

РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ УСОВЕРШЕНСТВОВАННОГО НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАЦИЙ, СВЯЗАННЫХ С ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ *Mycobacterium tuberculosis complex* К РИФАМПИЦИНУ И ИЗОНИАЗИДУ, МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Микулович Ю.Л., Зайцева А.И., Шипулин Г.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России), Москва, Россия

Введение. Молекулярно-генетические методы (МГМ) анализа играют важную роль в комплексной диагностике туберкулеза (ТБ), в том числе его лекарственно устойчивых форм, поскольку позволяют быстро и эффективно получать результаты в тот же день, когда был сдан биологический материал в лабораторию, что очень важно для назначения больному своевременной корректной схемы противотуберкулезной терапии. Использование МГМ рекомендовано ВОЗ [1] и федеральными клиническими рекомендациями «Туберкулез у взрослых» [2]. Ранее в ФГБУ «ЦСП» ФМБА России был разработан и зарегистрирован как медицинское изделие для диагностики *in vitro* (МИ IVD) набор реагентов (НР) «АмплиТест[®] МБТ-Резист-I» (РУ № РЗН 2022/16720), который позволяет выявлять широкий спектр мутаций в области RRDR и кодоне 572 гена *rpoB*, кодоне 315 гена *katG* и участке промоторной области гена *inhA* (регуляторной области *fabG1-inhA*), связанных с устойчивостью *M. tuberculosis complex* (МБТ) к рифампицину (RIF) и изониазиду (INH). Его усовершенствованной версией стал НР «АмплиТест[®] МБТ-Резист-I Луо», основными преимуществами которого по сравнению с прежним НР являются: 1) аналитическая чувствительность 500 ГЭ/мл, 2) удобство использования благодаря наличию трех готовых лиофилизированных реакционных смесей в стрипованных пробирках, что позволяет сократить временные и трудовые затраты при подготовке образцов к анализу, снизить риск ошибок пользователя, сэкономить расходные материалы, 3) возможность анализировать пробы ДНК из мочи, 4) адаптация к амплификатору QuantStudio 5.

Цель и задачи. Цель работы – оценка эффективности НР «АмплиТест[®] МБТ-Резист-I Луо» на основе ПЦР-РВ при выявлении генетических маркеров резистентности МБТ к RIF и INH в образцах биологического материала в сравнении с аналогичным по назначению зарегистрированным российским НР в клинических испытаниях для регистрации нового набора реагентов в качестве МИ IVD. Для достижения цели были поставлены следующие задачи: 1) исследовать одни и те же образцы с помощью испытуемого набора «АмплиТест[®] МБТ-Резист-I Луо» и набора сравнения, 2) сравнить результаты, 3) вычислить показатели эффективности испытуемого НР относительно набора сравнения.

Материалы и методы. Клинические испытания проведены в государственном бюджетном учреждении здравоохранения Московской области «Московский областной клинический противотуберкулезный диспансер» (ГБУЗ МО «МОКПТД»). Был исследован 251 образец ДНК, полученный из биологического материала человека (мокроты (N=73), бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) (N=51), биоптата (операционного материала; N=77), мочи (N=50)) от пациентов с ТБ легких и внелегочной локализации, содержащих ДНК МБТ в концентрации не менее 1000 ГЭ/мл, и 101 образец ДНК культур МБТ. В качестве наборов сравнения использовали НР «АмплиТест[®] МБТ-Резист-I Луо» (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, РУ № РЗН 2022/16720) для всех биологических образцов, кроме мочи, и «Амплитуб-МЛУ-РВ» (ООО «Синтол», Россия, РУ № ФСР 2010/07636) для мочи.

Выделение тотальной ДНК и отбор проб ДНК МБТ в требуемой концентрации осуществляли с помощью НР «АмплиТест® МБТ» (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, РУ № РЗН 2023/20838) и «Амплитуб-РВ» (ООО «Синтол», Россия, РУ № ФСР 2010/07635). Амплификацию проводили с использованием приборов: CFX96 (Bio-Rad, США), ДТпрайм (ДНК-Технология, РФ), QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США) – как вручную, так и с помощью специального ПО для автоматической интерпретации результатов.

Оценивали следующие показатели эффективности (с доверительной вероятностью 95%): **положительное соответствие результатов (ПСР)** – доля образцов, содержащих ДНК МБТ, в которых с помощью испытуемого НР обнаружены мутации, связанные с устойчивостью МБТ к RIF или INH, среди образцов с соответствующими мутациями, выявленными с помощью набора сравнения; **отрицательное соответствие результатов (ОСР)** – доля образцов, содержащих ДНК МБТ, в которых с помощью испытуемого НР не обнаружены мутации, связанные с устойчивостью МБТ к RIF или INH, среди образцов, в которых мутации не выявлены с помощью набора сравнения. Данные показатели были рассчитаны суммарно для всех видов биологического материала человека и отдельно для культур МБТ, для каждого противотуберкулезного препарата отдельно. Доверительные интервалы (ДИ 95%) рассчитывали по методу Клоппера и Пирсона [3].

Основные результаты. Среди 251 исследованной пробы ДНК из образцов биологического материала человека, содержащей ДНК МБТ, мутация в гене *rpoB*, связанная с устойчивостью МБТ к RIF, была выявлена в 121 пробе и испытуемым НР, и наборами сравнения: мутация S531L (N=108), в области кодона 526 (N=5), кодона 516 (N=4) и др. В 130 пробах ДНК мутации в гене *rpoB* не были обнаружены ни одним из наборов. Таким образом, ПСР выявления мутаций, связанных с устойчивостью МБТ к RIF, составило 100 % (ДИ 95%: 97,00–100%), ОСР – 100 % (ДИ 95%: 97,20-100%).

Мутации в гене *katG* и (или) промоторной области гена *inhA*, связанные с устойчивостью МБТ к INH, обнаружены в 119 пробах ДНК из биологического материала человека с использованием испытуемого НР и наборов сравнения. В 132 пробах ДНК мутации не выявлены ни в гене *katG*, ни в промоторной области гена *inhA* ни одним из наборов. Следовательно, ПСР выявления мутаций, связанных с устойчивостью МБТ к INH, составило 100 % (ДИ 95%: 96,95–100%), ОСР – 100 % (ДИ 95%: 97,24–100%).

Среди 101 исследованной пробы ДНК культур МБТ в 51 пробе ДНК была выявлена мутация в гене *rpoB*, связанная с устойчивостью МБТ к RIF, и испытуемым НР, и набором сравнения: мутация S531L (N=37), в области кодона 526 (N=5), кодона 516 (N=6) и др. В 50 пробах ДНК мутации в гене *rpoB* не обнаружены ни одним из наборов реагентов. Таким образом, ПСР выявления мутаций, связанных с устойчивостью МБТ к RIF, составило 100 % (ДИ 95%: 93,02–100%), ОСР – 100 % (ДИ 95%: 92,89-100%).

Мутации в гене *katG* и (или) промоторной области гена *inhA*, связанные с устойчивостью МБТ к INH, выявлены в 50 пробах ДНК культур МБТ всеми наборами реагентов. В 51 пробе ДНК культур МБТ мутации не обнаружены ни в гене *katG*, ни в промоторной области гена *inhA* ни одним из наборов реагентов. Следовательно, ПСР выявления мутаций, связанных с устойчивостью МБТ к INH, составило 100 % (ДИ 95%: 92,89–100%), ОСР – 100 % (ДИ 95%: 93,02–100%).

Дискордантных результатов не выявлено ни в одном случае.

Выводы. В результате проведенных дорегистрационных клинических испытаний нового НР «АмплиТест® МБТ-Резист-I Луо» получено полное совпадение результатов и высокие показатели его эффективности (ПСР и ОСР – 100% соответственно) относительно наборов сравнения при выявлении мутаций, связанных с устойчивостью МБТ как к RIF, так и к INH, как для образцов биологического материала человека (мокроты, БАЛ, биоптата (операционного материала), мочи), так и для культур МБТ.

