

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА  
ФБУН ЦНИИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ РОСПОТРЕБНАДЗОРА  
НЕКОММЕРЧЕСКОЕ ПАРТНЁРСТВО «НАЦИОНАЛЬНОЕ НАУЧНОЕ ОБЩЕСТВО ИНФЕКЦИОНИСТОВ»

# МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА 2014



VIII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ  
ДИАГНОСТИКА**

**2014**

[www.md2014.ru](http://www.md2014.ru)

**СБОРНИК ТРУДОВ  
VIII ВСЕРОССИЙСКОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ  
КОНФЕРЕНЦИИ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ**

**Том I**

Москва, 2014

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

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 ПАРТНЕРСТВО «НАЦИОНАЛЬНОЕ НАУЧНОЕ ОБЩЕСТВО ИНФЕКЦИОНИСТОВ»

**VIII Всероссийская научно-практическая конференция  
с международным участием**

## **«МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА -2014»**

**СБОРНИК ТРУДОВ**

Под редакцией академика РАН В.И. Покровского

**ГЕНЕРАЛЬНЫЙ СПОНСОР: ООО «ИнтерЛабСервис»**

**ТОМ I**

Москва  
2014

**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.  
Гущин А.Е.  
Жигалева О.Н.  
Карандашова И.В.  
Карань Л.С.  
Киреев Д.Е.  
Коновалов А.  
Коновалов А.С.  
Кувевда Д.А.  
Кураков С.В.  
Маркелов М.Л.  
Мионов К.О.  
Неверов А.Д.  
Подколзин А.Т.  
Рыжих П.Г.  
Творогова М.Г.  
Чуланов В.П.  
Шипулина О.Ю.  
Яцышина С.Б.

**М75 Молекулярная диагностика. Сб. трудов / колл. авт., под ред. В.И. Покровского. – Т. 1 – М.: ООО "Издательство МБА", 2014. – 560 с.**

ISBN 978-5-906325-79-2  
ISBN 978-5-906325-80-8

В первом томе Сборника трудов конференции «Молекулярная диагностика 2014» представлены результаты научных исследований российских и зарубежных специалистов в области молекулярной диагностики социально-значимых инфекционных болезней человека.

Значительное место уделено вопросам молекулярной диагностики ВИЧ- и ВИЧ-ассоциированных инфекций, туберкулеза, вирусных гепатитов, инфекций органов репродукции, папилломавирусной инфекции, инфекций верхних и нижних дыхательных путей.

Отдельные разделы сборника посвящены вопросам диагностики и изучения инфекций беременных и новорожденных, заболеваний, ассоциированных с условно-патогенной флорой, инфекций с фекально-оральным механизмом передачи, нейроинфекций.

Также освещены вопросы молекулярной диагностики инфекций в трансфузиологии и трансплантологии, рассмотрены новые подходы выявления возбудителей особо опасных, природно-очаговых, внутрибольничных и оппортунистических инфекций, представлены результаты применения молекулярных методов при изучении геогельминтозов, паразитарных и тропических заболеваний.

Для специалистов в области лабораторной диагностики и научных работников. Сборник будет интересен врачам клинической лабораторной диагностики, инфекционистам, гинекологам, урологам, дерматовенерологам, гепатологам, пульмонологам, фтизиатрам, трансфузиологам, трансплантологам, генетикам, судебно-медицинским экспертам, эпидемиологам, врачам общей практики, ветеринарным врачам, студентам медицинских и ветеринарных учебных заведений.

Издано в Российской Федерации по решению Организационного комитета VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2014».

**УДК 577.21**  
**ББК 28.04**

© Коллектив авторов, 2014

ISBN 978-5-906325-80-8



**Состав организационного комитета VIII Всероссийской научно-практической  
конференции с международным участием  
«МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА 2014»**

---

**Сопредседатели:**

- Попова А.Ю. - Врио руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, д.м.н., профессор
- Покровский В.И. - Директор ФБУН Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, д.м.н., профессор, академик РАМН

**Ответственный секретарь:**

- Шипулин Г.А. - Заведующий отделом молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, к.м.н.

