЯ ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ В ПРАКТИКЕ СЕМЕЙНОГО ВРАЧА Иномзода Д.И., Ёдгорова М.Д., Носирова М.П. (г. Душанбе, Таджикистан)	144
ПРЕДРОДОВАЯ ПОДГОТОВКА ЖЕНЩИН С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ГЕНИТАЛИЯ ВЫСОКОЙ ГРУППЫ ПЕРИНАТАЛЬНОГО РИСКА Исматова М.И., Ихтиярова Д.Ф., Хамдамов А.Б., Мирзоева М.Р. (г. Бухара, Узбекистан)	148
ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ ЛЕЧЕНИЯ ТОРСН-ИНФЕКЦИИ Каримова Н.Н., Мирзоева М.Р., Тошева И.И., Азимов Ф.Р. (г. Бухара, Узбекистан)	156

ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ПЦР ИССЛЕДОВАНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА «СУХАЯ ПРОБИРКА»

Жумамуродов С.Т., Ёдгорова Н.Т., Орынбаева З.Н.

Ташкентская медицинская академия, г. Ташкент, Республика Узбекистан.

Аннотация. Внешний контроль качества лабораторных исследований осуществляется с помощью стандартизированных панелей, содержащих определенное количество материала пригодного для осуществления анализа. Главное требование к стандартным панелям – это воспроизводимость, т.е. получение одинаковых результатов при каждом последующем тестировании в различных лабораториях. Это может быть достигнуто путем стабилизации (сохранении образцов) в течении длительного времени (1 год и более). Учитывая срок сохранности генетического материала 6 и 24 часа, а также условия жаркого климата и больших расстояний между центрами, реализовать данный момент для ПЦР исследованием с обычным образцом крови пациента не является возможным. Одним из выходов из данного положения может стать использование альтернативного метода «Сухая пробирка».

Ключевые слова: ВИЧ, Гепатит С, ПЦР, сухая пробирка, РНК, ДНК.

EVALUATION OF HIV RESISTANCE BY METHOD OF MOLECULAR- GENETIC “DRY DROP OF BLOOD”

Jumamurodov S.T., Yodgorova N.T., Orynbayev Z.N.

Tashkent Medical Academy, Tashkent, Uzbekistan.

Annotation. External quality control of laboratory tests is carried out using standardized panels containing a certain amount of material suitable for analysis. The main requirement for standard panels is reproducibility, i.e. Receiving the same results for each subsequent testing in different laboratories. This can be achieved by stabilizing (preserving the samples) for a long time (1 year or more). Considering the period of preservation of the genetic material 6 and 24 hours, as well as the conditions of hot climate and large distances between the centers, it is not possible to realize this moment for PCR by a study with a standard patient blood sample. One of the ways out of this provision can be the use of the alternative method “Dry test tube”.

Key words: VICH, Hepatita S, PCR, RNK, Dry test tube, DNK.

Метод анализа ПЦР на инфекции заключается в идентифицировании возбудителей инфекционных заболеваний на основе определения их генетического материала (РНК или ДНК) в пробах, полученных от пациента. Определение последовательности аминокислот обуславливает главное достоинство метода – специфичность, а необходимость небольшого числа копий генетического материала - чувствительность. Однако, это же определяет его одну из слабых сторон [6, 9, 10].

При стандартном методе для сбор материала на ПЦР следующее: используется цельная свежая кровь, взятая в количестве не менее 3 мл для ДНК и 5 мл для РНК в одноразовую пробирку типа вакутайнер с маркировкой «ЭДТА-К3». Хранить пробирки с кровью можно не более 24 часов для ДНК и 6 часов для РНК при +4°C. Необходимо обеспечить доставку материала в клинично-диагностическую лабораторию в течение 20 часов (ДНК) и 4 часа (РНК) с момента взятия. Пробирка должна транспортироваться при соблюдении холодового режима [1, 4, 5].