Литература

1. Global tuberculosis report 2022. Geneva: World Health Organization; 2022. – 51 p.
2. Клинические рекомендации «Туберкулез у взрослых» 2022 г. – М.: 2022. – 151 с.
3. Clopper C., Pearson E. The use of confidence or fiducial limits illustrated in the case of the binomial // *Biometrika*. – 1934. – V. 26, № 4. – P. 404-413.

РАЗРАБОТКА ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ РНК ЭНТЕРОВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА С ДИФФЕРЕНЦИАЦИЕЙ ЭНТЕРОВИРУСА 68 ТИПА

Полякова В.А.¹, Лупарев А.Р.¹, Давыдова Е.Е.¹, Шуряева А.К.¹, Толоконцева А.А.¹, Девятков А.А.¹, Гордукова М.А.², Шипулин Г.А.¹

¹ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, Москва, Россия

²ГБУЗ «ДГКБ №9 им. Г. Н. Сперанского ДЗМ», Москва, Россия

Введение. Энтеровирусная инфекция (ЭВИ) – повсеместно распространенное инфекционное заболевание, вызываемое вирусами рода *Enterovirus*, семейства *Picornaviridae*. Симптоматика ЭВИ может варьировать от субклинических форм и легкого протекания болезни до тяжелых неврологических состояний с летальными исходами. Среднегодовалый уровень заболеваемости ЭВИ в РФ на протяжении 2010-2019 гг. составляет 7,02 случаев на 100 тыс. населения, причем удельный вес энтеровирусного менингита (ЭВМ) 30%. Преимущественно подвержены заболеваемости ЭВИ дети в возрасте до 17 лет. Как правило тяжелое течение ЭВИ связано с определенными штаммами энтеровирусов, так в последнее десятилетие зафиксированные вспышки ЭВМ были обусловлены циркуляцией штаммов эховирусов 6, 11, 13, 30, вируса Коксаки А9, энтеровируса А71 и др. [1, 2]. В настоящее время большую озабоченность вызывает энтеровирус D68 (EV-D68), по данным CDC связанный с развитием острого вялого миелита у детей [3], однако в РФ отсутствуют данные о распространенности и значимости данного серотипа. В связи с этим изучение эпидемиологической ситуации в РФ по распространению различных серотипов энтеровирусов у детей с ЭВИ и разработка метода для выявления и дифференциация EV-D68 ввиду его клинической значимости для своевременной терапии имеют большое значение.

Цель и задачи. Изучение эпидемиологической ситуации в РФ по распространению различных серотипов энтеровирусов у детей с ЭВИ. Разработка качественной диагностической тест-системы для выявления РНК энтеровирусов А, В, С и D с дифференциацией EV-D68 в биологическом материале методом ОТ-ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в реальном времени.

Материалы и методы. Были выбраны диагностические праймеры и зонды в 5'-нетранслируемой области (5'-UTR) генома энтеровирусов. Для подбора праймеров использовались программа UGENE и интернет-ресурсы Integrated DNA Technologies, BLAST, Primer Blast.

Для ручного выделения РНК из биологического материала использовали набор «АмплиТест РИБО-преп», для экстракции в автоматическом режиме использовали набор «АмплиТест Магно-Сорб-Комбо» (ФГБУ «ЦСП ФМБА», Россия).

В качестве внутреннего контрольного образца (ВКО) использовали искусственно синтезируемую рекомбинантную последовательность РНК, заключенную в оболочку MS2-фага. В качестве положительного контрольного образца (ПКО) использовали

рекомбинантную РНК, содержащую 5'-UTR участок генома энтеровируса. Концентрацию препаратов РНК измеряли методом капельной ПЦР с использованием системы QX200 Droplet Digital PCR System (Bio-Rad Laboratories, США). Для комплектации ОТ-ПЦР тест-системы использовали реагенты производства ФГБУ «ЦСП» ФМБА. Аналитическую специфичность оценивали на панели РНК штаммов энтеровирусов и близкородственных вирусов. Диагностические характеристики оценивали при анализе клинического материала, собранного в период с октября 2021г. по ноябрь 2022г. ГБУЗ «ДГКБ №9 им. Г.Н. Сперанского ДЗМ» г. Москвы.

Основные результаты. Праймеры и зонды были выбраны в области 5'-UTR консервативной для всех типов энтеровирусов, таким образом, чтобы исключить случайное выявление генетически близких к энтеровирусам риновирусов. Также отдельно были выбраны праймеры и зонд специфичные к геному EV-D68, имеющего большую клиническую значимость.

Предварительно 5'-UTR участок генома отечественных изолятов энтеровирусов (n=131) в области выбранных праймеров был секвенирован по методу Сэнгера, для того, чтобы учесть значимые полиморфизмы, также часть изолятов (n=43) секвенированы в области гена капсидного белка VP1. По результаты секвенирования выявлены РНК вирусов Коксаки А6 (n=58), А10 (n=29), А4 (n=7), А5 (n=5), А2 (n=2), В5 (n=2), А16 (n=1), В3 (n=1), эховирусов 9 (n=3), 6 (n=14), 11 (n=1), энтеровируса D68 (n=8).

Был разработан диагностический набор, представляющий собой мультиплексную ОТ-ПЦР в реальном времени, позволяющий детектировать ВКО по каналу FAM, РНК энтеровирусов А, В, С и D по каналу HEX с дифференциальным выявлением EV-D68 по каналу Cy5. Оптимизация набора реагентов производилась на амплификаторах: Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США), ДТпрайм («ДНК-технология», Россия). Было показано, что набор позволяет выявлять РНК энтеровирусов из мазков со слизистой носо- и ротоглотки, фекалий и спинномозговой жидкости (СМЖ) и имеет предел обнаружения $5 \cdot 10^3$ копий/мл. Оценка специфичности набора была проведена на панели штаммов энтеровирусов видов А (n=2), В (n=23), С (n=1), риновируса (n=7), пареховируса (n=2), аденовируса (n=9), коронавируса (n=1), респираторно-синцитиального вируса (n=3), вирусов гриппа А (n= 8), В (n=1), С (n=1) и парагриппа (n= 3), а также на ДНК человека. Было показано отсутствие перекрестных реакций. Высокие диагностические показатели набора оценивали на предварительно охарактеризованном клиническом материале (таблица 1).

ТАБЛИЦА 1. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Образцы	«АмплиСенс Enterovirus-FL», секвенирование кДНК	Результаты применения тестируемого набора реагентов			
		РНК EV (EV-D68)		Диагностическая	
		Обнаружена	Не обнаружена	Чувств-ть (ДВ 95 %), в интервале	Специфич-ть (ДВ 95 %), в интервале
Мазки (372)	252 содержат РНК EV, 8 содержат РНК EV-D68	252 (8)	0	99-100%	97-100%
	120 не содержат РНК EV	0	120		
Фекалии (210)	40 содержат РНК EV	40 (0)	0	91-100%	98-100%
	170 не содержат РНК EV	0	170		
СМЖ (119)	9 содержат РНК EV	9 (0)	0	66-100%	97-100%
	110 не содержат РНК EV	0	110		

Выводы. Проведен мониторинг по циркуляции штаммов энтеровирусов в период с 2021г. по 2022г. в г. Москва. Разработан набор реагентов на основе ОТ-ПЦР для выявления РНК энтеровирусов А, В, С и D с дифференциацией EV-D68 в различном клиническом

материале. Показаны высокие аналитические и диагностические характеристики набора реагентов.