**Члены организационного комитета:**

- Баранов В.С. - Заведующий лабораторией пренатальной диагностики врожденных и наследственных болезней ФГБУ «НИИАГ им. Д.О. Отта» СЗО РАМН, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАМН (по согласованию)
- Власов В.В. - Директор ФБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, д.х.н, профессор, академик РАН (по согласованию)
- Вороненко Ю.В. - Ректор НМАПО имени П. Л. Шупика Минздрава Украины, академик Национальной академии медицинских наук Украины, д.м.н., профессор (по согласованию)
- Глыбочко П.В. - Ректор ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАМН (по согласованию)
- Горбунов В.А. - Директор ГУ Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии Минздрава Республики Беларусь, к.м.н. (по согласованию)
- Дзюблик И.В. - Заведующий кафедрой вирусологии НМАПО имени П. Л. Шупика Минздрава Украины, д.м.н., профессор (по согласованию)
- Дмитриева Н.В. - Заведующая лабораторией микробиологической диагностики и лечения инфекций в онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, д.м.н., профессор (по согласованию)
- Дубина М.В. - Первый проректор по научной работе - директор центра нанотехнологий Санкт-Петербургского Академического университета - научно-образовательного центра нанотехнологий РАН, д.м.н., член-корреспондент РАН
- Дятлов И.А. - Директор ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАМН
- Ежлова Е.Б. - Начальник Управления эпидемиологического надзора Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, к.м.н.
- Жебрун А.Б. - Директор ФБУН НИИЭМ им. Пастера, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАМН
- Жибурт Е.Б. - Проректор по научно-образовательной работе ФГУ Национальный медико-хирургический центр имени Н.И. Пирогова Минздрава России, д.м.н., профессор, академик РАМН (по согласованию)
- Зверев В.В. - Директор ФГБУ ВНИИВиС РАМН, д.м.н., профессор, академик РАМН (по согласованию)
- Иванов А.М. - Заведующий кафедрой клинической биохимии и лабораторной диагностики ГБОУ ВПО ВМедА им. С.М.Кирова, главный лаборант Министерства обороны РФ, д.м.н., профессор (по согласованию)
- Иванов П.Л. - Заместитель директора ФГБУ Российский центр судебно-медицинской экспертизы Минздрава России, руководитель специализированного центра молекулярно-генетической экспертизы Минздрава России, д.б.н., профессор (по согласованию)

Максимально высокий уровень ВН среди всех наблюдений составил более 10000000 копий/мл. Уровень вирусной нагрузки менее 50000 копий/мл зарегистрирован у 104 (55,6%; 95% ДИ: 48,2-67,9%) пациентов; уровень выше 50000 копий /мл – у 83 (44,4%; 95 % ДИ: 37,1-51,8%).

Проведен анализ уровня ВН у пациентов выявленных в течение 2013 года (год первого иммунного блота) и вставших на учет в этом же году. Диагноз острой ВИЧ-инфекции установлен у 4-х пациенток, уровень ВН исследован у 3-х (у 2-х более 100 000 копий/мл, у 1-й – до 50000 копий/мл). При острой инфекции может регистрироваться очень высокий уровень ВН (миллионы копий). В остальных случаях повышение уровня ВН связано с прогрессией болезни. Исследование ВН и возраста ВИЧ-позитивных выявило: из 34 пациентов в возрасте 20-29 лет уровень ВН более 1000000 копий/мл зарегистрирован у 7 (20,6%, 95% ДИ: 8,7-37,9%); среди 43 пациентов в возрасте 30-39 лет – у 17 (39,5%, 95% ДИ: 25-55,6%); из 27 паци-

ентов в возрасте 40 лет и старше – у 12 (44,5%, 95% ДИ: 25,5-64,7). Чем старше пациенты (для выявленных в год установления диагноза) тем более часто регистрируется высокий уровень ВН. Высокой уровень ВН свидетельствует о значительном числе лиц, которым диагноз установлен при прогрессии болезни.

**Заключение/выводы.** Высокий уровень ВН у пациентов с впервые диагностированной ВИЧ-инфекцией (более 100 тыс. копий РНК ВИЧ/мл) зарегистрирован у 2 женщин с острой ВИЧ-инфекции и 65 пациентов (мужчин – 46; женщин – 19) (34,7%, 95% ДИ: 28-43,1%) при прогрессии болезни. Высокий уровень ВН отражает не только прогрессию заболевания, но и повышает возможность инфицирования контактных лиц. Требуется дальнейшего изучения вопрос, отражает ли такой процент пациентов с высоким уровнем вирусной нагрузки ситуацию только в Промышленном районе или иллюстрирует проблему ВИЧ-инфекции в Самарской области..

