

УДК: 616.982.27:54-41]-07-001.8

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ МЕЛИОИДОЗА ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ВНУТРЕННЕГО КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ В РЕФЕРЕНС-ЦЕНТРЕ ПО МОНИТОРИНГУ ЗА ВОЗБУДИТЕЛЯМИ САПА И МЕЛИОИДОЗА

Е.В. Прохвятилова¹, В.А. Антонов^{1,2}, Д.В. Викторов^{1,2}, В.И. Илюхин¹, Н.П. Храпова^{1,2}, Г.А. Ткаченко^{1,2}, И.Б. Захарова^{1,2}, Н.Г. Плеханова¹, И.В. Новицкая^{1,2}, М.Я. Кулаков¹, Т.В. Замарина^{1,2}, И.И. Корсакова^{1,2}, С.С. Савченко^{1,2}, О.С. Бондарева¹, А.А. Батурин^{1,2}, Л.В. Лемасова¹, Н.Н. Тетерятникова¹, Л.И. Белицкая¹

¹ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Волгоград;

²ГБОУ ВПО Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград

Для подтверждения надлежащего качества лабораторных исследований в Референс-центре по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза организован и осуществлен внутренний контроль качества применения различных наборов реагентов для диагностики *in vitro* возбудителя мелиоидоза и других близкородственных видов буркхольдерий. При проведении этапов специфической индикации возбудителя мелиоидоза оценены диагностические возможности коммерческих и экспериментальных наборов реагентов для методов экспресс- и ускоренного анализа (МФА, ПЦР, ТИФМ, РНГА). Результаты испытаний проб с помощью ПЦР-анализа подтвердили эффективность применения различных наборов реагентов и позволили в течение 5-6 ч осуществить индикацию, идентификацию и дифференциацию трех видов близкородственных микроорганизмов.

Ключевые слова: мелиоидоз, буркхольдерии, полимеразная цепная реакция, иммунологические методы, бактериологическое исследование.

EVALUATION OF THE DIAGNOSTIC VALUE OF THE REAGENT KIT FOR DETECTION OF MELIOIDOSIS CAUSATIVE AGENT AT CONDUCTING OF INTERNAL QUALITY CONTROL OF THE LABORATORY RESEARCH IN THE REFERENCE CENTER FOR MONITORING OF GLANDERS AND MELIOIDOSIS AGENTS

E.V. Prokhvatilova¹, V.A. Antonov^{1,2}, D.V. Viktorov^{1,2}, V.I. Ilyukhin¹, N.P. Khrapova^{1,2}, G.A. Tkachenko^{1,2}, I.B. Zakharova^{1,2}, N.G. Plehanova¹, I.V. Novitskaya^{1,2}, M.Ya. Kulakov¹, T.V. Zamarina^{1,2}, I.I. Korsakova^{1,2}, S.S. Savchenko^{1,2}, O.S. Bondareva¹, A.A. Baturin^{1,2}, L.V. Lemasova¹, N.N. Teteryatnikova¹, L.I. Belitskaya¹

¹Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd; ²Volgograd State Medical University, Volgograd

Internal quality control of application of different reagent sets for *in vitro* diagnostics of the melioidosis agent and other closely related species of *Burkholderia* was organized and implemented to confirm the proper laboratory quality in the Reference centers for monitoring of glanders and melioidosis agents. The diagnostic capabilities of commercial and experimental kits for rapid and express-analysis (FIA, PCR, TIFM, RIHA) were evaluated during specific stages of the melioidosis agent indication. The test results of samples using PCR analysis confirmed the efficacy of the various reagent kits and permitted to conduct the indication, identification and differentiation of three species of closely related organisms for 5-6 hours.

Key words: melioidosis, *Burkholderia*, polymerase chain reaction, immunological methods, bacteriological examination.

Цель работы – конструирование, испытание и сравнительная оценка диагностических коммерческих (зарегистрированных в Росздравнадзоре) и экспериментальных наборов реагентов для обнаружения возбудителей мелиоидоза и других близкородственных видов буркхольдерий, разработанных сотрудниками ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (всего 16 медицинских изделий). Испытания наборов реагентов проводили с помощью МФА, ПЦР, ТИФМ, РНГА на базе лабораторий Референс-центра по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза: лабораторий диагностики и химиотерапии, иммунодиагностики и биотехнологии, генной диагностики и типирования микроорганизмов, функциональной геномики.