Список литературы:

1. Шостакович-Корецкая Л.Р. и др. Здоровье ребенка. 2016. №8 (76). С. 78-81. DOI: 10.22141/2224-0551.8.76.2016.90829.
2. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в РФ в 2022 году: Государственный доклад. М.: Роспотребнадзор. 2023. С. 225-227.
3. Zhang, C. at al. Nature Communications. 2021. Vol. 12, № 2904. DOI: 10.1038/s41467-021-23199-5.

ПЕРСПЕКТИВЫ ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ С ПОМОЩЬЮ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ

Толоконцева А.А.¹, Шуряева А.К.¹, Давыдова Е.Е.¹, Полякова В.А.¹, Лупарев А.Р.¹, Девятков А.А.¹, Гордукова М.А.², Шипулин Г.А.¹

¹ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, Москва, Россия

²ГБУЗ «ДГКБ №9 им. Г. Н. Сперанского ДЗМ»

Введение. Развитие молекулярных методов упростили идентификацию возбудителей кишечных инфекций, обеспечивая высокую чувствительность и специфичность выявления [1, 2]. Необходимость быстрого реагирования при лечении кишечных инфекций указывает на важность создания не только надежных, но вместе с тем и быстрых диагностических тестов, таких как изотермическая петлевая амплификация LAMP, позволяющая сократить время реакции до 15-30 минут. Вариабельность генома некоторых возбудителей кишечных инфекций, таких как норовирусы и ротавирусы, является фактором, ограничивающим применение LAMP для их диагностики из-за необходимости использования большого набора праймеров, охватывающих протяженный участок генома. Однако, для выявления возбудителей инфекций, имеющих достаточно консервативные участки генома, таких как *Salmonella*, *Shigella*/EIEC, *Campylobacter*, *adenoviruses* LAMP может стать хорошим диагностическим инструментом, в том числе в перспективе для реализации тестов у постели больного. В связи с этим актуальной задачей является разработка методики для выявления возбудителей кишечных инфекций *Shigella* spp/EIEC, *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp, Human *adenoviruses* F методом петлевой изотермической амплификации с флуоресцентной детекцией.

Цель и задачи. Разработка качественной и высокочувствительной диагностической тест-системы для выявления возбудителей кишечных инфекций *Shigella* spp/EIEC, *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp, Human *adenoviruses* F методом петлевой изотермической амплификации с флуоресцентной детекцией.

Материалы и методы. Были выбраны диагностические праймеры и зонды в области гена *ipaH* для *Shigella*/EIEC, для термофильных *Campylobacter* spp в области гена *CJE0832*, ген *гексон* был выбран для Аденовирусов группы F и ген *InvA* для *Salmonella* spp. Для множественного выравнивания целевых последовательностей возбудителей ОКИ *Shigella* spp., *Salmonella* spp., энтероинвазивных *E. coli*, *Campylobacter* spp, Human *adenoviruses* F использовали программу Mega X, алгоритм Clustal W. LAMP-праймеры были подобраны с использованием Primer Explorer V (Fujitsu, Япония) и ресурса поиска гомологичных последовательностей NCBI BLAST.

Для ручного выделения нуклеинового материала из осветленного экстракта фекалий использовали набор АмплиТест РИБО-преп (ФГБУ ЦСП ФМБА, Россия). В качестве внутреннего контрольного образца (ВКО) использовали искусственно синтезируемую рекомбинантную последовательность ДНК, заключенную в оболочку λ -бактериофага. В качестве положительного контроля LAMP использовали смесь плазмид, содержащих фрагменты ДНК *Salmonella* spp., *Shigella* spp./*E.coli*, *Campylobacter* spp. и аденовирусов группы F. Концентрацию препаратов ДНК измеряли методом капельной ПЦР с использованием системы QX200 Droplet Digital PCR System (Bio-Rad Laboratories, США). Для комплектации тест-системы на основе LAMP использовали реагенты производства ФГБУ «ЦСП» ФМБА. Аналитическую специфичность оценивали на панели ДНК штаммов целевых инфекций, а также близкородственных вирусов и бактерий.

Диагностические характеристики оценивали при анализе клинического материала, собранного в период с 2022г. по 2023г. ГБУЗ «ДГКБ №9 им. Г.Н. Сперанского ДЗМ» г. Москвы. Наличие ОКИ в клинических образцах от пациентов подтверждали с помощью зарегистрированного ПЦР набора АмплиСенс ОКИ-скрин-FL.

Основные результаты. После подбора праймеров на целевые участки мишеней, были оптимизированы условия LAMP для проведения амплификации в мультиплексном формате. В одной пробирке проходит амплификация ДНК Human adenoviruses F по каналу HEX и ДНК *Salmonella* spp по каналу ROX, а в другой пробирке амплифицируется ДНК *Shigella* spp по каналу HEX, ДНК *Campylobacter* spp каналу ROX и ДНК контрольного образца экстракции (λ -бактериофага) каналу FAM. Оптимизация условий амплификации была достигнута за счет снижения концентрации олигонуклеотидов в реакционных смесях, так как использование моноплексных концентраций приводило к значительному замедлению LAMP. Выбранные оптимальные соотношения праймеров для мультиплексной LAMP амплификации позволили достичь замедления реакции не более чем на не более 2-5 минут для всех ДНК мишеней с сохранением неискаженной экспоненциальной формы, при сравнении с моноплексным форматом. Оптимизация набора реагентов производилась на амплификаторах: Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США), ДТпрайм («ДНК-технология», Россия). Было показано, что набор позволяет выявлять ДНК возбудителей кишечных инфекции *Salmonella* spp., *Shigella* spp., энтероинвазивных *E.coli*, термофильных *Campylobacter* spp. и аденовирусов группы F методом изотермической амплификации из осветленного экстракта фекалий и имеет предел обнаружения $5 \cdot 10^3$ копий/мл для всех показателей. Для проверки специфичности использовали различные аденовирусные и бактериальные штаммы, а также ДНК человека. Было показано отсутствие перекрестных реакций. Высокие диагностические характеристики набора оценивали на предварительно охарактеризованном клиническом материале (таблица 1). Наличие *Salmonella* spp., *Shigella* spp., энтероинвазивных *E.coli*, термофильных *Campylobacter* spp. и аденовирусов группы F в 80 клинических образцах от пациентов подтверждали с помощью зарегистрированного ПЦР набора АмплиСенс ОКИ-скрин-FL.

ТАБЛИЦА 1. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

ДНК мишень	«АмплиСенс ОКИ скрин-FL»	Результаты применения тестируемого набора реагентов			
		Обнаружена ДНК	Не обнаружена ДНК	Специфичность	Чувствительность
				Интервал, % (p=95%)	Интервал, % (p=95%)
Human adenoviruses F	31 (80)	30 (80)	50(80)	92.8 100.0	83.8 - 99.9
<i>Salmonella</i>	19(80)	19(80)	61(80)	94.2 100.0	81.5 - 100.0
<i>Shigella</i>	12 (80)	12 (80)	68 (80)	94.6 100.0	75.3 - 99.9
<i>Campylobacter</i>	19 (80)	18 (80)	62(80)	94.2 100.0	72.7 - 99.9

Выводы. Разработан диагностический набор реагентов для выявления возбудителей кишечных инфекций *Shigella spp*/EIEC, *Salmonella spp*, *Campylobacter spp*, Human adenoviruses F методом петлевой изотермической амплификации с флуоресцентной детекцией. Показаны высокие аналитические и диагностические характеристики набора реагентов.

1. Logan C, O'Leary JJ, O'Sullivan N. Real-time reverse transcription-PCR for detection of rotavirus and adenovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis in children. *J Clin Microbiol.* 2006 Sep;44(9):3189-95. doi: 10.1128/JCM.00915-06. PMID: 16954246; PMCID: PMC1594742.
2. Gallichan S, Perez-Sepulveda BM, Feasey NA, Hinton JCD, Thomas J, Smith AM. Multiplex PCR Assay for Clade Typing of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis. *Microbiol Spectr.* 2022 Dec 21;10(6): e0318222. doi: 10.1128/spectrum.03182-22. Epub 2022 Nov 21. PMID: 36409092; PMCID: PMC9769638.