## ОПЫТ СОВМЕСТНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА И ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДАВНОСТИ ИНФИЦИРОВАНИЯ ПРИ РАССЛЕДОВАНИИ ВНУТРИБОЛЬНИЧНОГО ЗАРАЖЕНИЯ ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ

**Нешумаев Д.А., Татьяна Е.А., Малышева М.А., Шевченко Н.М., Кокотюха Ю.А., Мейрманова Е.М., Виноградова М.Н., Уланова Т.И.\*, Загрядская Ю.Е.\***

*КГБУЗ Краевой Центр СПИД, г. Красноярск, Россия*

*\*НПО «Диагностические системы», г. Нижний Новгород, Россия*

### Введение

Филогенетический анализ неоднократно использовался при расследовании умышленных или халатных случаев заражения ВИЧ-инфекцией. Сравнение нуклеиновых кислот ВИЧ, выделенных у различных лиц, позволяет с высокой степенью достоверности установить взаимосвязанность/несвязанность случаев заражения между собой. Эволюция нуклеиновых кислот в отсутствие селективного влияния лекарственных препаратов труднопредсказуема, поэтому установить во временной шкале кто являлся источником вируса крайне проблематично. Поэтому ключевой вопрос кто кого заразил, чаще всего приходится устанавливать по косвенным часто субъективным признакам. Вместе с тем, изменение свойств антител вырабатываемых на инфекционный агент подчинено более строгим закономерностям, что позволяет использовать эту зависимость для установления трансмиссии вируса.

В 2011 году в Красноярском крае был выявлен случай ВИЧ-инфекции с предположительно внутрибольничным путем инфицирования. Расследование пути передачи вируса привело к последующему судебному процессу, в котором проведенные лабораторные исследования были приняты к вниманию.

**Цель исследования:** определить источник и направление передачи ВИЧ-инфекции используя филогенетический анализ и исследование на давность заражения.

### Материалы и методы

Исследование выполнено на базе КГБУЗ Краевой Центр СПИД. Было проведено эпидемиологическое исследование с применением молекулярно-генетических и иммуноферментных исследований плазмы крови пред-

полагаемых источника и реципиента вируса. Для определения давности заражения ВИЧ использовалась тест-система ДС-ИФА-ВИЧ-АТ-срок (НПО «Диагностические системы»). В соответствии с инструкцией к тест-системе срок заболевания ранжировался на две категории: от момента вероятного заражения прошло менее 9 месяцев или пациент инфицирован более 9 месяцев.

Секвенирование генома ВИЧ проводилось с использованием тест-системы ViroSeq (Celera) по участку *pol*, охватывающему весь ген протеазы и 2/3 гена обратной транскриптазы. Детекция продуктов амплификации проводилась на генетическом анализаторе Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems).

Филогенетический анализ проведен с помощью программы Mega 4. Построение филогенетического дерева было осуществлено по методу Нейбор-Джойни и максимального правдоподобия. В качестве группы сравнения использовалось 40 образцов Красноярских ВИЧ-инфицированных пациентов обоого пола проанализированных в аналогичный период времени, а также 25 сиквенсов различных субтипов ВИЧ взятых из международной базы данных GenBank. Достоверность полученного дерева оценивалась в бутстрэп-анализе, тесте вращения ветвей для тысячи случайных перепостроений.

### Результаты и обсуждение

ВИЧ-инфекция установлена у 68-летней женщины. Социально адаптирована, прием внутривенных наркотических средств отрицает, половой жизнью на протяжении последних нескольких лет не живет. Единственный предполагаемый фактор передачи ВИЧ-инфекции установленный после проведения эпидемиологического исследования – недавнее нахождение пациентки в одной из

городских больниц г. Красноярск. Было установлено, что во время пребывания в стационаре ей вводились внутривенные лекарственные препараты через подключичный катетер. Также в данном отделении находился мужчина с установленным в 2006 году диагнозом ВИЧ-инфекция.

Проведенное филогенетическое исследование позволило установить высокую степень совпадения РНК ВИЧ выделенных у диспансерного пациента и вновь выявленной женщины. Во всех случаях перепостроения филогенетических деревьев эти два лица кластеризовались вместе.

На этом этапе невозможно достоверно установить, кто является источником инфицирования, несмотря на то, что у мужчины ВИЧ-инфекция была выявлена раньше.

На этот вопрос помогло ответить иммуноферментное исследование плазмы обоих лиц на давность заражения. В результате выявлено, что женщина находится на ранней стадии заражения (до 9 месяцев), а диспансерный пациент на поздней. Дополнительным контролем точности лабораторного заключения о длительности инфицирования послужило наше знание об анамнезе заболевания диспансерного пациента.