Внешний контроль качества лабораторных исследований осуществляется с помощью стандартизированных панелей, содержащих определенное количество материала пригодного для осуществления анализа. Главное требование к стандартным панелям – это воспроизводительность, т.е. [7, 8, 10] получение одинаковых результатов при каждом последующем тестировании в различных лабораториях. Это может быть достигнуто путем стабилизации (сохранении образцов) в течении длительного времени (1 год и более). Учитывая срок сохранности генетического материала 6 и 24 часа, а также условия жаркого климата (Средняя Азия) и больших расстояний между центрами, реализовать данный момент для ПЦР исследованием с обычным образцом крови пациента не является возможным [2, 3]. Одним из выходов из данного положения может стать использование альтернативного метода «Сухая пробирка».

Цель: Оценить диагностическую эффективность метода «Сухая пробирка» для проведения контроля качества ПЦР исследований.

Материал и методы исследований: Научно исследовательская работа проведена в лаборатории Референс (2016-2018 гг.) НИИ Вирусологии в Республике Узбекистане. Заведующая Референс лаборатории: к.м.н. Л.Э. Алиева, Директор НИИ Вирусологии Э.И. Мусабоев. Исследование проводилось такой последовательности. Были взяты образцы крови у 40 пациентов больных ВИЧ и 30 пациентов больных Гепатитом С. Взята кровь у 70 пациентов больных с положительной на ВИЧ инфекцию и Гепатит С, проводилось исследование выделенной плазм традиционным методом, т.е. ПЦР. На следующем этапе приготовленная альтернативным «Сухая пробирка» методом, т.е. свежая взятая образец крови выделена плазма, на 2 специальные пробирки отдельно по 20 мл наливались.

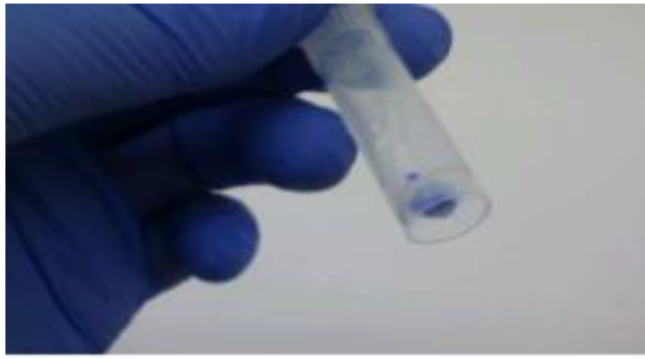


Рисунок 1. Сухая пробирка.

Взятые клинические материалы после высушивания при комнатной температуре через день в первой пробирке, через 15 дней во второй пробирке проводилась исследование при хранении в комнатных условиях. Перед началом исследования проводилось разведение с помощью специального вещества (PBS-Tween buffer, 0,1 M phosphate-buffered saline, pH 7,4, USA), изучалась вирусная нагрузка в составе плазмы крови методом ПЦР.

Результаты. На первом этапе нашего исследования результаты 24-часового хранения клинических материалов, подготовленные альтернативным методом «Сухая пробирка» у пациентов, инфицированных ВИЧ-инфекцией и гепатитом С, составили 74,2%. Этот результат не был адекватным результатом для реализации альтернативной «Сухая пробирка». По этой причине клинический материал, подготовленный «Сухая пробирка» хранился Референс лаборатории ВИТИ в течение 15 дней при комнатной температуре и снова модифицировался до стандартной инструкции. То есть время экспозиции экстракции ДНК составляет 30 мин 65 градусов Цельсия, и мы превратили ее в 65°C 30 мин + 60 мин (таб. 1).

Таблица 1.

Результаты полученные в ПЗР после 15 дней высушивания клинических материалов, собранных в методе «Сухая пробирка» (ВИЧ-инфекция)

№	Альтернативный метод после 15 дней	№		№	
1	$4,2 \cdot 10^6$	14	$5,5 \cdot 10^5$	27	$2,6 \cdot 10^4$
2	$8,9 \cdot 10^4$	15	$4,5 \cdot 10^5$	28	$5,7 \cdot 10^4$
3	$3,3 \cdot 10^4$	16	$1,3 \cdot 10^3$	29	$2,0 \cdot 10^4$
4	$1,7 \cdot 10^5$	17	$1,0 \cdot 10^4$	30	$3,0 \cdot 10^4$
5	$4,0 \cdot 10^3$	18	$6,1 \cdot 10^3$	31	$2,1 \cdot 10^4$
6	$9,7 \cdot 10^5$	19	$5,7 \cdot 10^4$	32	$1,1 \cdot 10^5$
7	$1,8 \cdot 10^4$	20	$2,3 \cdot 10^4$	33	$1,7 \cdot 10^3$
8	$7,1 \cdot 10^5$	21	$2,6 \cdot 10^5$	34	$7,8 \cdot 10^5$
9	$3,9 \cdot 10^3$	22	$4,0 \cdot 10^4$	35	$2,3 \cdot 10^5$
10	$3,2 \cdot 10^6$	23	$3,6 \cdot 10^4$	36	$2,7 \cdot 10^4$