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ С ВЫДЕЛИТЕЛЬНОЙ ЧАСТЬЮ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ДНК ПРОСТЕЙШИХ ПАРАЗИТОВ В ФЕКАЛИЯХ ЧЕЛОВЕКА

Девятков А.А., Давыдова Е.Е., Лупарев А.Р., Полякова В.А., Толоконцева А.А., Шуряева А.К., Шипулин Г.А.

ФГБУ «ЦСП» ФМБА, Москва, Россия

Введение. Паразитарные заболевания в мире занимают значимую долю в структуре инфекционных заболеваний. В России по данным Роспотребнадзора ежегодно регистрируется около 250 тыс. случаев паразитарных заболеваний в год. При этом, согласно ряду оценок, это количество сильно занижено, и реальное количество людей, заражённых паразитами, может достигать 20 млн. На сегодняшний день золотым стандартом диагностики паразитозов являются методы микроскопии. Однако данные методы требуют высокой квалификации специалистов, что затрудняет их широкое применение. Наиболее остро проблема качественной диагностики стоит для протозойных инфекций, так как простейших труднее обнаруживать в биологическом материале по сравнению с яйцами гельминтов ввиду их меньшего размера и многообразия жизненных форм. Кроме того, отдельные виды простейших, например, *Cryptosporidium spp.* практически невозможно обнаружить без специального окрашивания. Так, согласно статистике Роспотребнадзора, в общей структуре выявленных паразитозов доля гельминтозов в 2022 г. составила 88,3 %, протозоозов – 11,7 %. Кроме того, некоторые простейшие, такие как *Blastocystis spp* или *Dientamoeba fragilis*, не учитываются в государственной статистике ввиду их неопределённого патогенного потенциала. В связи с этим, актуальной является разработка и внедрение более универсальных, стандартизуемых и чувствительных методов молекулярной диагностики протозоозов, таких как ПЦР. Одной из главных проблем на пути внедрения молекулярнодиагностических методов диагностики протозоозов в клиническую практику является отсутствие стандартизированного эффективного метода выделения паразитарной ДНК из клинических образцов. В первую очередь это относится к диагностике внутрикишечных протозоозов, так как фекалии представляет собой многокомпонентную матрицу, содержащую самые разные соединения, в том числе желчные кислоты и другие вещества, которые ингибируют реакцию амплификации.

Цель работы. Разработка тест-системы с выделительной частью для обнаружения в фекалиях человека ДНК простейших паразитов *Cryptosporidium spp*, *Giardia intestinalis*, *Blastocystis spp*, *Dientamoeba fragilis*, *Cystoisospora belli*, *Cyclospora cayetanensis* на основе метода ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

Материалы и методы. Для разработки метода выделительного комплекта реагентов использовали модельные образцы фекалий (n=10) от телят, питающихся молоком, предварительно охарактеризованные, как содержащие цисты криптоспоридий. Исходные образцы суспендировали в 70% этиловом спирте в соотношении примерно 1:1. Далее образцы хранили на +4° С для последующего выделения. Для предварительного концентрирования образцов использовали концентраторы фирмы ООО «ГЕМ» (Россия), в которых раствор производителя был заменён на раствор нашей собственной разработки. Для разработки ПЦР-комплекта реагентов использовали образцы ранее выделенной ДНК фекалий (n=73) различных людей, предоставленные сотрудником ФГБУ «ЦСП» ФМБА России А.С. Курносковым. Для выбора олигонуклеотидных праймеров и зондов использовали последовательности генов-мишеней из базы данных NCBI, множественное выравнивание проводили в программе UGENE. Оценивали наличие неспецифических вторичных структур с использованием программы PrimerSelect, проверку специфичности проводили с помощью BLAST. Аналитическую чувствительность ПЦР оценивали на плазмидных препаратах с известной концентрацией, содержащих целевые фрагменты ДНК. Концентрацию ДНК определяли с помощью цифровой капельной ПЦР X200 Droplet Digital PCR System (Bio-Rad Laboratories, США). ПЦР реакционные смеси содержали целевые праймеры в концентрации 0,32 мкМ, зонды в концентрации 0,16 мкМ каждого, 0,2 мМ dNTP, 2,5 ед. Taq-полимеразы в однократном FRT буфере (АО Гентерра, Россия). Объем реакционной смеси 25 мкл, из них объем исследуемого образца – 10 мкл. Условия амплификации – предварительный прогрев при 95° С (15 мин), далее 45 циклов: 95° С – 15 с, 58° С – 30 с, 72° С – 15 с.

Результаты и обсуждения. Комплект для ПЦР-детекции был разработан в мультиплексном формате для одновременной детекции ДНК шести целевых протозойных паразитов в двух ПЦР-смесях. Были выбраны олигонуклеотидные праймеры и зонды, и в предложенных сочетаниях была подтверждена специфичность и отсутствие кросс-реакций с близкородственными видами и клиническим материалом, не содержащим целевых видов. Для каждого показателя установлена аналитическая чувствительность не менее 1×10^3 ГЭ/мл.

В процессе разработки выделительной части набора было показано, что исходный раствор, используемый в концентраторах ООО «ГЕМ» не является оптимальным для целей диагностики с использованием ПЦР, так как основан на 10% растворе формалина. Вследствие этого, был разработан собственный концентрирующий раствор, основанный на фосфатном буфере. Для механического дробления образцов были выбраны бусины из диоксида циркония, легированные оксидом иттрия, так как они не разрушают друг друга в процессе дробления и не сорбируют на себя ДНК. При выборе колонок для сорбции ДНК было показано, что ввиду большого количества нуклеиновых кислот в исследуемом материале для эффективной экстракции паразитарной ДНК недостаточно 4 слоёв силики (например, колонки AAS204SI2 biopharmexpert), и предпочтительными являются колонки с 8 слоями силики (например, 8-слойная колонка GenFollower). Выделительный комплект реагентов был успешно протестирован на образцах нативного кала, а также на образцах фекалий, суспендированных в фосфатном буфере, физиологическом растворе (0,9% NaCl), и в 70% этиловом спирте.

Все образцы фекалий от молочных телят предварительно охарактеризованные, как содержащие криптоспоридий (n=10) показали положительный результат на наличие ДНК *Cryptosporidium spp*. При анализе образцов ранее выделенной ДНК из лабораторной

коллекции (n=73) наиболее распространённым выявляемым простейшим оказался *Blastocystis spp.*, ДНК которого была выявлена в 32 пробах (44%). Данный показатель соответствует верхним оценкам распространённости данного микроорганизма в средних широтах. Вторым по распространённости среди исследуемых простейших была *Dientamoeba fragilis*. Было обнаружено 9 положительных образцов (12%). Из них в 5 образцах наблюдалась коинфекция *Blastocystis spp.* Кроме того, был найден один образец, содержащий ДНК *Cryptosporidium spp.* Наличие целевых ДНК в образцах было подтверждено секвенированием.

Заключение. Нами был разработан набор реагентов с выделительной частью для обнаружения паразитарной ДНК в фекалиях, который может работать как с нативными фекалиями, так и с ресуспендированными в спирте, физрастворе и фосфатно-солевом буфере. Выделение включает в себя 4 стадии: (1) концентрирование цист и яиц паразитов, (2) механическое дробление образца с помощью керамических бусин в лизирующем буфере, (3) осаждение ингибиторов ПЦР, (4) преципитация ДНК из гомогената на колонках из силики с последующей элюцией. Широкая распространённость *Blastocystis spp.* в клинических образцах, показанная в настоящем исследовании, свидетельствует о необходимости дальнейшего исследования данного микроорганизма и его роли в генезе кишечных заболеваний.

