

Е.В.Найденова, Н.А.Осина, В.Е.Куклев, Ю.И.Яшечкин, Т.В.Бугоркова, И.В.Шульгина,
О.А.Лобовикова, С.А.Щербаклова, В.В.Кутырев

ВНЕДРЕНИЕ В ПРАКТИКУ НОВЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ГЕННОЙ ДИАГНОСТИКИ ЛИХОРАДКИ ДЕНГЕ И ХОЛЕРЫ

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Представлена информация о проведении этапов государственной регистрации препаратов для генной диагностики лихорадки денге и холеры нового поколения, основанных на принципе многофакторного анализа и позволяющих не только выявлять патоген, но и проводить его ускоренную идентификацию по эпидемической значимости и таксономическому положению.

Ключевые слова: лихорадка денге, холера, генная диагностика, мультилокусная ПЦР, многофакторный анализ.

E.V.Naidenova, N.A.Osina, V.E.Kouklev, Yu.I.Yashechkin, T.V.Bugorkova, I.V.Shul'gina, O.A.Lobovikova,
S.A.Shcherbakova, V.V.Kutyrev

Introduction of New Preparations for Gene Diagnostics of Dengue Fever and Cholera

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Presented is the information on technical and medical trials of new generation preparations for gene diagnostics of Dengue fever and cholera, based on the multiple factor analysis. Application of these preparations makes it possible not only to detect pathogen but also to carry out its expedited identification in accordance with epidemiological significance and taxonomic status.

Key words: Dengue fever, cholera, gene diagnostics, multilocus PCR, multiple factor analysis.

Ежегодно из неблагополучных по холере и лихорадке денге стран на территорию Российской Федерации прибывает более 1 млн человек и регистрируются завозные случаи этих инфекций [1, 2]. В связи с этим остается актуальной задача по разработке качественно новых препаратов для генной диагностики данных инфекционных болезней, позволяющих быстро (в течение 2–3 ч), с высокой чувствительностью и специфичностью осуществлять не только детекцию патогенов, но и их ускоренную идентификацию по эпидемической значимости и таксономическому положению. Один из наиболее перспективных способов решения поставленной задачи – разработка генодиагностических препаратов, основанных на принципе многофакторного анализа [5].

До последнего времени в нашей стране отсутствовали зарегистрированные наборы реагентов для выявления РНК вирусов Денге и ДНК холерных вибрионов с одновременным определением таксономического положения возбудителей: субтипы I–IV вируса Денге и принадлежность к O1, O139 серогруппам, биовару возбудителя холеры, и их эпидемической значимости методом ПЦР с электрофоретическим учетом результатов. В то же время разработаны и подготовлены экспериментальные серии двух генодиагностических препаратов, позволяющих успешно осуществить индикацию и ускоренную идентификацию возбудителей лихорадки денге и холеры: «Набор реагентов для выявления и ускоренной идентификации ДНК *Vibrio cholerae* методом мультилокусной полимеразной цепной реакции с электрофоретическим учетом результатов (Ген *Vibrio*

cholerae – идентификация – РЭФ)», «Набор реагентов для выявления РНК вирусов Денге (I–IV типов) методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции с электрофоретическим учетом результатов (Ген Денге – РЭФ)».

Неотъемлемой частью процесса внедрения новых диагностических препаратов в практику здравоохранения является их государственная регистрация по установленной схеме.

Целью работы являлись подготовка и осуществление технических и медицинских испытаний новых препаратов для генной диагностики лихорадки Денге и холеры.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования использовали экспериментальные серии наборов реагентов «Ген *Vibrio cholerae* – идентификация – РЭФ» и «Ген Денге – РЭФ» (серии 01 и 02, дата изготовления 06.2011 г., срок годности – 12.2011 г.), бактериальные суспензии чистых культур возбудителя холеры и гетерологичных микроорганизмов (166 проб), пробы биологического материала и объектов окружающей среды, искусственно инфицированных холерными вибрионами и гетерологичными микроорганизмами (129 проб), препараты кДНК штаммов вирусов Денге I–IV типов и гетерологичных вирусов, относящихся к семействам *Flaviviridae* и *Bunyaviridae* (8 проб), пробы биологического материала, искусственно инфицированные кДНК штаммов вирусов Денге I–IV типов (41 проба).

Штаммы *V. cholerae* (27 изолятов), *Vibrio parahaemolyticus* (2), *Escherichia coli* (3), *Shigella flexneri* (3), *Aeromonas spp.* (1), *Pseudomonas aeruginosa* (1), *Proteus vulgaris* (2) получены из Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб» (ГКПБ «М») ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», государственной коллекции ФБУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии», коллекции живых культур ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока». Панель кДНК вирусов Денге I–IV типа (4 изолята) и гетерологичных вирусов (4) получена в ГБУН «НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского».

Для проведения работ применяли нормативно-методические документы для каждого набора реагентов: ТУ 9398-033-01898109-2011 («Ген Денге – РЭФ»), ТУ 9398-039-01898109-2011 («Ген *Vibrio cholerae* – идентификация – РЭФ»), инструкцию по применению.