Необходимо отметить, что исследование на давность заражения как и филогенетический анализ не

может во всех случаях гарантировать 100% точность. Согласно инструкции к тест-системе прогностическая погрешность теста на уровне 5%. Тем не менее, совокупность многих методов с высокими диагностическими характеристиками позволяет приблизить вероятность неверного заключения к нулю.

Полезность использования этого теста при филогенетическом анализе можно показать и с экономической точки зрения. Определение давности заражения ВИЧ – это иммуноферментный анализ, который в разы дешевле, чем молекулярно-генетические исследования и не требует особо подготовленного персонала или дополнительного оборудования. Таким образом, если сравнить приращение итоговой стоимости к ценности получаемой информации, то затраты в большинстве случаев можно признать эффективными.

#### **Выводы**

Совместное использование филогенетического анализа и определение давности заражения ВИЧ позволяет в некоторых случаях установить не только взаимосвязанность инфицирований, но и определить источник заболевания.

## **ОСОБЕННОСТИ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА CD4+ Т-ЛИМФОЦИТОВ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ С НАРУШЕННЫМ ВОССТАНОВЛЕНИЕМ ИММУНИТЕТА ПРИ ПРОВЕДЕНИИ АНТИРЕТРОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ**

Сайдакова Е.В.<sup>1</sup>, Королевская Л.Б.<sup>1</sup>, Шмагель Н.Г.<sup>2</sup>, Шмагель К.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

<sup>2</sup>ГКУЗ Пермский краевой центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, Пермь, Россия

Применение высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ) приводит к подавлению репликации ВИЧ, росту числа CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов периферической крови и, как следствие, увеличению продолжительности и улучшению качества жизни ВИЧ-инфицированных больных. Однако у 10–30% пациентов, получающих ВААРТ, не происходит прироста количества CD4<sup>+</sup> Т-клеток, несмотря на значительное снижение вирусной нагрузки. Этот феномен получил название «иммунологический неответ». Причины нарушения восстановления численности CD4<sup>+</sup> Т-клеток при эффективном подавлении репликации ВИЧ остаются неизвестными.

**Целью** настоящего исследования была оценка субпопуляционного состава CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов ВИЧ-инфицированных пациентов с неэффективным восстановлением иммунитета при проведении ВААРТ.

Всего было обследовано 100 человек. В основную исследуемую группу вошли 38 ВИЧ-инфицированных пациентов с ослабленным приростом количества CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов (<350кл/мкл) спустя 2 года терапии – иммунологические неответчики (ИН). Группа сравнения была представлена ВИЧ-инфицированными больными со стандартным увеличением числа CD4<sup>+</sup> Т-клеток (>350кл/мкл) через 2 года ВААРТ (n=42) – иммунологические ответчики (ИО). В дополнительную контрольную группу вошли относительно здоровые добровольцы без ВИЧ-инфекции (n=20) – К. Каждый пациент дал письменное информированное согласие на участие в

исследовании. У всех обследованных было определено число лейкоцитов, лимфоцитов, CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток в периферической крови. В пулах CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов проанализированы абсолютные и относительные количества наивных клеток, клеток центральной и эффекторной памяти, а также терминальных эффекторов. Анализ проводили на проточном цитометре BD LSR II. Вычисления осуществляли с использованием пакета компьютерных программ «Stata11 SE».

В крови ИН было выявлено существенное снижение абсолютного и относительного количества лимфоцитов (РИН-ИО<0,01), в то время как отличий по абсолютному числу лейкоцитов у пациентов исследованных групп обнаружено не было (РИН-ИО>0,05). Полученные в группе ИН низкие значения были обусловлены значительным дефицитом абсолютного и относительного количества CD4<sup>+</sup> Т-клеток у данной категории больных (РИН-ИО<0,001).

В пуле CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов у ИН было зафиксировано увеличение процентного содержания клеток центральной памяти относительно аналогичного показателя ВИЧ-инфицированных больных, эффективно отвечающих на терапию: ИН – 37% (квартильный размах (к.р.): 27–44%); ИО – 29% (к.р.: 23–35%); К – 29% (к.р.: 23–38%); РИН-ИО<0,01. В субпопуляциях наивных CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, клеток эффекторной памяти и терминальных эффекторов статистически достоверных отличий в относительном количестве клеток выявлено не было (РИН-ИО>0,05).