

А.Н.Малахаева¹, Л.В.Саяпина¹, И.С.Барулина¹, И.В.Касина¹, А.С.Абдрашитова¹, Н.А.Осина²,
И.Н.Шарова², С.Б.Яцышина³, Н.В.Майоров², Л.В.Зайцева², Н.П.Миронова²

ОЦЕНКА НОВОГО НАБОРА РЕАГЕНТОВ «АМПЛИСЕНС® BRUCELLA SPP.-FL» С ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ

¹Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля
медицинских биологических препаратов имени Л.А.Тарасевича, Москва;

²Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов;

³Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии, Москва

В ФГУН «ЦНИИЭ» и ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб» разработан набор реагентов для выявления ДНК бактерий *Brucella spp.* в биологическом материале и культурах микроорганизмов методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов. В медицинских испытаниях в ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича изучена диагностическая ценность набора реагентов «АмплиСенс® *Brucella spp.*-FL», который выпускается в двух вариантах в зависимости от способа учета результатов (FRT – в режиме «реального времени» и FEP – по «конечной точке»). На основании полученных результатов установлена высокая диагностическая ценность набора реагентов «АмплиСенс® *Brucella spp.*-FL». Набор зарегистрирован в качестве изделия медицинского назначения.

Ключевые слова: бруцеллез, *Brucella spp.*, ПЦР, гибридационно-флуоресцентный учет результатов, специфическая активность, специфичность, воспроизводимость.

A.N.Malakhaeva¹, L.V.Sayapina¹, I.S.Barulina¹, I.V.Kasina¹, A.S.Abdrashitova¹, N.A.Osina², I.N.Sharova²,
S.B.Yatsyshina³, N.V.Mayorov², L.V.Zaytseva², N.P.Mironova²

Assessment of the New Set of Reagents “AmpliSens® BRUCELLA SPP.-FL” with Hybridization-Fluorescent Detection

¹L.A.Tarasevich State Research Institute for Standardization and Control of Medical Biological Preparations, Moscow;

²Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov; ³Central Research Institute of Epidemiology, Moscow

At CRIE, Moscow and RRAPI “Microbe” designed is the set of reagents for detection of *Brucella spp.* DNA in biological materials and cultures of microorganisms by means of PCR with hybridization-fluorescent registration of the results. This reagent set, “AmpliSens® *Brucella spp.*-FL”, is supplied in two modifications versus the mechanism of the results registration (FRT – real time and FEP – end-point). High diagnostic value of the reagent set is determined in medical trials at L.A. Tarasevich Institute. The set is registered as medical device.

Key words: brucellosis, *Brucella spp.*, PCR, hybridization-fluorescent registration of the results, specific activity, specificity, reproducibility.

До настоящего времени бруцеллез остается одним из зоонозов, причиняющих значительный экономический и социальный ущерб [3]. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), заболевания бруцеллезом регистрируются среди населения 73 стран мира [4]. В Европе более всего бруцеллезом поражено население стран Средиземноморья, однако ряд стран полностью свободен от этой инфекции (Дания и др.). В России наиболее неблагоприятны в отношении бруцеллеза среди людей являются регионы с развитым овцеводством (Тыва, Северный Кавказ и Южное Поволжье) [1]. В мире также отмечается неравномерность распространения бруцеллеза как среди животных, так и среди людей. Высока заболеваемость в странах Америки, Латинской Америки, в Казахстане, Средней Азии. В начале 90-х годов прошлого столетия произошло ухудшение эпизоотической ситуации по бруцеллезу, связанное с крупными закупками овцепоголовья без соблюдения карантинных мероприятий в хозяйствах, неблагоприятных по бруцеллезу. В последние годы заболеваемость бру-

целлезом не снижается, что является следствием ослабления внимания к этой проблеме.