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСА ГРИППА А СУБТИПА Н5 У ПТИЦ, В ТОМ ЧИСЛЕ ВЫСОКОПАТОГЕННОГО ГРИППА А ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КЛАДЫ 2.3.4.4b

Шуряева А.К.¹, Давыдова Е.Е.¹, Толоконцева А.А.¹, Полякова В.А.¹, Лупарев А.Р.¹, Девятов А.А.¹, Шипулин Г.А.¹

¹ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, Москва, Россия

Введение. Вирус гриппа А субтипа Н5 вызывает заболевания различных видов птиц, а также потенциально опасен для других видов животных и человека из-за способности некоторых штаммов к преодолению межвидовых барьеров и возникновению новых высокопатогенных штаммов. В последние годы неоднократно регистрировались случаи заражения высокопатогенным гриппом субтипа Н5 с высокой смертностью у человека и других млекопитающих. В связи с этим своевременное выявление случаев распространения вируса гриппа А Н5 субтипа среди птиц имеет большое значение для сдерживания потенциальных угроз пандемии высокопатогенного гриппа Н5.

Так, в 2022-23 гг в ряде стран, в том числе и в России, были зарегистрированы массовые вспышки заболевания среди домашней и сельскохозяйственной птицы, диких птиц и млекопитающих, вызванные вирусом птичьего гриппа А субтипа Н5, принадлежащего генетической кладе 2.3.4.4b. С 2022 года Всемирная Организация Защиты Животных зафиксировала беспрецедентное распространение гриппа птиц данной клады среди млекопитающих из 10 стран на трех континентах, поражающих как сухопутных, так и морских млекопитающих, в общей сложности инфицировано не менее 26 видов млекопитающих, включая норок, лисиц, тюленей, морских львов, кошек и собак. У зараженных животных наблюдались неврологические и респираторные симптомы с достаточно высокой смертностью.

С целью предотвращения дальнейшего распространения высокопатогенного вируса гриппа, необходимы качественные высокочувствительные методики, способные эффективно выявить в том числе генотипы вируса, которые вызывали недавние вспышки заболевания.

Цель и задачи. Разработка методики для выявления вируса гриппа А субтипа Н5 с дифференциацией высокопатогенной генетической клады 2.3.4.4b, вызвавшей в последние годы массовые вспышки заболевания среди птиц и млекопитающих.

Материалы и методы. Для выбора диагностических праймеров и зондов было построено множественное выравнивание последовательностей гена гемагглютинина вируса птичьего гриппа А субтипа Н5 в программе Mega 11, алгоритм Clustal W и выбраны наиболее консервативные участки. Дизайн праймеров и зондов проводили в соответствии со стандартными требованиями к выбору олигонуклеотидных праймеров и TaqMan-зондов.

Экстракция РНК из образцов биологического материала птиц (мазки из клоаки, ротоглотки, тканевой (аутопсийный) материал трахеи и легких, селезенки, головного мозга, воздухоносных мешков, кишечника, сердца, почек; мазки биологического материала на транспортных ФТА картах) проводилась с помощью набора реагентов Рибо-преп-ВЕТ (ФГБУ «ЦСП» ФМБА, Россия).

В качестве внутреннего контрольного образца (ВКО) использовали искусственно синтезированную рекомбинантную последовательность РНК, заключенную в оболочку ms2-фага. Положительный контрольный образец (ПКО) представляет собой смесь рекомбинантных РНК, содержащую целевой участок генома вируса гриппа субтипа Н5, а также целевой участок генома вируса гриппа субтипа Н5 генетической клады 2.3.4.4b, в оболочке бактериофага ms2. Концентрацию РНК ВКО и ПКО измеряли методом цифровой капельной ПЦР с использованием системы QX200 Droplet Digital PCR System (Bio-Rad Laboratories, США).

Аналитическую чувствительность оценивали на модельных образцах биологического материала с добавлением разведений положительного контрольного образца. Аналитическую специфичность оценивали на панели РНК штаммов вируса гриппа, включая штаммы вируса гриппа А (H1N1)pdm (А/С.-Петербург/НИИГ-94/20) (1:32 ГА), вируса гриппа А (H2N3) (А/Утка/Германия-1215/73) (1x10⁵,5 LD50/мл), вируса гриппа А (H3N2) (А/Красноярск/НИИГ-20/21) (1:128 ГА), вируса гриппа А (H5N1) (А/Скворец/233/07/1/2011) (1:256 ГА), вируса гриппа А (H5N1) (А/NIBRG/14) (1:128 ГА), вируса гриппа А (H5N3) (А/duck/Moscow/4971/13) (1:256 ГА), вируса гриппа А (H7N3) (А/Mallard/NT/12/2002) (1:128 ГА), вируса гриппа А (H7N7) (А/Equine/Corbora/5/1976) (1:128 ГА), вируса гриппа А (H7N9) (А/Anhui/1/2013) (1:128 ГА), вируса гриппа А (H9N2) (А/НК/1073/1999) (1:128 ГА), вируса гриппа А (H9N2) (А/Чирок/Колотун/Приморье/3628/2002) (1:32 ГА), вируса гриппа А (H10N5) (А/mallard/Dagestan/004/2018) (1:32 ГА), вируса гриппа В (В/С. Петербург/НИИГ-183/2020) вируса гриппа С (С/Taylor/1233/1947, вируса гриппа А (H5N8) (А/common tern/Uvs-Nuur/26/2016), вируса гриппа А (H5N1) (А/black-headed gull/Sykytykar/RII-24M/2023) из коллекции ФГБУ НИИ гриппа им А.С.Сморозинцева а также близкородственных вирусов и бактерий. Диагностические показатели оценивали при анализе разных видов биологического материала, предварительно охарактеризованного как содержащий (n= 54) или не содержащий (n= 72) вирус гриппа субтипа Н5.

Основные результаты. Праймеры и зонд для выявления вируса гриппа А субтипа Н5 были выбраны в консервативной области гена гемагглютинина, чтобы исключить ложноотрицательные результаты, для дифференциации генетической клады 2.3.4.4b был выбран второй сет праймеров в области, специфичной только для данной клады. С помощью разработанных праймеров детектируется РНК вируса гриппа А субтипа Н5 различных клад, с дифференциацией клады 2.3.4.4b. Методика представляет собой мультиплексную ОТ-ПЦР систему, детектирующую сигнал накопления флуоресценции

ВКО по каналу для флуорофора FAM, сигнал накопления флуоресценции при амплификации целевой РНК вируса гриппа А субтипа Н5 - по каналу для флуорофора HEX, а также сигнал накопления флуоресценции при амплификации целевой РНК вируса гриппа А субтипа Н5, относящейся к генетической кладе 2.3.4.4b - по каналу для флуорофора ROX. Оптимизация набора реагентов производилась на амплификаторах: Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США), ДТпрайм («ДНК-технология», Россия).

Было показано отсутствие перекрестных реакций с генетическим материалом других вирусов, а также бактерий, а для праймеров специфичных к кладе 2.3.4.4b отсутствие реакции с РНК вирусом гриппа других генотипов. Аналитическая чувствительность была измерена на разных видах биологического материала и составила 1×10^3 ГЭ/мл.

Было проведено тестирование на 54 образцах, предварительно охарактеризованных как содержащие вирус гриппа А субтипа Н5 (в том числе 50 образцов, принадлежащих кладе 2.3.4.4b), а также 72 образцах, предварительно охарактеризованных как не содержащие вирус гриппа А субтипа Н5. С помощью разработанной методики были получены валидные результаты для всех 126 образцов, дискордантных вариантов не было выявлено.

