

не является универсальным. По мнению Европейской ассоциации урологов, у пациентов с нормальным уровнем ПСА крови (3,1–4,0 нг/мл) риск РПЖ составляет 26,9%. В настоящее время существует более 200 химических соединений, встречающихся при этом заболевании. В последнее время все более очевидно, что анализ и клиническая интерпретация моновещества для ранней диагностики и мониторинга пациентов не удовлетворяет требованиям медицины XXI века.

Авторский коллектив видит решение данного вопроса в разработке и создании геномно-протеомной системы для прогнозирования развития, ранней диагностики, мониторинга, подбора индивидуальной терапии и оценки результатов лечения пациентов с РПЖ.

Для разработки диагностической системы выполняется проспективное обследование и динамическое наблюдение 1500 пациентов с РПЖ. Для выделения группы полиморфизмов (SNP's), встречающихся у этих пациентов, проводили мини-секвенирование с последующим анализом продуктов на времяпролетном масс-спектрометре Reflex IV (Bruker Daltonics, Германия) (MALDI-TOF based mini-sequencing) в линейном режиме, положительной моде (регистрация положительно заряженных ионов), используя азотный лазер с длиной волны 337 нм и частотой импульса 9 Гц. Фрагменты генов, содержащих области анализируемых полиморфизмов, получали в ходе полимеразной цепной реакции.

Для определения белков плазмы и мочи выполняется высокоточная масс-спектрометрия (MALDI-Mass spectrometry)

и ИФА (ELISA). Спектры MS-MS-фрагментации трипсиновых пептидов получали с использованием масс-спектрометра MALDI-TOF Ultraflex (Bruker Daltonics, Германия), укомплектованного УФ-лазером с длиной волны 337 нм, в режиме регистрации положительно заряженных ионов. Точность определения отношения молекулярной массы и заряда ионов-фрагментов составляла 0,03%. Стратификация диагноза осуществляется по результатам морфологического исследования биопсийного материала с иммуногистохимией.

Определение серии полиморфизмов (SNP's), характерных для РПЖ, позволит выявлять риск-группу пациентов по данному заболеванию и осуществлять диспансеризацию. Определение белков, специфичных для РПЖ, позволяет выявлять самую раннюю (доклиническую) стадию заболевания. Вместе с этим выделенные в настоящий момент белки и метаболиты. Аннексин III (ANXA3, Annexin A3), саркозин (sarcosine) и др., их корреляция с ПСА и -2PROPSA обладают большей чувствительностью и специфичностью, чем ПСА.

Таким образом, созданная научно-практическая модель геномно-протеомной системы позволит выделить группу риска по РПЖ из наблюдаемой популяции и организовать диспансеризацию с индикаторами контроля качества. В клинической практике данная технология молекулярной биологии позволит врачу-онкоурологу осуществлять лечебно-диагностический менеджмент, а не только констатировать факт заболевания у пациента.

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ЛАБОРАТОРНОЙ АНАЛИТИКИ

А. А. Кубанова, А. А. Кубанов, Н. В. Фриго, Р. Ф. Хайруллин, С. В. Ротанов. **Разработка биочипа для диагностики сифилиса путем одновременного определения антител к кардиолипину и специфическим антигенам *T. pallidum*.** ФГБУ ГНЦДК Минздравсоцразвития России, Москва

В соответствии со стандартами оказания медицинской помощи больным сифилитической инфекцией при установлении клинического диагноза и последующем клинико-лабораторном наблюдении необходимо применять трепонеменные и нетрепонеменные тесты в разных сочетаниях. Одновременное определение антител к кардиолипину и антигенам *T. pallidum* в формате одного теста позволяет повысить эффективность и качество диагностики.

Цель исследования – разработка полезной модели биочипа для одновременного определения антител к кардиолипину и специфическим антигенам *T. pallidum*.

Материалами для разработки биочипа являлись рекомбинантные химерные полипептиды-аналоги антигенов *T. pallidum* (Tr15, Tr17, TmpA, Tr47), кардиолипин, бычий сывороточный альбумин, флуорофоры Cy5 и Cy3, микроскопные альдегидные слайды, а также образцы сыворотки крови больных сифилисом и здоровых лиц.

Разработанный биочип для иммунологического исследования представляет собой стеклянный или полимерный слайд с модифицированной поверхностью, разделенный на повторяющиеся зоны-эрреи для одновременного определения в биологических образцах человека антител (классов G и M) к кардиолипину и антигенам *T. pallidum*. Внутренняя структура эрреев содержит раздельно иммобилизованные в определенной последовательности и необходимом числе повторов трепонеменные антигены Tr15, Tr17, Tr47, TmpA, кардиолипиновый антиген, маркеры границ и внутренние контроли. Каждый слайд рассчитан на исследование 10 образцов, включая необходимые контроли. Для обеспечения иммунологического исследования разработаны необходимые

буферные растворы, реагенты, температурные условия и время экспозиции на каждом этапе. Для считывания и анализа результатов исследования адаптирована компьютерная программа многоканального сканера для микроскопных слайдов.

Разработанный формат биочипа позволил подать заявку на его патентование в качестве полезной модели, а также осуществлять комплекс необходимых испытаний для регистрации в Российской Федерации в качестве изделия медицинского назначения.