11	$1,6 \cdot 10^5$	24	$7,4 \cdot 10^5$	37	$3,0 \cdot 10^4$
12	$5,3 \cdot 10^3$	25	$5,2 \cdot 10^4$	38	$9,3 \cdot 10^3$
13	$1,1 \cdot 10^4$	26	$3,6 \cdot 10^2$	39	$2,4 \cdot 10^3$
				40	$3,6 \cdot 10^3$

В этой таблице (таблица 1), если были обнаружены результаты 15-дневного при комнатной температуре скрининга клинических материалов, полученных от больных с ВИЧ-инфекцией у 1 пациентов 10^2 (2,5%), у 9 из 40 пациентов (22,5%) было 10^3 , у 17 (42,5%) и у 11 пациентов 10^5 (27,5%), у 17 пациентов - 10^4 (42,5%), у 2 пациентов 10^6 (5%). По сравнению с результатами нашей контрольной группы результаты составили чувствительность 97,1% 39/40, специфичность 100% 40/40. От пациентов с вирусом Гепатита С плазму крови, полученную по методу «Сухая пробирка», детектировали в молекулярно-генетически управляемой вирусной нагрузке после 23-25⁰С при комнатной температуре в течение 15 дней (таб. 2).

Таблица 2.

Результаты полученные в ПЗР после 15 дней высушивания клинических материалов, собранных в методе «Сухая пробирка» (Гепатит С)

№	Альтернативный метод	№	№	№	№
№	После 15 дней	№	№	№	№
1	$7,9 \cdot 10^5$	11	$8,0 \cdot 10^2$	21	$3,1 \cdot 10^5$
2	$1,4 \cdot 10^6$	12	$4,4 \cdot 10^6$	22	$2,0 \cdot 10^5$
3	$1,1 \cdot 10^5$	13	$3,1 \cdot 10^4$	23	$6,2 \cdot 10^3$
4	$1,2 \cdot 10^6$	14	$5,4 \cdot 10^4$	24	$5,0 \cdot 10^3$
5	$6,4 \cdot 10^5$	15	$3,6 \cdot 10^5$	25	$3,8 \cdot 10^5$
6	$2,1 \cdot 10^6$	16	$7,3 \cdot 10^5$	26	$6,0 \cdot 10^3$
7	$5,0 \cdot 10^6$	17	$1,9 \cdot 10^5$	27	$4,3 \cdot 10^3$
8	$6,0 \cdot 10^6$	18	$3,2 \cdot 10^4$	28	$5,2 \cdot 10^3$
9	$2,4 \cdot 10^6$	19	$4,2 \cdot 10^4$	29	$6,1 \cdot 10^5$
10	$2,5 \cdot 10^4$	20	$3,8 \cdot 10^5$	30	$4,0 \cdot 10^5$

В этом исследовании результаты 15-дневного хранения клинического материала, собранного у пациентов с Гепатитом С были определены у 5 из 30 пациентов у 1 больного 10^2 (3,4%), у 5 больного 10^3 (16,7%), у 5 больного 10^4 (16,7%), и у 12 больного 10^5 (40%), у 7 пациентов 10^6 (23,3%) вирусной нагрузкой. По сравнению с результатами нашей контрольной группы результаты составили 97,1% в 29/30, 100% 30/30 у пациентов с высокой вирусной нагрузкой.

Результаты традиционных и альтернативных методов клинических материалов от ВИЧ-инфицированных и больных Гепатитом С сравнивались с показателями вирусной нагрузки (табл. 3, 4).

Таблица 3.