Материалы и методы

В соответствии с ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025-2006 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий», ГОСТ Р ИСО 9001 «Система качества. Термины и определения» система управления качеством испытаний должна, как обязательный элемент, предусматривать организацию и осуществление внутреннего контроля качества лабораторных исследований (испытаний), основной задачей которого является обеспечение надлежащего качества исследований, точности и сопоставимости результатов исследований, безопасности работы с патогенными биологическими агентами (ПБА). Испытания медицинских изделий проводили согласно Схеме индикации патогенных биологических агентов (СИ ПБА) [6], и в соответствии с требованиями СП 1.3.1285-03 [5].

По результатам экспресс-анализа нативного материала (ПЦР, МФА, ТИФМ, РНГА) выдавался предварительный ответ, после анализа выделенных культур бактериологическим методом и повторного исследования с помощью всех вышеперечисленных экспресс-методов – окончательный ответ с указанием вида буркхольдерий [6].

Для исследований использовали штаммы *Burkholderia pseudomallei*, *B. thailandensis*, *B. ceracia*, полученные из коллекционного центра ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Подготовка контрольных образцов, стандартизация проб по концентрации (1×10^6 м.к./мл в 0.9 % хлориде натрия) проводилась с обязательным контролем КОЕ/мл. Серии проб из взвесей бактериальных клеток (по 5 типичных штаммов каждого вида буркхольдерий) шифровали и передавали в лаборатории Референс-центра для исследования с помощью различных методов [5].

Постановка методик бактериологического исследования воспроизведена в традиционном виде для всех глюкозоферментирующих грамотрицательных бактерий в соответствии с МУ 4.2.2787-10. После идентификации выделенных культур и повторного исследования проб с помощью перечисленных выше методов выдан окончательный ответ с указанием вида буркхольдерий.

Для МФА использовали коммерческий набор «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие мелиоидозные моноклональные», серия 52/13 и экспериментальные серии флуоресцирующих иммуноглобулинов, полученных на основе разноэпитопных моноклональных антител (МКА) 1F₄ и 3C₆, 5C₂, 5C₉, 6B₇, 7A₈, 4A₁₀ (по 1 серии каждого типа), приготовленных на основе МКА к антигену 200 kDa (7 серий).

РНГА ставили с коммерческим набором реагентов «Диагностикум эритроцитарный сапной и мелиоидозный иммуноглобулиновый сухой», серия 90/13. Для подтверждения специфичности РНГА ставили реакцию ее торможения – РТНГА. Результаты учитывали через 2-3 ч и окончательно на следующие сутки.

Для постановки ТИФМ использовали экспериментальный набор реагентов «Тест-система иммуноферментная моноклональная для выявления антигена 200 kD возбудителя мелиоидоза». Целевое назначение тест-системы – выявление гликопротеина капсулы возбудителя мелиоидоза, одного из факторов вирулентности *B. pseudomallei*.

Для проведения исследований с помощью ПЦР использовали 2 коммерческих набора реагентов:

1. Набор реагентов для выявления ДНК возбудителей сапа (*Burkholderia mallei*) и мелиоидоза (*Burkholderia pseudomallei*) методом полимеразной цепной реакции «Burk23S - Eph», серия 1-13.

2. Набор реагентов для выявления ДНК возбудителей сапа (*Burkholderia mallei*) и мелиоидоза (*Burkholderia pseudomallei*) методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «Амплиген Burk».

Кроме того, четыре экспериментальных набора реагентов:

1. Набор праймеров Bps1s/ Bps 2as для обнаружения ДНК возбудителя мелиоидоза методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

2. Набор праймеров BCR1-BCR2 для обнаружения ДНК бактерий комплекса *B. ceracia* методом ПЦР.

3. Набор праймеров Burt1s-Burt2as для обнаружения ДНК *B. thailandensis*.

4. Набор реагентов для детекции и типирования генов устойчивости к антибиоти-

кам β-лактаминового ряда у патогенных бактерий рода *Burkholderia* с помощью мультиплексного ПЦР-анализа.