Н. Ф. Тимченко, М. Б. Раев, Б. Г. Андрюков, Е. П. Недашкова, Е. В. Персиянова. **Экономичное, быстрое и безинструментальное определение антител к *Yersinia pseudotuberculosis* с помощью сконструированной тест-системы на основе конъюгированных наночастиц углерода в формате иммуномембранных технологий.** ФГБУ НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН, Владивосток; УРАН НИИ экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь

В настоящее время псевдотуберкулез (ПТ) постоянно регистрируется в различных странах, в том числе и в Российской Федерации. Чаще всего инфекция вызывается возбудителем O1 и O3 сероваром *Y. pseudotuberculosis*. Поэтому поиск высокоспецифичных, высокочувствительных и экономичных тест-систем является актуальным.

Цель работы – конструирование экономичной неферментной тест-системы для безинструментального определения антител к *Y. pseudotuberculosis* на основе конъюгированных наночастиц углерода в формате иммуномембранных технологий для повышения эффективности диагностики ПТ. В качестве источника наночастиц диаметром 162 нм использовали аморфный углерод, который получали в виде сажи путем конденсирования из пламени горящего толуола на стеклянной поверхности. Конъюгацию наночастиц осуществляли по

методу М. Б. Раева и соавт. В качестве антигена использовали комплекс антигенных белков *Y. pseudotuberculosis*, полученный по методу Н. Ф. Тимченко и соавт. В качестве основы твердофазного реагента использовали нитромембраны с диаметром пор 0,45 мкм (Bio-Rad, США).

Установлено, что разработанный безинструментальный способ диагностики ПТ путем прямой визуализации иммунного комплекса позволяет определять антитела к возбудителям ПТ разных серовариантов. Визуализация специфического комплекса осуществляется конъюгатом G-белок-углерод в течение 15 мин.

Сконструирована и охарактеризована ферментная тест-система для безинструментального определения антител к видоспецифическому антигену *Y. pseudotuberculosis* на основе конъюгированных наночастиц углерода, обладающая привлекательными процедурно-аналитическими характеристиками: более высокой чувствительностью, специфичностью, оперативностью, экономичностью, надежностью, а также отсутствием необходимости в приборном обеспечении исследований, что определяет привлекательность использования предлагаемой системы в клинической практике.

И. И. Долгушин, А. Ю. Савочкина, Ю. С. Шишкова, Т. Г. Смирнова, И. В. Пегушина, В. А. Маркова, И. Л. Батурина.
Метод обнаружения нейтрофильных внеклеточных ловушек в цервикальном секрете. ГБОУ ВПО Челябинская госакадемия Минздравсоцразвития РФ

Все большее внимание исследователей в настоящее время привлекает изучение факторов местного иммунитета репродуктивного тракта женщины на уровне шейки матки, которая является «первой линией» противомикробной защиты. Клеточный состав цервикального секрета представлен преимущественно нейтрофилами. На сегодняшний день обнаружен новый противомикробный механизм нейтрофилов, который заключается в выбросе хроматина во внеклеточное пространство.

Цель работы – разработка метода обнаружения нейтрофильных внеклеточных ловушек в цервикальном секрете.

Метод заключается в следующем. Цервикальный секрет смешивается со сложным красителем (синька Эванса, которая обеспечивает фоновое окрашивание препарата, и Sytox Green, который окрашивает экстрацеллюлярные нити ДНК и мертвые клетки). Полученный раствор инкубируют в течение 5 мин в темноте. Из окрашенного материала готовится препарат «раздавленная капля». Учет проводится с помощью люминесцентного микроскопа. Все структуры разделяются на 4 группы по дифференцированному окрашиванию. 1-я группа – жизнеспособные клетки ярко-оранжевого цвета, 2-я группа – клетки с зеленым ядром и ярко-оранжевой цитоплазмой (подвергшиеся апоптозу), 3-я группа – погибшие клетки зеленого цвета, к 4-й группе относятся свободные волокна ДНК (нейтрофильные внеклеточные ловушки). Проводится подсчет 100 структур разных групп и определяется процентное содержание каждой морфологической единицы. Благодаря использованию двух красителей, данный метод позволяет не только оценить жизнеспособность клеток, но и четко дифференцировать внеклеточную ДНК от тяжелой слизи, что в несколько раз повышает точность исследования.

Работа выполнена при поддержке Совета по грантам Президента.

В. С. Домбровский, Ю. В. Панюков. **Инновационная оптическая (безэлектродная) технология для мобильной экспресс-диагностики критических состояний.** Компания Интермедика (Москва) – официальный и эксклюзивный дистрибутор компании OPTI Medical (США) в России, Украине и странах Средней Азии

С тех пор как в 1925 г. Керридж впервые смог измерить значение рН человеческой крови, используя газовый электрод, методы определения газового и электролитного со-

става крови сильно усовершенствовались. Анализ газового и электролитного состава крови стал не только быстрым, но и мобильным. Важную роль в этом развитии сыграло появление в 1995 г. безэлектродного и безреагентного метода, использующего комбинацию измерения оптической флуоресценции и фотометрии отраженного света, реализованного американской компанией OPTI Medical в мобильных экспресс-анализаторах КЩС. Используемые в рассматриваемых анализаторах кассеты сконструированы таким образом, что определяемые аналиты крови взаимодействуют с молекулами сенсоров, делая их способными флуоресцировать, а интенсивность излучаемой флуоресценции изменяется с определенной правильностью в зависимости от концентрации ионов или парциального давления газов в образце.