Сравнительная оценка эффективности определения ВИЧ-инфекцию традиционным и методом «Сухая пробирка»

Вирусная нагрузка	Абс (плазма)	%	Абс (сп) + После 24 часов	%	Абс (сп) + После 15 дней	%
10^3	10	25	7	17,5	9	22,5
10^4	17	42,5	10	25	17	42,5
10^5	11	27,5	11	27,5	11	27,5
10^6	2	5	2	5	2	5
	40	100	30	74,2	39	97,1

Как показано в таблице 3. при проверке плазм крови у 40 пациентов с ВИЧ-инфекцией традиционным и альтернативным методом, когда мы распределили результаты по вирусной нагрузке, в традиционном методе 10^3 10 из них (25%), 10^4 17 - (42,5%), 10^5 11 - (27,5%), 10^6 2 - (5%) обнаружены у пациентов. В альтернативном методе после 1 дня у 7 больных из 40 10^3 (17,5%), 10^4 10 - (25,%), 10^5 11 - (27,5%), 10^6 2 - (5%) обнаружены пациентов, после 15 дней изменили инструкцию по проведению ПЦР и были получены следующие данные 10^3 9 из них (22,5%), 10^4 17 - (42,5%), 10^5 11 - (27,5%), 10^6 2 - (5%) обнаружены пациентов.

Таблица 4.

Сравнительная оценка эффективности определения Гепатитом С традиционным и методом «Сухая пробирка»

Вирусная нагрузка	Абс (плазма)	%	Абс (сп) + после 24 часов	%	Абс (сп) + после 15 дней	%
10^3	6	20	3	10	5	16,7
10^4	5	16,7	2	6,7	5	16,7
10^5	12	40	10	33,3	12	40
10^6	7	23,3	7	23,3	7	23,3
	30	100	22	74,2	29	97,1

Как показано в таблице 2 при проверке плазм крови у 30 пациентами с Гепатитом С традиционными и альтернативными методами, когда мы распределили результаты по вирусной нагрузке, в традиционном методе 10^3 6 из них (20%), 10^4 5 - (16,7%), 10^5 12 - (40%), 10^6 7 - (23,3%) обнаружены

пациентов. В альтернативном методе после 24 часов 10^3 3 из них (10%), 10^4 2 - (6,7%), 10^5 10 - (33,3%), 10^6 7 - (23,3%) обнаружены пациентов, после 15 дней изменили инструкцию по проведению ПЦР и были получены следующие данные 5 из них 10^3 (16,7%), 10^4 5 - (16,7%), 10^5 12 - (40%), 10^6 7 - (23,3%) обнаружены пациентов.

В проведенном тесте альтернативного метода было обнаружена, что в 70 (плазменных) образцах пациентов имеющих положительный ВИЧ-статус (40 человек) и Гепатит С (30 человек) имели вирусную нагрузку в 1 мл плазмы содержалось 1000 вирусных единиц.

Сравнительная оценка показала что метод «Сухая пробирка» после 1 дня исследования выявляет специфичность - 74,2%, чувствительность - 100%, а через 15 дней даёт высокую специфичность - 97,1%, чувствительность - 100%. (продлить время экспозиции и экстракции из 30' 65°C на 15 дней КТ + 60' 65°C) $P < 0,001$ (таб. 5).

Таблица 5.

Характеристика различных подходов к проведению тестирования образцов «Сухая пробирка» на наличие ДНК ВИЧ и Гепатита С

Тест	Материал тестирования	Набор для выделения ДНК	Получение элюата из «сухой пробирки»	Время экспозиции «сухой пробирки» до экстракции	Объемы отмывающих растворов	Чувствительность	Специфичность
По инструкции	Сухая пробирка	Рибо-преп	Раствор для лизиса (700 мкл)	30' 65°C	№3 500 мкл, №4 200 мкл.	74,2% ** (52/70)	100% 70/70
Тест 1	Сухая пробирка	Рибо-преп	Раствор для лизиса (700 мкл)	60' КТ+30' 65°C	№3 500 мкл, №4 200 мкл.	97,1%* (68/70)	100% 70/70

Примечание: КТ - комнатная температура, 30' 60' - 30 и 60 минут.

Достоверность отличий от результатов тестирования вирусной нагрузки (McNemartest)*- $p < 0,01$, ** - $p < 0,001$.