Пробоподготовка для проведения ПЦР проводилась в соответствии с СП 1.3.1285-03 и МУ 1.3.2569-09 [3,5]. Постановку реакций осуществляли с использованием амплификаторов «Терцик» (ЗАО «НПФ ДНК-технология», Россия), Rotor-Gene 6000 («Corbett Research», Австралия), C1000 (Bio-Rad, США). В случае элетрофоретической детекции продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 1.5 % агарозном геле и визуализировали окрашиванием бромистым этидием [2]. При гибридационно-флуоресцентной детекции результатов накопление специфического продукта амплификации участка ДНК *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei* детектировалось по каналу FAM/Green, накопление продукта амплификации ДНК внутреннего контрольного образца (ВКО) - по каналу Cy5/Red.

Результаты и обсуждение

СИ ПБА предполагает проведение индикации и идентификации микроорганизмов в неизвестных бактериальных взвесьях с помощью обязательных (табельных) методов лабораторной диагностики, в соответствии с перечнем наиболее вероятных ПБА [6]. Поскольку длительность проведения анализа регламентирована возможно короткими сроками (48 ч), основными критериями для оценки диагностической ценности наборов реагентов являлись чувствительность, специфичность, а также время проведения исследований и выдачи результатов.

На этапе проведения специфической индикации с вышеперечисленными наборами установлено, что в МФА сигнальный ответ о наличии в сериях проб возбудителей мелиоидоза или близкородственных буркхольдерий выдается через 6 ч, при этом не осуществляется дифференциация до вида *B. pseudomallei* и *B. thailandensis* из-за наличия родственных антигенных детерминант в структуре бактерий. В пробах с *B. ceracia* зарегистрирован отрицательный результат, что свидетельствует о специфичности испытуемых флуоресцирующих моноклональных мелиоидозных иммуноглобулинов. Кроме того, в работе использовано 7 типов моноклональных флуоресцирующих мелиоидозных иммуноглобулинов к различным антигенным детерминантам *B. pseudomallei* МКА1F₄ и 3C₆, 5C₂, 5C₉, 6B₇, 7A₈, 4A₁₀. Однако преимуществ в МФА, в сравнении с коммерческим препаратом по параметрам специфической активности и специфичности, у какого-либо из них выявлено не было, дифференциацию возбудителя до вида с помощью МФА провести не представлялось возможным.

В течение 4-6 ч от начала проведения исследований результаты ТИФМ с использованием экспериментального набора реагентов «Тест-система иммуноферментная моноклональная для выявления водорастворимых антигенов возбудителя мелиоидоза», приготовленной на основе моноклональных антител к гликопротеину капсулы возбудителя мелиоидоза (200 kDa), были зарегистрированы как отрицательные со всеми нативными пробами с *B. pseudomallei*, *B. thailandensis*, *B. ceracia*.

Через 72 ч на этапе идентификации при работе со взвесьями чистых культур (концентрацией 1×10^7 - 10^9 м.к./мл), изолированных из серии проб, содержащих *B. pseudomallei* и *B. thailandensis*, апробированы два варианта экспериментальной тест-системы, описанные выше. С одним из них была достигнута чувствительность 1×10^7 м.к./мл в детекции штаммов *B. pseudomallei* при отрицательном результате реакции с клетками *B. thailandensis*, с другим вариантом – наоборот, выявлялись штаммы *B. thailandensis* в концентрации 5×10^6 м.к./мл. В целом, результаты исследований свидетельствовали о недостаточной чувствительности экспериментального набора для ТИФМ. На сегодняшний день данные тест-системы могут быть рекомендованы в качестве средства обнаружения растворимых антигенов возбудителя мелиоидоза на этапах идентификации и дифференциации выделенных культур буркхольдерий II и III-IV групп патогенности.

При использовании вариантов ПЦР-анализа на этапе индикации через 5 ч был выдан положительный результат о наличии возбудителей в соответствующих пробах, и определен в каждой из них вид микроорганизма: *B. pseudomallei*, *B. thailandensis*, *B. ceracia*.