В то же время один из сенсоров работает как рефлектор, обеспечивая измерение концентраций разных форм гемоглобина путем фотометрии отраженного света в красной и ближней инфракрасной частях спектра.

Не вызывает сомнений тот факт, что прямое (без гемолиза) фотометрическое измерение уровня гемоглобина является более точным методом, чем определение гематокрита с последующим расчетом содержания гемоглобина.

Согласно литературным данным, результаты измерений, полученные на экспресс-анализаторах компании OPTI Medical, достойно коррелируют с классическими методиками следующим образом:

рСО₂: коэф. корреляции OPTI/Corning 178 равен 0,998;
рО₂: коэф. корреляции OPTI/Corning 178 равен 0,995;
рН: коэф. корреляции OPTI/Corning 178 равен 0,958;
гемоглобин: коэф. корреляции OPTI/Abbot Cell Dyn равен 0,997.

Портативные анализаторы OPTI Medical, использующие для мобильной экспресс-диагностики критических состояний инновационную оптическую (безэлектродную) технологию, работают от встроенного аккумулятора при температуре от 10°C, что дает возможность их использования не только в реанимации у кровати пациента, но также в автомобилях скорой помощи и мобильных полевых госпиталях.

М. А. Горшкова, Г. П. Лапина, А. Н. Панкрушина.
Экспресс-метод количественного определения суммарной кристаллообразующей и уреазной активности мочи с целью применения в скрининговых обследованиях для выявления мочекаменной болезни. ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздравсоцразвития РФ, ФГБОУ ВПО Тверской государственной университет

Одно из основных направлений современной медицины – профилактика и раннее выявление признаков заболевания. Скрининговые обследования позволяют выявить как явные, так и субклинические нарушения функции органов. Для выявления начальных стадий мочекаменной болезни скрининг не проводится. Как правило, это случайные выявления и дальнейшая более детальная диагностика с целью уточнения диагноза. В связи с этим особый интерес представляют экспресс-методы лабораторных исследований, которые могли бы быть использованы в урологической практике клиничко-диагностических лабораторий лечебных учреждений амбулаторно-поликлинического звена для скрининговых обследований. Именно такой подход позволит эффективно установить степень риска развития мочекаменной болезни до клинических проявлений.

Для проведения скрининга при профилактических обследованиях пациентов (увеличения пропускной способности лаборатории и уменьшения себестоимости исследований) был предложен экспресс-метод количественного определения кристаллообразующей способности и уреазной активности мочи с использованием микропланшетного ридера. Таким образом, на одном микропланшете можно исследовать одновременно 46 проб мочи пациентов.

Количественное определение интенсивности помутнения проводили при использовании одного из двух видов единиц

измерения: 1 – единиц S-H, т. е. единиц помутнения по Shank-Noagland (в качестве стандарта использовали стандартные растворы из набора фирмы производителя Bio-LaChema-Test (Словакия) для определения тимоловой пробы. Расчет вели по калибровочному графику; 2 – мг/дл (для построения калибровочной кривой использовали стандартный водный раствор оксалата натрия концентрации 1,34 г/дл).

Рассчитаны аналитические характеристики предлагаемой методики, определены нормальные лабораторные показатели (значение Cut-Off для проведения скрининга), рассчитана себестоимость скринингового исследования, составившая 27,12 руб. и стоимость выявленного случая патологии – 205,67 руб. (расчеты проведены в условиях профилактического осмотра 500 студентов 1–2 курсов ТГМА).

А. А. Кишкун, С. Л. Арсенин, К. Ф. Кондратьева. Текущее состояние и новые рекомендации по тестированию гликозилированного гемоглобина. ФГУ Учебно-научный медицинский центр Управления делами Президента Российской Федерации

Гликозилированные гемоглобины – стабильные "минорные" компоненты гемоглобина, которые формируются медленно и неэнзиматически из гемоглобина и глюкозы. В норме вместе с основной фракцией гемоглобина (HbA) в крови существует небольшое количество других его «минорных» фракций. Гликозилированию преимущественно подвержен HbA1, при определении которого методом катионной хроматографии обнаруживают несколько его вариантов: HbA1a, HbA1b и HbA1c. Наиболее распространенным является HbA1c, составляющий приблизительно 60–80% от всего количества гликозилированного гемоглобина (ГНВ).

Для определения HbA1c в крови используются следующие методы:

- катионообменная хроматография (измеряет HbA1c);
- аффинная хроматография (измеряет общий ГНВ);
- иммунный анализ – агглютинация покрытых моноклональными антителами латексных частиц (измеряет HbA1c).

В 2010 г. Американская диабетическая ассоциация приняла новые критерии диагностики сахарного диабета (СД):

- 1) HbA1c > 6,5%; или
- 2) клинические симптомы СД и случайно выявленное повышение концентрации глюкозы в плазме крови $\geq 11,1$ ммоль/л (≥ 200 мг%); или
- 3) уровень глюкозы в плазме крови натощак $\geq 7,1$ ммоль/л (≥ 126 мг%); или
- 4) через 2 ч после пероральной нагрузки глюкозой (75 г глюкозы) $\geq 11,1$ ммоль/л (≥ 200 мг%).