Подготовку проб и проведение исследований осуществляли в соответствии с инструкциями по применению и ТУ. Характеристика штаммов и искусственно инфицированных проб, использованных для контроля, будет представлена ниже. Амплификацию проводили на программируемом амплификаторе «Терцик».

Результаты и обсуждение

Технические испытания проводили на базе лаборатории молекулярной диагностики ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб» в соответствии с техническими условиями и инструкциями по применению. Для контроля набора реагентов «Ген Денге – РЭФ» подготовлены СОП: СОП К+ Денге I (NS3), СОП К+ Денге II (NS), СОП К+ Денге III (NS3), СОП К+ Денге IV (NS3), СОП К+ Денге I (NS5), СОП К+ Денге II (NS5), СОП К+ Денге III (NS5), СОП К+ Денге IV (NS5), представляющие разведение плазмидной ДНК, выделенной из рекомбинантных штаммов *Escherichia coli*, несущих в составе плазмиды фрагменты NS3 и NS5 локусов вирусов Денге I–IV типа. Штаммы для получения обозначенных выше СОП депонированы в ГКПБ «М» ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб» (всего 8 культур). Для контроля набора реагентов «Ген *Vibrio cholerae* – идентификация – РЭФ» предусмотрено использование бактериальных суспензий штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы классического и эльтор биоваров, O139 и неO1/неO139 серогрупп с различным набором маркеров эпидемической значимости: *ctxA* и *tcpA* генов: *Vibrio cholerae* O1 биовар *cholerae* 569B, *Vibrio cholerae* O1 биовар *eltor* M-1298 (*ctxA*+*tcpA*+), *Vibrio cholerae* O1 биовар *eltor* KM-26 (*ctxA*- *tcpA*-), *Vibrio cholerae* O139 P-16064 (*ctxA*+ *tcpA*+), *Vibrio cholerae* O139 M-377 (*ctxA*- *tcpA*-), *Vibrio cholerae* не-O1 не-O139 P-9741 (*ctxA*- *tcpA*-), *E. coli* 12226 O-55, *Vibrio parahaemolyticus* 764. Полученные рекомбинантные

штаммы *E. coli* и природные культуры холерных вибрионов и гетерологичных микроорганизмов, представленные выше, позволяют в полной мере охарактеризовать чувствительность и специфичность контролируемых наборов реагентов. По результатам технических испытаний диагностические препараты «Ген *Vibrio cholerae* – идентификация – РЭФ» и «Ген Денге – РЭФ» соответствуют требованиям технических условий.

Медицинские испытания набора «Ген Денге – РЭФ» проводили на базе лаборатории вирусологии ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» и кафедры клинической лабораторной диагностики Российской медицинской академии последиplomного образования. Для определения специфичности препарата исследовали кДНК штаммов вирусов Денге I–IV типов и гетерологичных вирусов. Установлено, что положительный ответ зарегистрирован только в случае анализа проб, содержащих кДНК вируса Денге I–IV типа, при этом отмечено полное соответствие размера образовавшихся ампликонов и типа, к которому относился вирус Денге. Дополнительно изучали пробы биологического материала (суспензия комаров, кровь доноров), искусственно инфицированные кДНК вирусов Денге I–IV типов и гетерологичных микроорганизмов. Наличие специфичной амплификации наблюдали только при исследовании проб, содержащих кДНК возбудителя. Чувствительность набора реагентов «Ген Денге – РЭФ» была оценена на основании изучения разведений плазмидной ДНК рекомбинантных штаммов *E. coli*, содержащих фрагменты генома вирусов Денге I–IV типов, соответствующие $1 \cdot 10^6$ – $1 \cdot 10^3$ ГЭ вирусных частиц в мл. Установлено, что в 100 % случаев вне зависимости от типа вируса Денге положительный ответ в ПЦР регистрировался при наличии в пробе $1 \cdot 10^4$ ГЭ в 1 мл.

Таким образом, по результатам технических и медицинских испытаний набор реагентов «Ген Денге – РЭФ» характеризуется следующими показателями: чувствительность – $1 \cdot 10^4$ ГЭ/мл; специфичность – 100 %; воспроизводимость – 100 %.

Медицинские испытания набора реагентов «Ген *Vibrio cholerae* – идентификация – РЭФ» проходили на базе ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» (лаборатория холеры) и ФБУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии» (отдел особо опасных инфекций).

Для определения чувствительности и специфичности препарата исследовали бактериальные суспензии холерных вибрионов и гетерологичных микроорганизмов с концентрацией $1 \cdot 10^4$ – $1 \cdot 10^2$ м.к./мл. Для анализа были выбраны эпидемически опасные и эпидемически безопасные штаммы *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп, а также неO1/неO139 серогрупп классического и эльтор биоваров. Установлено, что в 100 % случаев положительный ответ в ПЦР регистрировался при исследовании проб, содержащих

$1 \cdot 10^4$ м.к./мл вибрионов. При этом в полной мере удавалось не только детектировать патоген, но и провести его ускоренную идентификацию по эпидемиологической значимости и таксономическому положению. При наличии в пробах $1 \cdot 10^3$ м.к./мл патогенов специфичная многофакторная амплификация отмечена в 95,65 % образцов, $1 \cdot 10^2$ м.к./мл – 50 %. При исследовании проб, содержащих гетерологичные микроорганизмы, в ПЦР во всех случаях зафиксирован отрицательный результат.