Праймеры Burt1s-Burt2as, помимо ДНК *B. thailandensis*, с высокой чувствительностью обнаруживали ДНК возбудителя мелиоидоза, поэтому установление вида микроорганизма в пробах, содержащих *B. pseudomallei*, было проведено методом вычитания результатов амплификации, полученных в реакции с другими праймерами.

Следует отметить, что использование наборов реагентов с гибридационно-флуоресцентной детекцией позволило получить результат на 1-1,5 часа быстрее, так как при таком способе детекции исключается этап электрофореза. Флуоресцентные технологии более безопасные и позволяют снизить риск контаминации продуктами ПЦР.

Большой диагностический интерес представляли результаты с экспериментальным «Набором реагентов для детекции и типирования генов устойчивости к антибиотикам β-лактаминового ряда у патогенных бактерий рода *Burkholderia* с помощью мультиплексного ПЦР-анализа». Результаты испытаний свидетельствовали о диагностической эффективности, чувствительности и специфичности тест-системы. Следует отметить, что данный набор реагентов отличался экономичностью расходования реагентов, экспрессностью и информативностью в получении результатов и позволил при одно-

моментной постановке ПЦР осуществить идентификацию и дифференциацию всех 3 видов близкородственных микроорганизмов уже на первом этапе через 6 ч. Проведенная ранее апробация мультилокусной тест-системы на широком наборе штаммов *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis* и штаммов различных геномоваров *seracia*-комплекса продемонстрировала возможность дифференциации между различными видами рода *Burkholderia* по набору генов β -лактамаз молекулярных классов В и D, а также отсутствие детекции ДНК видов отдаленной гетерологии (псевдомонады, вибрионы, различные виды энтеробактерий, грам-положительные кокки и бациллы) [1].

Таким образом, при проведении СИ ПБА, положительные результаты МФА и ПЦР дали основание зарегистрировать наличие в пробах возбудителя мелиоидоза. С помощью различных вариантов ПЦР через 5-6 ч после поступления проб на исследование была проведена идентификация до вида *B. pseudomallei*, *B. thailandensis*, *B. seracia* в соответствующих образцах и выдан предварительный ответ.

Постановка методик бактериологического исследования позволила идентифицировать *B. seracia*, *B. thailandensis*, *B. pseudomallei* в соответствующих пробах через 72 ч [4]. После идентификации выделенных культур и повторного исследования материала с помощью перечисленных выше методов был выдан окончательный ответ с указанием вида буркхольдерий.

Заключение

При проведении СИ ПБА основными регламентированными методами являются МФА, РНГА, ТИФМ и ПЦР [6]. В свою очередь, диагностические препараты к ним должны обеспечивать установление видовой принадлежности возбудителя в кратчайшие сроки, что особенно важно в условиях чрезвычайных ситуаций.

Проведенные Референс-центром по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза контрольные испытания имеющихся наборов реагентов показали, что в первые часы от момента поступления проб выявление *B. pseudomallei* и филогенетически близких видов буркхольдерий с помощью иммунологических методов РНГА, МФА, ТИФМ было недостаточно эффективно, поскольку МФА-анализ не позволил идентифицировать буркхольдерии II и III-IV групп патогенности, а РНГА и ТИФМ с испытываемыми наборами реагентов – обнаружить буркхольдерии в пробах с низкой концентрацией бактерий. Основным недостатком бактериологического метода являлась длительность проведения анализа, для выполнения которого в полном объеме требовалось 3-4 сут.

Большое значение при диагностике мелиоидоза могут представлять молекулярно-генетические методы, главным образом, различные варианты ПЦР. Диагностические возможности наборов реагентов для различных вариантов ПЦР значительно превышали соответствующие показатели чувствительности и специфичности для иммунологических методов, а диагностическая ценность (за счет отсутствия ложноположительных результатов) была выше по основным показателям. После завершения этапов сравнительных испытаний и государственной регистрации данные тест-системы могут быть рекомендованы в качестве средств экспресс-обнаружения возбудителя мелиоидоза и дифференциации буркхольдерий II и III-IV групп патогенности.