Основными преимуществами исследования HbA1c для диагностики СД по сравнению с определением глюкозы являются:

- измерения глюкозы менее стандартизированы;
- лучше отражает индекс общей экспозиции гликемии и риск долгосрочных осложнений;
- меньше биологическая вариация;
- в меньшей степени подвержен преаналитической нестабильности;
- не зависит от приема пищи и времени взятия пробы;
- относительно не зависит от резкого повышения уровня глюкозы в крови;
- используется клиницистами для мониторинга течения СД и корректировки терапии.

Недостатками исследования HbA1c по сравнению с определением глюкозы являются:

- интерференция при определенных условиях;
- присутствие в крови различных вариантов Hb;
- условия (физиологические, географические, болезни), которые влияют на обновление эритроцитов;
- высокая стоимость и/или недоступность.

В связи с принятием HbA1c в качестве критерия диагностики СД были приняты жесткие требования в отношении:

1. сертификации производителей оборудования и наборов

реактивов: требование в отношении смещения bias $\pm 0,75\%$ для HbA1c (при диапазоне HbA1c в крови 4–10%);

2. метода измерения, используемого в лаборатории: CV должна составлять $\pm 7\%$;

3. снижения влияния интерференции:

- повышение информированности специалистов лаборатории и клиницистов о влиянии интерференции на уровень HbA1c;

- проведение исследования влияния вариантов гемоглобина на результаты анализа для каждого метода;

- поощрение использования методов определения HbA1c, которые наименее подвержены влиянию вариантов гемоглобина;

4. представления результатов исследования уровня HbA1c в единицах системы СИ (ммоль/моль) или %.

Между HbA1c и средним уровнем глюкозы в крови существует линейная зависимость, которую можно рассчитать: глюкоза (мг/дл) = 28,7 x HbA1c - 46,7.

Методы исследования HbA1c у нас в стране не стандартизированы, поэтому использование опыта международных ассоциаций в области стандартизации позволит приобретать лабораторное оборудование, отвечающее установленным требованиям и осуществлять диагностику сахарного диабета на современном уровне.

И. Н. Комарова. Оценка степени соответствия распространенных методов анализа гликированного гемоглобина HbA1c требованиям Международной федерации клинической химии (IFCC). ЗАО «Фирма Гален», Москва

За последние годы российской лабораторной общестественности было представлено большое число публикаций, подчеркивающих значимость стандартизации методов оценки HbA1c и целесообразность их использования на практике. Однако по-прежнему в недостаточной мере раскрыта тема, касающаяся следующих вопросов: «Какой же именно аналит оценивается при определении HbA1c тем или иным лабораторным методом, и насколько его определение соответствует расчетной формуле Международной федерации клинической химии IFCC? Какие ограничения, связанные с интерферирующим воздействием тех или иных сопутствующих субстанций, имеют различные методы оценки HbA1c, и для каких состояний эти ограничения являются критичными?»

Задачи настоящего доклада:

- привести наглядные механизмы оценки гликогемоглобина, лежащие в основе наиболее распространенных методов исследования HbA1c и оценить степень их соответствия расчетной формуле, рекомендованной IFCC;

- показать, какое воздействие оказывают на конечный результат наиболее распространенные интерферирующие субстанции;

- дать корректное определение референсного метода (в соответствии с определением рабочей группы IFCC) и обозначить современную группу «полевых» NGSP-сертифицированных методов, обладающих минимальным количеством ограничений.

Материалы доклада призваны упорядочить разрозненную информацию по существующим методам анализа HbA1c и внести ясность в вопрос обеспечения лабораторий системами оценки гликогемоглобина, максимально соответствующими современным стандартам лабораторной медицины.

Т. М. Ивашикина, В. С. Берестовская, Т. Н. Котова, В. П. Пащикова. Рассмотрение приемлемости метода определения гликированного гемоглобина на анализаторе Cobas c501 для оценки эффективности терапии при сахарном диабете. СПб ГУЗ Консультативно-диагностический центр для детей, ГБОУ СЗГМУ им. И. И. Мечникова, Санкт-Петербург

Консенсус совета экспертов Российской ассоциации эндокринологов по инициации и интенсификации сахаропонижающей терапии сахарного диабета 2 типа установил це-

левые значения гликированного гемоглобина (HbA1c) для принятия решения о коррекции проводимой терапии. Для диапазона 6,5–7,5% цель успешной терапии определена как снижение HbA1c на $\geq 0,5\%$; для 7,6–9,0% – $\geq 0,5\%$; свыше 9% – $\geq 1,5\%$.