Выводы. Разработана методика для качественного определения РНК вируса гриппа А субтипа Н5 с выявлением по отдельному каналу высокопатогенной генетической клады 2.3.4.4b в биологическом материале птиц методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

РАЗРАБОТКА ТЕСТА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ГЕНОВ МЕТАЛЛО- β -ЛАКТАМАЗ ГРУППЫ VIM И СЕРИНОВЫХ КАРБАПЕНЕМАЗ ГРУППЫ GES-5 У *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

Глущенко Е.Е., Савочкина Ю.А., Данилов Д.И., Шипулин Г.А.

ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, Москва, Россия

Введение. *Pseudomonas aeruginosa* является одним из наиболее распространенных возбудителей нозокомиальных инфекций во всем мире. Одновременно с этим этот микроорганизм относится к наиболее проблемным возбудителям инфекций в силу природной устойчивости к большинству бета-лактамных антибиотиков и нарастающей приобретенной устойчивости к карбапенемам, а также к другим основным группам antimicrobных препаратов, распространения экстремально-резистентных штаммов. Инфекции, вызванные карбапенем-резистентными штаммами *P.aeruginosa* представляют собой важную клиническую проблему, поскольку являются причиной неэффективности эмпирической терапии, приводят к высоким показателям летальности, увеличению сроков и стоимости лечения. Важным механизмом, определяющим устойчивость значительной доли изолятов *P.aeruginosa* к карбапенемам и другим бета-лактамным антибиотикам является продукция приобретенных карбапенемаз - преимущественно металло- β -лактамаз (МБЛ) группы VIM и сериновых карбапенемаз группы GES-5-подобных. В последние годы по данным различных исследований наблюдается рост распространенности карбапенемаз группы GES-5 у изолятов *P.aeruginosa*, выделенных в российских стационарах. В то же время отсутствуют молекулярно-диагностические тесты российского производства, направленные на детекцию генов карбапенемаз группы GES-5. Таким образом, существует

необходимость в разработке быстрых и эффективных молекулярных тестов для одновременного определения у *P.aeruginosa* генов карбапенемаз группы GES-5 и генов МБЛ распространенной группы VIM, что и являлось целью нашей работы.

Материалы и методы. Для разработки теста был выбран метод ПЦР с детекцией в режиме реального времени с использованием флуоресцентно-меченых олигонуклеотидных зондов. Для детекции однонуклеотидной замены, отличающей гены карбапенемаз группы GES-5-подобных от других генов бета-лактамаз группы GES, были выбраны аллель-специфичные флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды с LNA-модифицированными основаниями. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей целевых генов-мишеней, полученных из базы данных NCBI, проводили в программе MEGA (v.11). Наличие неспецифических вторичных структур проверяли с помощью программы PrimerSelect пакета DNASTar, специфичность олигонуклеотидов оценивали с помощью онлайн-сервиса BLASTn.

Разработанный ПЦР-тест на первом этапе был апробирован путем тестирования панели образцов ДНК 62 клинических изолятов *P.aeruginosa*, ранее охарактеризованных методом полногеномного секвенирования (WGS).

Секвенирование ДНК изолятов *P.aeruginosa* проводили на системе Illumina NextSeq 550 с использованием набора NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5 (300 циклов) (Illumina, США). Сборку геномов осуществляли с помощью программы Spades v.3.15.3.

Экстракция ДНК из образцов бактериальных культур для проведения ПЦР проводилась с использованием комплекта реагентов для экстракции экспресс-методом «БК-3-step», из образцов биологического материала – с помощью набора «АмплиТест® Рибо-преп» (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, Москва). Для контроля этапов экстракции ДНК и ПЦР использован внутренний контрольный образец (ВКО), представляющий собой искусственно синтезированную последовательность ДНК, клонированную в ДНК фага лямбда. Концентрации ДНК-мишеней в препаратах ВКО и положительного контрольного образца (ПКО) измеряли методом цифровой капельной ПЦР (ddPCR) с использованием системы QX200 Droplet Digital PCR System (BioRad, США).

Аналитическую чувствительность оценивали на модельных образцах биологического материала с добавлением разведений положительного контрольного образца. Для оценки аналитической специфичности была протестирована панель ДНК штаммов бактерий, включая *P.aeruginosa*, в том числе, *P.aeruginosa*, обладающей геном *blaGES-1*, и 12 других распространенных видов возбудителей нозокомиальных инфекций, без анализируемых генов-мишеней.

Результаты. Разработан тест, включающий проведение одной мультиплексной ПЦР-РВ, позволяющий одновременно детектировать и дифференцировать гены МБЛ группы VIM и гены сериновых карбапенемаз группы GES-5. Тест включает использование экзогенного внутреннего контроля.

Предел обнаружения для обеих групп детектируемых генов-мишеней составил 10^3 копий/мл. Аналитическая специфичность теста подтверждена при анализе панели ДНК штаммов бактерий, не обладающих целевыми генами, включая ДНК *P.aeruginosa*, обладающей геном *blaGES-1*, и ДНК штаммов 12 других распространенных видов возбудителей нозокомиальных инфекций. На первом этапе апробации разработанного ПЦР-теста были получены правильные результаты выявления генов карбапенемаз групп VIM и GES-5 для всех протестированных карбапенем-резистентных изолятов *P.aeruginosa*, несущих гены МБЛ группы VIM (n=14) или гены карбапенемаз группы GES-5 (n=3), и изолятов *P.aeruginosa*, не обладающих целевыми генами (n=45), в соответствии с данными полногеномного секвенирования. Далее с помощью нового ПЦР-теста были получены соответствующие результаты анализа 30 нативных отрицательных образцов биоматериала

(мочи, аспирата из трахеи) и 30 модельных образцов биоматериала с добавлением ПКО в концентрациях от 10^3 до 10^4 копий/мл.

Заключение. Разработанный тест на основе ПЦР в режиме реального времени позволяет эффективно определять и дифференцировать гены металло- β -лактамаз группы VIM и гены сериновых карбапенемаз группы GES-5 у *P.aeruginosa* в образцах биоматериала и бактериальных культур. В перспективе внедрение такого теста в практику позволит в краткие сроки выявлять *P.aeruginosa*, обладающие генами карбапенемаз указанных основных групп, при диагностике нозокомиальных инфекций.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗРАБОТАННОГО ТЕСТА НА ОСНОВЕ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНОВ КАРБАПЕНЕМАЗ ГРУПП NDM, OXA-48 И KPC ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ЕГО В ДИАГНОСТИКЕ НОЗОКОМИАЛЬНОЙ ПНЕВМОНИИ

Данилов Д.И.¹, Глущенко Е.Е.¹, Савочкина Ю.А.¹, Данилова В.С.¹, Стрелкова Д.А.², Рачина С.А.², Кулешов В.Г.³, Шипулин Г.А.¹

¹ ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, Москва, Россия

² ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России, Москва, Россия

³ ГБУЗ «ГКБ им. С.С.Юдина ДЗМ», Москва, Россия

Введение. Нозомиальная пневмония (НП), включая вентилятор-ассоциированную пневмонию, является наиболее частой тяжелой инфекцией в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ). НП, вызванная возбудителями, обладающими резистентностью к карбапенемам, экстремальной резистентностью, характеризуется высокой летальностью, увеличением сроков лечения и пребывания в ОРИТ. Таким возбудителем НП наиболее часто является *Klebsiella pneumoniae* или другие энтеробактерии, обладающие генами карбапенемаз групп NDM, OXA-48-подобных или (и) KPC. Быстрое выявление энтеробактерий, обладающих генами карбапенемаз, а также дифференциация генов карбапенемаз класса металло- β -лактамаз (МБЛ) с помощью молекулярных тестов на основе амплификации ДНК имеет важное диагностическое значение, поскольку эта информация требуется для своевременного выбора эффективной антибиотикотерапии.