Вышеизложенное, на наш взгляд, объективно обосновывает необходимость более широкого использования ПЦР в рамках деятельности Референс-центра по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза и лабораторий различного уровня на этапах индикации проб, подозрительных на зараженность патогенными бактериями рода *Burkholderia*. Дальнейшие контрольные сравнительные испытания наборов реагентов для различных вариантов ПЦР на широком наборе штаммов гомологичных и гетерологичных видов микроорганизмов позволят принять окончательное решение об их преимуществах и алгоритмах их применения в схемах лабораторной диагностики патогенных буркхольдерий.

Литература

1. Романова А.В., Захарова И.Б., Замараев В.С., Виктор Д.В. Конструирование праймеров для детекции и типирования генов β -лактамаз патогенных видов рода *Burkholderia* // Пробл. особо опасных инф. – 2012. – 2(112). – С. 59-61.
2. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование // М.: Мир. – 1984. – 480 с.
3. МУ 1.3.2569 -09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I – IV групп патогенности».
4. МУ 4.2.2787-10 «Лабораторная диагностика мелиоидоза».
5. СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I - II групп патогенности (опасности)».
6. Специфическая индикация патогенных биологических агентов: Практическое руководство. Под редакцией академика РАМН Г.Г.Онищенко. – М., 2006. – 288 с.

Ответственный автор

Прохватилова Елена Валерьевна – зам. директора по научно-производственной работе ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора канд. мед. наук, доцент. Тел.: (3952) 22-13-12. E-mail: confirk2014@mail.ru

УДК: 579.841.11Pseudomonas:57.083

АНАЛИЗ ПРАЙМЕРОВ И ЗОНДОВ, ПОЗВОЛЯЮЩИХ ДИФФЕРЕНЦИАЦИРОВАТЬ *BURKHOLDERIA MALLEI* И *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* МЕТОДОМ ПЦР

Л.В. Лемасова, С.С. Савченко, Г.А. Ткаченко, В.А. Антонов

ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград

Проведено сравнение праймеров и зондов, комплементарных к разным ДНК-мишеням, позволяющих дифференцировать возбудителей сапа и мелиоидоза между собой с помощью ПЦР в реальном времени. В работе представлены результаты исследований с оригинальными олигонуклеотидами на основе фрагмента гена *fliP* для идентификации *B. mallei*, а так же олигонуклеотидными затравками, комплементарными участку гена, кодирующего белок *gp68* для идентификации *B. pseudomallei*.

Ключевые слова: *B. pseudomallei*, *B. mallei*, полимеразная цепная реакция.

EVALUATION OF PCR PRIMERS AND PROBES FOR *BURKHOLDERIA MALLEI* AND *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* DIFFERENTIATION

L.V. Lemasova, S.S. Savchenko, G.A. Tkachenko, V.A. Antonov

Volgograd Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor, Volgograd

We compared several primer and probe sets developed for real-time PCR method enabling specific differentiation of glanders and melioidosis causative agents. The oligonucleotides constructed in this study were based on the sequence of the *fliP* gene and *gp68*-protein coding sequence for identification of *B. mallei* and *B. pseudomallei*, respectively.

Key words: *B. pseudomallei*, *B. mallei*, polymerase chain reaction.

Burkholderia mallei и *Burkholderia pseudomallei* относятся к возбудителям особо опасных инфекционных заболеваний II группы патогенности – сапа и мелиоидоза, являющихся потенциальными агентами биотерроризма группы В. Высокий уровень сходства геномов этих бактерий определяет трудности при конструировании амплификационных тест-систем, с помощью которых возможно дифференцировать возбудителей сапа и мелиоидоза друг от друга. Многими авторами проводятся исследования по поиску видоспецифичных ДНК-мишеней. В качестве целевой ДНК для создания такой тест-системы может стать участок генома, присутствующий у *B. pseudomallei*, но отсутствующий *B. mallei*.

В настоящее время в Российской Федерации не зарегистрированы ПЦР тест-системы для дифференциации патогенных буркхольдерий. Важная роль в обеспечении этих исследований отводится созданному на базе ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский институт Роспотребнадзора Референс-центру по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза, в задачи которого входит изучение биологических, молекулярно-генетических и биохимических свойств *B. mallei* и *B. pseudomallei*, в том числе разработка идентификационных тестов для дифференциации штаммов патогенных буркхольдерий.