Для оценки приемлемости метода определения HbA1c на анализатор Cobas c501 (Roche Diagnostics) была рассчитана величина клинически значимого изменения (RCV – reference change value). Расчет RCV основывался на представлении о биологической вариации К. Фрейзера (2009) и проводился по формуле: $RCV = \sqrt{2 \cdot 1,65 \cdot \sqrt{CVa^2 + CVi^2}}$, где 1,65 – односторонний квантиль стандартного нормального распределения для 95% вероятности. Коэффициент аналитической вариации (CVa) определялся по результатам исследования контрольного материала двух уровней: Lyphochek Diabetes Control 1 (Bio-Rad Laboratories) (среднее 5,79%; CVa = 2,61%) и Lyphochek Diabetes Control 2 (Bio-Rad Laboratories) (среднее 10,45%; CVa = 1,23%); значения индивидуальной биологической вариации для нормы $CVi_{\text{norm}} = 1,9\%$ и патологии $CVi_{\text{path}} = 4,3\%$ взяты с сайта Дж. Вестгарда. Соответствующие величины RCV составили 7,4 и 12,2%. Следовательно, в абсолютном выражении RCV для содержания HbA1c 5,19% является 0,48%), для концентрации свыше 9% – 1,09% HbA1c.

Поскольку эти значения ниже, чем целевые значения, установленные эндокринологами в каждом из диапазонов, метод определения HbA1c на Cobas c501 соответствует требованиям клиницистов и позволяет с высокой степенью достоверности оценивать изменения, возникающие под воздействием проводимой терапии.

Д. С. Сергеевичев, А. И. Субботовская, В. С. Козырева, А. Н. Шилова. Разработка диагностической тест-системы ПЦР-анализа мутаций цитохрома P450 (CYP2C19) для

индивидуального подбора дозы клопидогреля. ФГБУ «ННИИПК им. акад. Е. Н. Мешалкина» Минздравсоцразвития РФ, Новосибирск

Цель исследования – разработка тест-системы для SNP-анализа клинически значимых точечных мутаций генов CYP2C19 (rs4244285; rs4986893; rs12248560) с использованием технологии «High-Resolution Melting» (HRM, «плавление в высоком разрешении»).

Выделение ДНК из цельной венозной крови проводили с помощью реагентов «DNA Dynabeads Direct Blood» (Invitrogen, США) согласно рекомендациям производителя. Дизайн праймеров осуществлен с помощью программного обеспечения Vector NTI 10.0 (InforMax Inc., США). Комбинации праймеров были проверены на специфичность с помощью BLASTn. ПЦР проводили в финальном объеме 10 мкл с использованием комплекта реагентов «SsoFast Eva Green» (Bio-Rad, США), конечная концентрация праймеров составила 450 нМ, экстрагированную ДНК добавляли в количестве 50 нг (ОП 260/280 > 1,7). Протокол амплификации состоял из 40 циклов без стадии элонгации и кривой плавления от 65 до 85°C с шагом 0,2°C. Анализ кривой плавления проводили с использованием программного обеспечения Precision Melt Analysis 1.1 (Bio-Rad, США). Все полученные результаты подтверждены результатами ПДРФ-анализа. Специфичность кластеризации проверяли с помощью прямого секвенирования контрольных образцов по Сенгеру.

Таким образом, нами разработана тест-система для исследования распространенности клинически значимых точечных мутаций гена CYP2C19, характеризующаяся высокой производительностью и относительно невысокой стоимостью, время получения результата составляет 3 ч от момента поступления образца в лабораторию.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ПРОБЛЕМЕ

В. А. Агафонов. Способ прицельной маркировки информативного участка цитологического препарата. ФГБУ Институт хирургии им. А. В. Вишневского Минздравсоцразвития РФ, Москва

В гистологических исследованиях иногда возникает необходимость в повторных просмотрах препарата. На препарате выделяют наиболее информативное место, для этого под контролем микроскопа поверх покровного стекла наносят точку туши, которую обводят с обратной стороны, после чего точку стирают. Для цитологических препаратов этот способ обводки не подходит, так как иммерсионное масло наносит непосредственно на материал, а на масло поставить точку туши невозможно. Поэтому цитолог вынужден маркировать (очерчивать) нужный участок без прицельного микроскопического контроля. Для этого препарат снимают с микроскопа, а нужное место приблизительно обводят с обратной стороны стекла, при этом захватываются неинформативные поля зрения. Целью данной разработки явилось создание более точного способа маркировки информативных участков препарата для повторного цитологического исследования. В предлагаемом способе под контролем малого увеличения микроскопа (например, объектив 4x) в нужном месте, найденном при большом увеличении, на слой иммерсионного масла с помощью тонко отточенной деревянной палочки, смоченной маслом, помещают кусочек бумаги, площадью ~1 мм² препарат переворачивают и обводят по контуру участок препарата, закрытый бумагой с обратной стороны. Затем масло стирают и таким образом препарат готов для последующего хранения. Преимущество этого простого и надежного способа маркировки обусловлено реальной возможностью

прицельного исследования при повторном просмотре препарата. Способ в рамках доказательной медицины позволяет выделить как одиночные клетки, так и их скопления, что особенно важно при диагностике опухолевых заболеваний; также позволяет обозначать и тем самым документировать наличие на препарате клеточных элементов, характерных для разных заболеваний, сколков или кричьев эхинококка, микобактерий туберкулеза, грибов и т. п.