Дополнительно определена чувствительность и специфичность набора реагентов «Ген *Vibrio cholerae* – идентификация – РЭФ» при исследовании проб биологического материала (испражнения, желчь, ректальные мазки) и объектов окружающей среды (питьевая вода, смывы с поверхностей, пищевые продукты), искусственно инфицированные холерными вибрионами и гетерологичными микроорганизмами. Для контаминации образцов использовали эпидемиологически опасные и безопасные штаммы *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп. Установлено, что чувствительность препарата при исследовании проб, содержащих $1 \cdot 10^4$ м.к./мл вибрионов, вне зависимости от вида исследуемого материала и эпидемиологической значимости патогена составила 100 %. Штаммы холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп (ctxA+ tcpA+) в концентрации $1 \cdot 10^3$ м.к./мл выявлены в пробах биологического материала и объектов окружающей среды в 100 и 87,5 % случаев соответственно. При исследовании образцов, содержащих $1 \cdot 10^3$ м.к./мл культур холерных вибрионов (ctxA-tcpA-), положительный ответ в ПЦР зафиксирован в 93,7 % (клинический материал) и 91,6 % (объекты окружающей среды). Полученные результаты указывают на высокую эффективность испытываемого набора реагентов как при выявлении этиологических агентов холеры (*V. cholerae* O1, O139 (ctxA+tcpA+)), так и эпидемиологически безопасных штаммов холерных вибрионов разных серогрупп, которые могут вызывать локальные и спорадические случаи заболевания у людей [3, 4].

Таким образом, результаты технических и медицинских испытаний свидетельствуют о том, что наборы реагентов «Ген Денге – РЭФ» и «Ген *Vibrio cholerae* – идентификация – РЭФ» характеризуются высокой чувствительностью – $1 \cdot 10^4$ ГЭ/мл или м.к./мл соответственно, специфичностью – 100 %,

воспроизводимостью – 100 % и могут быть рекомендованы для серийного производства с целью практического использования при мониторинге холеры и лихорадки денге.

Разработанные препараты зарегистрированы в Федеральной службе по надзору в сфере здравоохранения и социального развития: «Ген Денге – РЭФ» – регистрационное удостоверение ФСР 2012/13441 от 21.05.2012 г., «Ген *Vibrio cholerae* – идентификация – РЭФ» – регистрационное удостоверение ФСР 2012/13430 от 21.05.2012 г.

Работа проведена в рамках выполнения Распоряжения Правительства Российской Федерации № 1426-р от 02.10.2009 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ларичев В.Ф., Сайфуллин М.А., Акиншина Ю.А., Хуторецкая Н.В., Бутенко А.М. Завозные случаи арбовирусных инфекций в Российской Федерации. Эпидемиол. и инф. бол. 2012; 1:35–39.
2. Москвитина Э.А., Мазрухо А.Б., Адаменко О.Л., Кругликов В.Д., Назаретян А.А. Холера в период седьмой пандемии: особенности эпидемиологии и профилактики. Холера и патогенные для человека вибрионы. 2012; 25:17–22.
3. Blake P.A., Weaver R.W., Hollins D.G. Diseases of humans (other than cholera) caused by vibrios. Annu. Rev. Microbiol. 1980; 34:341–367.
4. Theophilo G.N., Rodrigues D.P., Leal N.C., Hofer E. Distribution of virulence markers in clinical and environmental *Vibrio cholerae* non-O1/ non-O139 strains isolated in Brazil from 1991 to 2000. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 2006; 48:65–70.
5. WHO. Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control; WHO: Geneva, Switzerland, 2009. 160 p

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Larichev V.F., Saifullin M.A., Akinshina Yu.A., Khutoretskaya N.V., Butenko A.M. [Imported cases of arbovirus infections in the territory of the Russian Federation]. Epidemiol. Infek. Bol. 2012; 1:35–9.
2. Moskvitina E.A., Mazrukho A.B., Adamenko O.L., Kruglikov V.D., Nazaretyan A.A. [Cholera during the period of the seventh pandemic: peculiarities of its epidemiology and prophylaxis]. Kholera i Patogen. dlya Cheloveka Vibriony. 2012; 25:17–22.

Authors:

Naidenova E.V., Osina N.A., Kouklev V.E., Yashechkin Yu.I., Bugorkova T.V., Shul'gina I.V., Lobovikova O.A., Shcherbakova S.A., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Найденова Е.В., Осина Н.А., Куклев В.Е., Яшечкин Ю.И., Бугоркова Т.В., Шульгина И.В., Лобовикова О.А., Щербакова С.А., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 30.10.12.