В последние годы помимо широко используемого в практике метода ПЦР для разработки диагностических тестов применяются и более новые и быстрые методы изотермической амплификации нуклеиновых кислот, среди которых наиболее часто используется петлевая изотермическая амплификация (Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP). Преимуществами таких методов, являются быстрота получения результатов (время проведения реакции амплификации сокращается до 15-40 минут) и возможность использования более простого оборудования. Однако до настоящего времени в нашей стране еще не было разработано диагностических тестов на основе изотермической амплификации, направленных на выявление возбудителей нозокомиальных инфекций, обладающих генами карбапенемаз или другими приоритетно-значимыми генами

антибиотикорезистентности. Создание таких отечественных диагностических тестов представляет актуальную задачу.

В связи с этим, в Центре постгеномных технологий ФГБУ «ЦСП» нами был разработан тест и набор реагентов «АмплиТест® CP NDM/OXA-48/KPC LAMP» для его выполнения, позволяющий выявлять гены карбапенемаз групп NDM, OXA-48-подобных и KPC у энтеробактерий в биологическом материале, основанный на петлевой изотермической амплификации (LAMP). Набор реагентов «АмплиТест® CP NDM/OXA-48/KPC LAMP» прошел клинические испытания, в ходе которых подтверждены высокие показатели диагностической чувствительности и специфичности (100% по отношению к методу сравнения), и зарегистрирован в качестве медицинского изделия для применения в клинической лабораторной диагностике в РФ (РУ № РЗН 2023/20836).

Цель исследования. Проведение оценки эффективности выявления генов карбапенемаз у микроорганизмов в биоматериале пациентов при диагностике нозокомиальной пневмонии с помощью разработанного диагностического теста на основе петлевой изотермической амплификации (LAMP) в сравнении с применяемыми в диагностике тестами на основе ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

Материалы и методы. Для анализа использовали 98 образцов биоматериала из нижних дыхательных путей, полученных от 79 пациентов ОРИТ с признаками нозокомиальной пневмонии с декабря 2021 по февраль 2022 года. Образцы включали аспират из трахеи (ТА, n=68) бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ, n=5) и мокроту (n=25).

Выделение нуклеиновых кислот проводили с помощью набора «АмплиТест® Рибо-преп» (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, Москва) согласно инструкции, с использованием внутреннего контрольного образца. Для образцов мокроты проводилась предварительная обработка с помощью реагента «Муколизин».

Детекцию генов карбапенемаз групп NDM, OXA-48 и KPC проводили с помощью нового набора реагентов «АмплиТест® CP NDM/OXA-48/KPC LAMP» (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, Москва), основанного на изотермической амплификации с детекцией в режиме реального времени, и методом ПЦР-РВ с помощью наборов реагентов «АмплиСенс® MDR KPC/OXA-48-FL» и «АмплиСенс® MDR MBL-FL» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии, Москва). Детекция ДНК-мишеней в ходе изотермической амплификации при помощи набора «АмплиТест® CP NDM/OXA-48/KPC LAMP» производится с помощью мишень-специфичных флуоресцентно-меченых праймеров.

Результаты. Анализ с помощью разработанного нами набора реагентов «АмплиТест® CP NDM/ OXA-48/ KPC LAMP» позволил выявить гены карбапенемаз одной или нескольких групп у энтеробактерий в 29 (30 %) из 98 образцов биоматериала из дыхательных путей пациентов с признаками нозокомиальной пневмонии. Гены металло-β-лактамаз группы NDM были выявлены в 21 образце, в большинстве случаев в сочетании с генами сериновых карбапенемаз группы OXA-48. Гены сериновых карбапенемаз группы KPC были выявлены в 2 образцах в сочетании с генами групп NDM и OXA-48. Гены сериновых карбапенемаз группы OXA-48 были выявлены в 28 образцах, как в сочетании с другими генами карбапенемаз, так и отдельно. Для 69 образцов были получены отрицательные результаты, т.е. не обнаружены гены карбапенемаз ни одной из анализируемых групп. Результаты представлены в таблице 1. Все полученные результаты выявления генов карбапенемаз анализируемых групп с помощью теста на основе LAMP полностью совпадали с результатами, полученными методом ПЦР-РВ с помощью диагностических наборов реагентов «АмплиСенс® MDR KPC/OXA-48-FL» и «АмплиСенс® MDR MBL-FL».

Таблица 1. Гены карбапенемаз, выявленные у микроорганизмов в исследованных образцах ТА, мокроты и БАЛ с помощью тестов на основе LAMP и ПЦР-РВ

Результат ПЦР-тестов – выявленные группы генов карбапенемаз		Результат LAMP-теста			Число образцов
		Выявленные группы генов карбапенемаз / число образцов			
		NDM	OXA-48-like	KPC	
Положительные	NDM и OXA-48-like	18	18	-	18
	NDM, KPC и OXA-48-like	2	2	2	2
	NDM	1	-	-	1
	OXA-48-like	-	8	-	8
	Итого положительных	21	28	2	29
Отрицательные		77	70	96	69

Дополнительно оценили критерий времени амплификации до получения положительного результата - TTP (time to positivity), сравнивая время пересечения пороговой линии графиком флуоресцентного сигнала при проведении теста на основе LAMP и теста на основе ПЦР. Медиана TTP для детекции генов карбапенемаз группы NDM для LAMP составила 23 минуты, а для ПЦР - 53 минуты. Для генов карбапенемаз группы OXA-48 медиана TTP для LAMP составила 11,5 минут, а для ПЦР - 55 минут.

Заключение. Разработанный нами набор реагентов «АмплиТест® CP NDM/OXA-48/KPC LAMP» на основе метода LAMP позволяет эффективно выявлять гены карбапенемаз целевых групп NDM, OXA-48 и KPC в биологическом материале из нижних дыхательных путей при диагностике нозокомиальной пневмонии.

Внедрение новых методик на основе изотермической амплификации ДНК расширяет возможности молекулярной диагностики инфекций, включая создание тестов, выполняемых в автоматизированном режиме в формате «point-of-care».

РАЗРАБОТКА ТЕСТОВ НА ОСНОВЕ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК *CANDIDA ALBICANS*, *CANDIDA GLABRATA*, *CANDIDA KRUSEI* И *CANDIDA AURIS*

Глуценко Е.Е., Данилов Д.И., Савочкина Ю.А., Данилова В.С., Шипулин Г.А.

ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, Москва, Россия

Введение. Инфекции, вызванные грибами, преимущественно представителями *Candida* spp, представляют значимую часть этиологического спектра нозокомиальных инфекций, особенно у пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ). Инвазивный кандидоз у пациентов ОРИТ по данным различных исследований выявляется с частотой от 1 до 10 %, и характеризуется высокой летальностью. Наиболее высокая

частота кандидемии наблюдается у пациентов отделений абдоминальной хирургии и больных со злокачественными опухолями. Диагностика инвазивных кандидозов с помощью традиционных методов микологического посева является слишком длительной и недостаточно эффективной. Применение быстрых молекулярных методов в дополнение к культуральному исследованию должно позволить значительно ускорить и одновременно повысить эффективность выявления основных возбудителей при диагностике инвазивного кандидоза с целью своевременного назначения антимикотиков.

В конце 2022г. ВОЗ опубликовала первый список приоритетных грибковых патогенов, включающий 19 групп возбудителей грибковых инфекций, которые характеризуются высокой летальностью, распространенностью, устойчивостью к антимикотикам, куда вошли пять основных наиболее распространенных видов возбудителей кандидоза - *C.albicans*, *C.glabrata* (*Nakaseomyces glabrata*), *C.krusei* (*Pichia kudriavzevii*), *C.parapsilosis* и *C.tropicalis*, и получивший распространение в последние годы в различных странах мира патоген *Candida auris*, характеризующийся полирезистентностью к различным группам антимикотиков.