Т. П. Бондарь, А. Б. Эльканова, Е. А. Мельченко. Использование сканирующей зондовой микроскопии эозинофилов в диагностике эозинофилии инфекционно-аллергического генеза. ФБГОУ ВПО Ставропольский государственный университет

Различают реактивные эозинофилии инфекционно-аллергической природы и эозинофилии, возникающие при заболеваниях системы крови. Цель исследования – изучение возможностей использования сканирующей зондовой микроскопии эозинофилов в дифференциальной диагностике эозинофилий инфекционно-аллергического генеза. Всего было обследовано 118 человек, из них 21 ребенок и 18 взрослых с диагнозом амброзийного поллиноза и 11 детей и 23 взрослых с подтвержденным диагнозом токсокароза. Группу сравнения составили 28 добровольцев с сопоставимыми возрастными и половыми характеристиками, не имеющих аллергических заболеваний в анамнезе и специфических антител к антигенам токсокар в крови. Изучение эозинофилов методом сканирующей зондовой микроскопии проводилось при помощи атомно-силового микроскопа «Интегра Прима» в ИТКЦП «Нанотехнологии и наноматериалы» Ставропольского государственного университета. Статисти-

ческий анализ данных позволил установить, что у детей при амброзийном поллинозе по сравнению с данными группы детей с токсокарозом наблюдается снижение высоты клеток ($234 \pm 38,10$ нм; $660 \pm 250,6$ нм, $p < 0,001$). У взрослых высота клеток также снижена в группе больных аллергией по сравнению с группой больных токсокарозом ($186,75 \pm 58,14$ нм; 575 ± 225 нм, $p < 0,001$).

Таким образом, с помощью сканирующей зондовой микроскопии на субнанометровом разрешении установлено преобладание гиподансных эозинофилов при токсокарозе, нормодансных эозинофилов при амброзийном поллинозе. Выявлено изменение структурных свойств мембраны эозинофилов, высоты клеток, зависящей от количества и насыщенности гранулами цитоплазмы и степени вакуолизации.

Ю. А. Ботвич, А. В. Барон, И. А. Ольховский, И. И. Барон, А. П. Пузырь, В. С. Бондарь. **Влияние модифицированных наноалмазов детонационного синтеза на белковые фракции крови.** Красноярский филиал ФГБУ «Гематологический научный центр Минздравсоцразвития РФ, Институт биофизики СО РАН, КНЦ СО РАН, ГОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого

Ранее нами было показано, что модифицированные наноалмазы (МНА) взрывного синтеза могут играть роль носителей ферментных систем, применяемых в том числе для определения некоторых анализитов в сыворотке крови. Не меньший интерес к МНА связан с потенциальной вероятностью их применения как нового адсорбента в технологиях плазмафереза и экстракорпорального диализа. Физико-химические свойства МНА (химически полиморфная активная поверхность и высокая коллоидная устойчивость в дисперсионных средах) определяют их высокие адсорбционные свойства к различным биологическим соединениям. Одним из условий такого применения МНА является предварительное изучение воздействия данных наночастиц на различные компоненты крови человека. Ранее нами были выявлены определенные изменения клеточного и биохимического состава крови под влиянием МНА. В частности, обнаружено снижение активности некоторых ферментов и концентрации общего белка. Настоящая работа посвящена изучению состава белковых фракций в сыворотке крови человека до и после ее обработки МНА. Установлено, что в сыворотке крови человека с нормальным соотношением белковых фракций после ее обработки гидрозолеом с концентрацией МНА 2,5 масс.% практически полностью отсутствуют фракции β_2 и γ -глобулинов, наблюдается снижение фракции α_1 -глобулинов, отмечается тенденция к снижению фракции α_2 -глобулинов. Это дает основание предполагать возможность нового способа сепарации и выделения с помощью МНА отдельных белков крови. Сходные данные получены и при обработке МНА сыворотки крови пациентов с гипер- γ -глобулинемией и множественной миеломой с М-градиентом.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что частицы МНА способны с определенной избирательностью взаимодействовать с белками сыворотки крови человека и адсорбировать их на своей поверхности. Это позволяет предполагать их возможное использование как в качестве основы многофазовых (или) проточных детекторов, так и в качестве селективного сорбента при экстракорпоральных манипуляциях.

И. И. Долгушин, А. Ю. Савочкина, О. С. Абрамовских, Т. Г. Смирнова, И. В. Пегушина, В. А. Маркова, И. В. Курносенко. **Метод обнаружения нейтрофильных внеклеточных ловушек при септических состояниях.** ГБОУ ВПО Челябинская ГМА Минздравсоцразвития РФ

В 2004 г. были открыты нейтрофильные внеклеточные ловушки (НВЛ) и установлен их антимикробный эффект. Показано, что НВЛ – это внеклеточные структуры, состоящие из хроматина и белковых гранул, которые образуются в ответ на стимуляцию, связывают и уничтожают микроорганизмы.

Септические состояния – это сложные патологические процессы, в которых нейтрофильные гранулоциты принимают активное участие.

Цель работы – оценить возможность определения количества НВЛ в диагностике сепсиса. Нами были поставлены следующие задачи: определить содержание НВЛ в крови здоровых людей и больных сепсисом, провести сравнительный анализ между данными группами, оценить прогностическое значение НВЛ при септических состояниях.

В исследование включены 13 человек с сепсисом, мазок крови которых окрашивали по Романовскому-Гимзе. С помощью световой иммерсионной микроскопии подсчитывали количество НВЛ от общего количества нейтрофильных гранулоцитов. Внеклеточные ловушки нейтрофила представляли собой сеть волокон ДНК, в 2–3 раза превосходящую размер нейтрофила. Было установлено, что в группе больных сепсисом количество НВЛ превышало данный показатель у здоровых пациентов в 10 раз. Метод оценки количества НВЛ в цельной крови простой, доступный и информативный. Может являться дополнительным к основным применяемым скрининговым методам лабораторной диагностики.