Выводы:

1. В традиционном методе было обнаружено, что в образцах крови у ВИЧ-инфицированных 17 пациентов 10^4 (42,5%) и у 12 пациентов с Гепатитом С (30) 10^5 (40%) вирусная нагрузка была высокой и специфичность - 100% и чувствительность 70/70.

2. После 24 часов скрининга в СП вирусная нагрузка 10^4 (33,3%) пациентов с Гепатитом С оказалась высокой в 15 случаях - 10^4 (%) ВИЧ-инфицированных пациентов (40). Однако чувствительность составило 74,2% 30/40 и 100% 40/40 экземпляров, Гепатит С 74,2% 22/30 и специфичность 100% 30/30.

3. В сравнение СП с традиционным методом после 24 часов у 40 ВИЧ-инфицированных и у 30 Гепатита С чувствительность снижался на 25,8% по сравнению с результатами традиционного метода, а чувствительность составило - 100% 70/70.

4. Набор Рибо-преп для диагностики ВИЧ-инфекцией и Гепатита С методом ПЦР даёт более эффективную результативность, если продлить время экспозиции и экстракции из 30' 65°C на 60' КТ + 30' 65°C. Сравнительная оценка показала что метод «Сухая пробирка» даёт высокую специфичность - 97,1% и чувствительность - 100%, $P < 0,001$, после изменения инструкции.

Список литературы

1. Акчурина Л.Б., Анохин В.А., Хасанова Г.Р. и др. Полиморфизмы Толл-Лайк-рецептора 4 и ВИЧ-инфекция // Инфекционные болезни - 2014. - Т.12. №3. - С. 5-10.

2. Беспалова Л.Ю. Диагностика ВИЧ-инфекции у зависимых от психоидов людей в Казахстане // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии - 2012. - Т.4. №2. - С. 95-100.

3. Даминова Т.А. Учебно-методическое пособие для студентов и врачей общей практики // ВИЧ-инфекция - 2010.

4. Дмитриева Л.В., Гутникова М.Ю., Костюнина Л.М. и др. Использование современных тест-систем в диагностике ВИЧ-инфекции (Случай из практики) / Актуальные вопросы ВИЧ-инфекции, материалы Международной научно-практической конференции - 2016. - С. 245-247.

5. Долгушин И.И., Гизингер О.А., Шишкова Ю.С. и др. ВИЧ-инфекция: этиология, патогенез, лабораторная диагностика: учебно-методическое пособие для студентов - Челябинск, - 2014. - 77 с.

6. Зайцева Н.Н., Пекшева О.Ю., Парфенова О.В. и др. Современные молекулярно-генетические методы исследования в характеристике изолятов ВИЧ-1 инфицированных пациентов учреждений пенитенциарной системы // Медицинский альманах - 2015. - №5 - С. 148-151.

7. Кан Н.Г., Латипов Р.Р., Онгарбаев А.Б. и др. Применение метода «сухой капли» при иммуноферментном анализе // Вестник врача общей практики - 2006. - №1-2 - С. 62.

8. Казеннова Е.В., Васильев А.В., Лаповок И.А. и др. Проблемы субтипирования ВИЧ-1 на основе анализа гена *pol* и способы их разрешения // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии - 2010, - Т.2, №3, - С. 42-48.

9. Лисицина З.Н., Крутицкая Л.И., Дементьева Н.Е. Затраты на лабораторную диагностику ВИЧ-инфекции согласно стандартам медицинской помощи при болезни, вызванной ВИЧ // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии - 2014. - Т.6. №1. - С. 84-89.

10. Низамутдинова Р.С., Хасанова Г.М., Галина В.Р. Заболеваемость ВИЧ/СПИДом населения городской поликлиники, современные подходы к ведению больных / Фундаментальные и прикладные аспекты современной инфектологии: сборник научных статей участников Всероссийской научно-практической конференции – Уфа, ИЦИПТ - 2017. - С. 68-72.

11. Fernández McPhee C., Álvarez P., Prieto L.J. et al. HIV-1 infection using dried blood spots can be confirmed by Bio-Rad Geenius HIV 1/2 confirmatory assay // J Clin Virol. - 2015; - 63: - P. 66-69.

© Жумамуродов С.Т., Ёдгорова Н.Т., Орынбаева З.Н., 2018.