Человек заражается бруцеллезом в основном от мелкого и крупного рогатого скота, свиней, редко – от северных оленей. В 60 % случаев источником заболевания людей бруцеллезом служит мелкий рогатый скот, вследствие облигатной патогенности для человека *B. melitensis*. В системе эпидемиологического надзора за бруцеллезом основная роль отводится лабораторной диагностике. В соответствии с Методическими указаниями (МУ 3.1.7.1189-03) «Профилактика и лабораторная диагностика бруцеллеза людей» при исследовании биологического материала, продуктов питания и объектов внешней среды на зараженность возбудителем бруцеллеза используют бактериологический анализ и комплекс серологических реакций, основанных на выявлении специфических антител (реакции агглютинации Хеддлсона и Райта, Кумбса, связывания комплекмента, непрямой гемагглютинации, иммуноферментный анализ). Бактериологический метод лабораторной диагностики бруцеллеза считается самым достовер-

ным, однако он требует длительного времени.

В настоящее время для индикации бруцеллеза используется «Тест-система для выявления ДНК *Brucella spp.* методом ПЦР (ГенБру)», производства РосНИПЧИ «Микроб», основанная на амплификации фрагмента гена, кодирующего белок внешней мембраны бруцелл 31 кДа. Для учета результатов предусмотрено использование метода электрофореза в агарозном геле. При практическом использовании тест-системы выявлен ряд таких недостатков, как трудоемкость и длительность проведения анализа из-за двухстадийности постановки ПЦР, отсутствие системы внутреннего контроля, что способствует возможности появления ложноотрицательных результатов.

В связи с вышеизложенным, специалисты ФГУН ЦНИИ эпидемиологии и ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб» разработали набор реагентов для выявления ДНК бактерий *Brucella spp.* в биологическом материале и культурах микроорганизмов методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов, в основе которого лежит амплификация фрагмента *wbo A* гена бруцелл с регистрацией реакции по накоплению в пробирке флуоресцентного сигнала. С целью предотвращения получения ложноотрицательных результатов в тест-систему введен внутренний контрольный образец (ВКО), амплификация которого осуществляется одновременно с исследуемыми пробами. Использование такого контроля обеспечивает возможность учета эффективности проведения всех этапов ПЦР-анализа: выделение ДНК, постановка ПЦР, учет результатов, что в значительной степени повышает точность генодиагностических исследований.

Набор «АмплиСенс® *Brucella spp.*-FL» выпускается в двух вариантах: первый – «ПЦР-комплект» вариант FRT, предназначенный для ПЦР-амплификации ДНК микроорганизмов рода *Brucella spp.* с детекцией в режиме «реального времени», второй – «ПЦР-комплект» вариант FER, используемый для ПЦР-амплификации ДНК микроорганизмов рода *Brucella spp.* с детекцией по «конечной точке». Для выделения ДНК используется набор реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 50. ПЦР-анализ в режиме «реального времени» осуществляли в амплификаторе с системой детекции флуоресцентного сигнала «Rotor-Gene 3000». Для проведения ПЦР-анализа с детекцией результатов по «конечной точке» использовали амплификатор «Терцик» и флуоресцентный ПЦР-детектор «АЛА».

Материалом для исследования служили чистые культуры 42 штаммов *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae*, *B. rangiferi*, *Y. pestis*, *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *F. tularensis*, а также биологический материал от человека (кровь, сыворотка крови) и животных (плазма, молоко, паренхиматозные органы и лимфоузлы), искусственно инфицированный *B. melitensis*, *B. abortus* и *B. suis* в концентрациях $1 \cdot 10^3$ и $1 \cdot 10^4$ м.к./мл. Обеззараживание проб проводили в соответствии с МУ 1.3.2569-09

«Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Препаратом сравнения служила коммерческая тест-система для выявления ДНК *Brucella spp.* методом ПЦР (ГенБру) (ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб») в период срока годности, прошедшая контроль в специализированной лаборатории ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича.