В. М. Лахтин, М. В. Лахтин, С. С. Афанасьев, В. А. Алешкин. **Хемилюминесцентный мониторинг выведения рекомбинантного эритропоэтина человека из организма с мочой.** ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва

Рекомбинантный эритропоэтин человека (рчЭПО) – гормон широкого применения. Цель – оптимизировать контроль рчЭПО в моче на фоне выявляемого эндогенного чЭПО (эчЭПО).

Исследовали мочу добровольцев после инъекции эритропоемина (рчЭПО; 25 МЕ/кг). Мочу (12, 24, 48, 60, 72 и 96 ч после инъекции), а также стандарт (30 мл мочи + 10 мкл рчЭПО; 37°C 24 ч) стерилизовали фильтрацией, концентрировали в Centricon Plus-20 (Millipore). ЭПО в прогретых пробах (80°C, 3 мин) с 1% твином-80 разделяли высоковольтным изоэлектрофокусированием (рН 3–5) в горизонтальной пластине геля с 7М мочевиной и 5% сахарозой (4–5 ч, 10°C), электрооблотировали при рН 8,3 на двойную мембрану: гидрофильную мембрану Dugarore (Millipore; материал – DVPP, поры 0,65 мкм) и затем на гидрофобную мембрану Immobilon-P (Millipore; материал – PVDF [polyvinylidene difluoride], поры 0,45 мкм). Блот (Immobilon-P) проявляли моноклональными антителами (IgG, клон АЕ7А5, Lot No ВКМ03; R&D Systems, Inc.), биотинилированными козыми АТ против IgG мыши (ночь, 4°C) и стрептавидин-пероксидазой. Для контроля особенностей неспецифических компонентов (относительной концентрации, соотношений в областях эчЭПО и рчЭПО в сравнении с контролями) концентрата мочи в треках мембрану Dugarore серийно фотографировали (с обеих сторон, что улучшает характеристику треков) в процессе ее высыхания (существует оптимальное время, дающий лучший результат визуализации компонентов в областях расположения эчЭПО и рчЭПО). Примеси на блоте удаляли электрооблотингом на Immobilon-P при рН 4,5. Промывки блотов [при рН 7,2; последняя при рН 8,5] и регистрацию хемилюминесценции (ХЛ) [субстрат с рН > 8,5] в режиме живого изображения проводили при 50°C. Накопление ХЛ в ступенчатом нелинейном градиенте времени (для выбора оптимального режима), сканирование площадей пиков проводили с использованием системы BioChemi System (UVP, Calif.). Весь анализ занимал 2 сут.

Дискретность полос ЭПО на блоте значительно улучшалась после удаления примесей электрооблотингом при рН 4,5. Улучшалось также модальное распределение форм (срединные 1–2 мажорные формы среди выявляемых 3–5 форм как еще более выраженные), лучше разграничивались области эчЭПО и рчЭПО. Термообработки блотов и термодетекция ХЛ значительно снижали фон, ускоряли процедуры без снижения пероксидазной активности сорбированного ЭПО-АТ-

АТ2-пероксидазного комплекса. Через 12–24 ч рчЭПО превышал эчЭПО; через 48 ч уровни рчЭПО и эчЭПО выравнивались; через 60–96 ч эчЭПО превышал рчЭПО, причем уровни эчЭПО (72–96 ч) приближались к контрольным (моча без рчЭПО). Найдены мониторинговые коэффициенты (К) соотношения мажорных пиков в областях эчЭПО и рчЭПО, отражающие процесс конверсии рчЭПО в эчЭПО и статистически достоверно коррелирующие со снижением уровня рчЭПО в моче по мере увеличения послеинъекционного срока. К1 (рчЭПО/эчЭПО): 1,26 (12 ч), 1,19 (24 ч), 0,993 (48 ч), 0,907 (60 ч), К2 (для эчЭПО-области): 4,81 (12 ч), 3,73 (24 ч), 2,70 (48 ч), 0,96 (72 ч), 0,85 (без рчЭПО), К3 (для эчЭПО-области): 12,18 (12 ч), 7,52 (24 ч), 6,87 (48 ч), 6,57 (60 ч), 3,77–3,97 (72–96 ч), 1,17–1,49 (моча без рчЭПО).

Метод позволяет проводить визуальный мониторинг однократно введенного в организм рчЭПО в течение 4-х суток. Он перспективен для оценки различных типов рчЭПО (в том числе коммерческих препаратов) по поведению его форм в области варьирования рI в интервале 3–5.

В. С. Медовый. Роботизированная микроскопия и информационные технологии увеличивают чувствительность и доступность методик анализа морфологии клеток крови. ЗАО «Медицинские компьютерные системы (МЕКОС)», Москва

Современные роботизированные комплексы микроскопии (РКМ) выполняют автоматический просмотр мазка крови с адаптацией к его качеству, выполняя все рекомендации ручной методики анализа. Применение РКМ радикально улучшает условия труда и увеличивает производительность. Выходная информация РКМ, представленная в форме сортированных галерей изображений клеток выборки, может рассматриваться как представительная концентрированная цифровая модель натурального препарата (ЦМП). Благодаря увеличению выборки появилась возможность впервые в массовом порядке обнаруживать и визуально идентифицировать патологические признаки и объекты при их низкой концентрации. ЦМП имеют небольшой объем, их удаленная консультация через Интернет осуществима уже сейчас. РКМ МЕКОС-Ц2 использует импорт ЦМП из действующих лабораторий для контроля и оптимизации аналитических функций МЕКОС-Ц2. Накопленная выборка ЦМП обеспечивает объем и представительность испытаний при различных патологиях, методиках пробоподготовки, особенностях контингента больных, недостижимую при обычных натуральных испытаниях. Указанная технология создания коллективного архива «референсных ЦМП», предлагаемая научно-методическим центром МЕКОС, может применяться потребителями для исследовательских целей. Информационной поддержкой методик РКМ-ЦМП является интернет ресурс MECOS-Virt для передачи, хранения, удаленного доступа, поддержки телемедицинских консультаций ЦМП. Роботизированные функции РКМ позволяют внедрить углубленные методики и эффективно использовать время врача лаборатории, сетевые функции РКМ-ЦМП позволяют рационально использовать ресурсы больницы. Интернет функции РКМ-ЦМП-MECOS-Virt открывают возможности поднять качество анализов за счет эффективного использования высококвалифицированного персонала в масштабах региона и страны в целом.

С. О. Навольнев. Разработка компьютерной программы для анализа трехмерного изображения, полученного при помощи микроскопа. ФГБУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи Минздравсоцразвития РФ, Москва

Работа с микроскопами, дающими двухмерное (плоскостное) изображение, уходит в прошлое, на смену им приходят микроскопы, дающие трехмерное (объемное) изображение. Для количественного анализа изображения, получаемого при помощи микроскопа, его нужно оцифровать – сфотографировать цифровым фотоаппаратом, а для построения трехмерно-

го изображения нужно сделать ряд цифровых изображений на разной высоте исследуемого объекта. Четкое изображение объектов, находящихся в некоей плоскости, дают конфокальные микроскопы, при этом объекты, находящиеся сверху и снизу, не видны. Это дает возможность получить много четких «срезов» данного объекта и с помощью компьютерной программы получить виртуальное трехмерное изображение (3D).

Эта методология должна существенно увеличить информацию, получаемую от микроскопии, потому что реальные объекты обычно объемные, а не плоские.

С целью повышения качества лабораторного обеспечения нами разработана программа для анализа цифрового трехмерного изображения, полученного при помощи микроскопа, и компьютерная модель «Виртуальный трехмерный слайд», предназначенная для тестирования программы.

Для анализа такого 3D-изображения нужно применить многие методы прежней двухмерной компьютерной микроскопии, и кроме того появился ряд новых возможностей – определение объема, определение характеристик сложных поверхностей, расположенных в пространстве, производится более точное определение линейных размеров.

Программа может определять отдельные объекты в трехмерном пространстве, подсчитывать их количество, объем, проводить и анализировать ряд сечений, сравнивать с базой данных эталонов (определять степень сходства с разными геометрическими фигурами и эталонами разных объектов); существуют и другие возможности.

Н. Ф. Тимченко, Б. Г. Андриюков, Е. П. Недашковская, Е. В. Персиянова. Видоспецифическая твердофазная иммуноферментная тест-система для определения антител к Yersinia pseudotuberculosis в сыворотке крови человека. ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН, Владивосток

Ежегодно в РФ регистрируются вспышки псевдотуберкулеза в воинских и детских коллективах, что диктует необходимость совершенствовать диагностику этой сапрозоонозной инфекции особенно в ранние сроки заболевания. Наиболее практически значимым является иммуноферментный анализ (ИФА).

Цель – усовершенствование и ускорение диагностики псевдотуберкулеза.

При конструировании тест-системы в качестве антигена был использован термостабильный летальный токсин (ТсТ) Y. pseudotuberculosis молекулярной массой 45 кДа, полученный из бактерий штамма 512, выращенного при температуре 6–8°C. ТсТ продуцируют большинство известных серовариантов возбудителя, патогенных для человека.

Расчет оптимальной концентрации ТсТ при сенсibilизации стрипов проводили опытным путем с учетом сорбционной емкости используемых планшетов и условий сорбирования. Она составила 4 мкг/мл при температуре 37°C в течение 1 ч. Определение рабочего титра конъюгата проводили для каждой серии поликлональных человеческих антител, меченных пероксидазой.

В качестве положительного контрольного образца использовали иммуноглобулин человека нормальный, оттитрованный по ОСО 42-28-320 до концентрации 50 мМЕ/мл. В основе тест-системы лежит метод конкурентного связывания.

Специфичность и чувствительность тест-системы оценивали с сыворотками пациентов с бактериологически, серологически и молекулярно-генетически верифицированными диагнозами. Тест-система выявляла антитела в сыворотке крови на первой неделе заболевания в 75,3% случаев.

Таким образом, преимуществами разработанной тест-системы ИФА являются высокая видоспецифическая активность, сокращение стадий анализа, простота и удобство в применении и расчете полуколичественной и количественной концентрации антител к ТсТ Y. pseudotuberculosis.