Испытания проводили с соблюдением принципов строго контролируемого эксперимента. Испытуемые пробы для ПЦР были зашифрованы сотрудниками, не принимающими участия в постановке ПЦР и учете результатов.

В ходе проведенных испытаний с помощью набора реагентов с детекцией результатов в режиме «реального времени» (вариант FRT) чистые культуры *Brucella spp.* выявлены в концентрациях $1 \cdot 10^2$ м.к./мл – 53,8 %, $1 \cdot 10^3$ м.к./мл – 96,2 %, $1 \cdot 10^4$ м.к./мл – 100 % случаев. Использование набора с детекцией результатов по «конечной точке» (вариант FER) позволило выявить *Brucella spp.* в концентрациях $1 \cdot 10^2$ м.к./мл – 61,5 %, $1 \cdot 10^3$ м.к./мл – 96,2 %, $1 \cdot 10^4$ м.к./мл – 100 %. С помощью тест-системы (ГенБру) процент проб, содержащих *Brucella spp.* в чистых культурах, к числу исследованных штаммов составил 31 – в концентрации $1 \cdot 10^2$ м.к./мл, 85 – в концентрации $1 \cdot 10^3$ м.к./мл и 100 – в концентрации $1 \cdot 10^4$ м.к./мл.

В биологическом материале, содержащем *B. melitensis*, *B. abortus* и *B. suis* в концентрации $1 \cdot 10^3$ м.к./мл, с помощью наборов реагентов «АмплиСенс® *Brucella spp.*-FL» вариантов FRT и FER выявлено 96,5 и 97,4 % проб соответственно, с помощью тест-системы (ГенБру) – 93,5 %.

Для обоих вариантов набора «АмплиСенс® *Brucella spp.*-FL» и тест-системы (ГенБру) установлена 100 % выявляемость проб биологического материала, содержащих бруцеллы в концентрации $1 \cdot 10^4$ м.к./мл.

Специфичность набора «АмплиСенс® *Brucella spp.*-FL» и тест-системы (ГенБру) составила 100 %. Гетерологичные микроорганизмы в концентрации $1 \cdot 10^7$ м.к./мл не выявлены ни в одной пробе.

Воспроизводимость (совпадение результатов исследования положительных и отрицательных проб при 10-кратном повторении) наборов реагентов «АмплиСенс® *Brucella spp.*-FL» и тест-системы (ГенБру) равнялась 100 %.

Преимущество набора реагентов «АмплиСенс® *Brucella spp.*-FL» перед коммерческой тест-системой заключается в снижении риска перекрестной контаминации ампликонами за счет наличия в системе внутреннего контроля, что позволяет сократить возможность регистрации ложноположительных реакций; сокращении времени проведения анализа за счет отсутствия двухстадийности ПЦР и этапа постановки электрофореза в агарозном геле. По показателям специфической активности и специфичности оба

Сводные данные о результатах испытания наборов диагностических для выявления ДНК бактерий *Brucella spp.* методом ПЦР

Показатели	АмплиСенс® <i>Brucella</i> -FL		ПЦР «ГенБру», %	Бактериология (высев 100 м.к.)
	Вариант FRT, %	Вариант FER, %		
Чувствительность (% ± m) выявленных положительных проб к числу инфицированных <i>Brucella spp.</i> чистых культур, взятых на исследование				
10 ² м.к./мл	53,8	61,5	31	
10 ³ м.к./мл	96,2	96,2	85	66,5
10 ⁴ м.к./мл	100	100	100	
(% ± m) выявленных положительных проб к числу инфицированных <i>Brucella spp.</i> биологического материала, взятых на исследование				
10 ³ м.к./мл	97,4	96,5	93,5	76,5
10 ⁴ м.к./мл	100	100	100	
Специфичность (% ± m) выявленных гетерологичных микроорганизмов к числу исследованных чистых культур и биологического материала				
	0	0	0	62

препарата оказались равноценными. Общие данные о диагностической ценности набора «АмплиСенс® *Brucella spp.*-FL» представлены в таблице.

По результатам проведенных медицинских приемочных испытаний было рекомендовано для контроля активности и специфичности внести в технические условия тест-штаммы *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *Y. enterocolitica* и *F. tularensis*. В соответствии со схемой проведения исследования биологического материала и объектов окружающей среды в Инструкции по применению включены разделы «Меры предосторожности», «Взятие и хранение материала на исследование», «Дополнительные материалы и оборудование, требуемые для проведения ПЦР-анализа», «Предварительная обработка материала».

На основании полученных данных набор реагентов «АмплиСенс® *Brucella spp.*-FL» рекомендован к государственной регистрации в Российской Федерации в качестве изделия медицинского назначения. Получено Регистрационное удостоверение № ФСР 2009/04212 от 25.03.2009 г.

Таким образом, разработка принципиально новых и усовершенствование существующих методов лабораторной диагностики бруцеллеза дает возможность поднять диагностику данного заболевания на более высокий уровень. Использование молекулярно-генетических подходов и сочетание их с традиционными лабораторными методами позволит быстро и качественно проводить диагностику заболевания у людей и животных, в максимально короткие сроки выявлять патогенные агенты. Это значительно повысит эффективность лечения, обеспечит своевременное проведение необходимых противоэпидемических мероприятий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Онищенко Г.Г., Монисов А.А., Гульченко Л.П., Федоров Ю.М. Заболеваемость зооантропонозными и природноочаговыми инфекциями и меры по их профилактике. Журн. микробиол., эпидемиол и иммунобиол. 1999; 4:14–7.
2. Профилактика и борьба с заразными болезнями, общими для человека и животных: Сб. санитарных и ветеринарных правил. М.: Информ. издат. центр Госкомсанэпиднадзора; 1996. 256 с.
3. Черкасский Б.Л., Иванова А.А. Эпидемиологическая ситуация по зоонозам в России. Эпидемиол. и инф. бол. 1996; 2:12–5.

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

1. Onishchenko G.G., Monisov A.A., Gul'chenko L.P., Fedorov Yu.M. [Morbidity from natural-focal and zoonothropotic infections and measures for their prevention]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 1999; 4:14–7.
2. [Prophylaxis and Control of Contagious Diseases, Common for Both Humans and Animals: The Digest of Sanitary and Veterinary Regulations]. Moscow: Inform. Izd. Tsentr Goskomsanepidnadzor; 1996. 256 p.
3. Cherkassky B.L., Ivanova A.A. [Epidemiological situation on zoonotic infections in the Russian Federation]. Epidemiol. Inf. Bol. 1996; 2:12–5.

Authors:

- Malakhaeva A.N., Sayapina L.V., Barulina I.S., Kasina I.V., Abdrashitova A.S. L.A. Tarasevich State Research Institute for Standardization and Control. Sivtsev Vrazhek Lane, 41 Moscow, 119002, Russia. E-mail: gisk@info.ru
- Osinina N.A., Sharova I.N., Mayorov N.V., Zaytseva L.V., Mironova N.P. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: microbe@san.ru
- Yatsyshina S.B. Central Research Institute of Epidemiology. Novogireevskaya St., 3a, Moscow, 111123, Russia. E-mail: syatsyshina@pcr.ru

Об авторах:

- Малахаева А.Н., Саяпина Л.В., Барулина И.С., Касина И.В., Абрашитова А.С. Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А.Тарасевича, 119002, Москва, пер. Сивцев Вражек, 41, E-mail: gisk@info.ru
- Осинина Н.А., Шарова И.Н., Майоров Н.В., Зайцева Л.В., Миронова Н.П. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru
- Яцышина С.Б. Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии. 111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3а. E-mail: syatsyshina@pcr.ru

Поступила 14.09.10.