В настоящее время существуют и успешно применяются в практике тесты на основе ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) нескольких российских производителей для выявления и видовой дифференцировки вышеназванных видов возбудителей в различном биологическом материале. Актуальной задачей является разработка новых тестов для выявления ДНК приоритетно значимых видов возбудителей кандидоза на основе новых изотермических методов амплификации, которые позволили бы значительно сократить время проведения анализа, а также упростить его процедуру.

Целью данной работы было разработать тесты для выявления и видовой дифференцировки ДНК *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, и *C.auris* на основе петлевой изотермической амплификации (LAMP) и провести их первичную апробацию.

Материалы и методы. Для разработки нового молекулярного теста был выбран метод петлевой изотермической амплификации (LAMP) с детекцией продуктов амплификации с помощью флуоресцентно-меченого праймера. Дизайн праймеров для генов-мишеней был произведен с использованием ПО PrimerExplorer V5 (Eiken Chemical Co., Ltd.). В качестве ДНК-мишеней для каждого из возбудителей были выбраны регион ITS2 спейсера с примыкающим участком гена 5.8S рРНК.

Для проведения LAMP-реакции была выбрана температура 64°C в течение 50 циклов по 30 секунд. Реакцию LAMP с детекцией в режиме реального времени проводили на амплификаторах CFX96 (BioRad, США) или ДТ-прайм (ДНК-технология, Россия).

Для апробации разработанного теста проводилось тестирование панели штаммов и ранее охарактеризованных клинических изолятов различных видов *Candida*, отрицательных (N=20) и модельных положительных образцов крови (N=35) и гемокультур (N=35). Содержание ДНК *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei* в модельных образцах определяли с помощью набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК грибов рода *Candida*: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* и *C. tropicalis* методом мультиплексной ПЦР «АмплиСенс® Флороценоз / Кандиды-FL» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии, Россия).

Выделение ДНК из образцов биоматериала после предварительной обработки проводили для образцов крови - с использованием комплекта реагентов «АмплиТест® Рибо-преп», для образцов гемокультур - комплекта реагентов для экстракции ДНК экспресс-методом «ДНК-Аллегро» (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России). Для контроля этапов экстракции ДНК и амплификации использовался экзогенный внутренний контроль (ВКО), представляющий собой искусственно синтезированную последовательность ДНК, клонированную в ДНК фага лямбда.

Результаты. Разработаны два диагностических теста на основе метода изотермической амплификации (LAMP), первый из которых позволяет выявлять ДНК *C. albicans*, *C. glabrata* (*N.glabrata*) и *C. krusei* (*Pichia kudriavzevii*), а второй предназначен для выявления ДНК *C. auris*. Первый тест включает проведение двух реакций, в каждой из которых регистрируются две ДНК-мишени. В первой реакции происходит одновременная амплификация и детекция фрагмента ДНК *N.glabrata* и ДНК экзогенного внутреннего контроля (ВКО). Во второй реакции происходит амплификация и детекция ДНК *C.albicans* и *C.krusei*. Второй тест выполняется путем проведения одной реакции для одновременной амплификации и детекции *C.auris* и ДНК ВКО. Для детекции используются мишень-специфичные флуоресцентно-меченые праймеры. Предел обнаружения составил $(1-3) \times 10^3$ копий/мл для каждой из определяемых ДНК-мишеней. Общее время проведения амплификации - около 35 минут.

Получены соответствующие результаты тестирования ДНК штаммов, клинических изолятов *C. albicans*, *N.glabrata*, *P.kudriavzevii* и *C.auris* и содержащих один из этих видов или не содержащих их и других *Candida* spp гемокультур с использованием разработанных LAMP-тестов. Во всех модельных положительных образцах крови (с содержанием ДНК-мишеней в диапазоне от 1000 до 10 000 копий/мл) с помощью новых тестов на основе LAMP были выявлены ДНК соответствующего вида возбудителя (одного из 4 анализируемых видов), для всех отрицательных образцов получены отрицательные результаты.

Заключение. Два разработанных теста на основе изотермической амплификации методом LAMP позволяют выявлять и дифференцировать ДНК 4 видов возбудителей кандидоза - *C. albicans*, *C. glabrata* (*N.glabrata*), *C. krusei* (*Pichia kudriavzevii*) и *C.auris* в образцах крови и гемокультур. В перспективе применение таких тестов в диагностике позволит в самые краткие сроки предоставлять информацию необходимую для своевременного назначения антимикотиков.

РАЗРАБОТКА ТЕСТА НА ОСНОВЕ ПЕТЛЕВОЙ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК МЕТИЦИЛЛИН-РЕЗИСТЕНТНЫХ СТАФИЛОКОККОВ И ДНК *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Глуценко Е.Е., Данилова В.С., Савочкина Ю.А., Данилов Д.И., Шипулин Г.А.
ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, Москва, Россия

Введение. Бактерии рода *Staphylococcus* являются одной из наиболее распространенных групп возбудителей госпитальных инфекций. В списке приоритетно-значимых антибиотикорезистентных бактерий, представленном ВОЗ, метициллин-резистентный *Staphylococcus aureus* (MRSA) входит в группу высокого приоритета. Доля *S. aureus* в структуре бактериальных возбудителей нозокомиальных инфекций в РФ по результатам крупного многоцентрового исследования, проведенного в 2018–2019 гг., составляла 7,7%. Значимой для клинической практики проблемой при стафилококковых инфекциях является широкое распространение метициллин-резистентных штаммов стафилококков, которые являются устойчивыми ко всем бета-лактамам антибиотикам, за исключением анти-MRSA цефемов. Для идентификации *Staphylococcus spp* и определения чувствительности к антибиотикам широко применяются традиционные микробиологические методы, однако они требуют длительного времени для получения результатов анализа. Выявление генетических детерминант метициллин-резистентных стафилококков (гена *mecA*, а также редко встречающегося у клинических изолятов варианта

- гена *mecC*) методом ПЦР или другими методами амплификации ДНК признано эффективным подходом для детекции MRSA. Существуют и успешно применяются в практике тесты на основе ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) нескольких российских производителей. Однако до настоящего времени не было предложено для применения в диагностике отечественных тестов для выявления генетических маркеров MRSA на основе новых изотермических методов амплификации, которые могли бы позволить значительно сократить время проведения анализа, а также упростить его процедуру.

Целью данной работы было разработать тест для выявления ДНК метициллин-резистентных стафилококков и ДНК *S.aureus* на основе петлевой изотермической амплификации (LAMP) и провести его первичную апробацию.

Материалы и методы. Для разработки нового молекулярного теста был выбран метод петлевой изотермической амплификации (LAMP) с детекцией продуктов амплификации с помощью флуоресцентно-меченого праймера. Дизайн праймеров для генов-мишеней *nuc*, *mecA*, и гена 16S rRNA *Staphylococcus* spp. был произведен с использованием ПО PrimerExplorer V5 (Eiken Chemical Co., Ltd.).

Для проведения LAMP-реакции была выбрана температура 64°C в течение 50 циклов по 30 секунд. Реакцию LAMP с детекцией в режиме реального времени проводили на амплификаторах CFX96 (BioRad, США) или ДТ-прайм (ДНК-технология, Россия).

Для апробации разработанного теста проводилось тестирование панели бактериальных штаммов, обладающих и не обладающих целевыми генами, ранее охарактеризованных клинических изолятов различных видов стафилококков, 30 образцов цельной крови и 30 модельных положительных образцов крови и гемокультур. Результаты оценивали в сравнении с результатами тестирования с помощью зарегистрированного в качестве медицинского изделия набора реагентов для выявления ДНК метициллин-чувствительного и метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus*, метициллин-резистентных коагулазонегативных *Staphylococcus* spp. методом ПЦР в режиме реального времени «АмплиСенс® MRSA-скрин-титр-FL» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии, Россия).

Выделение ДНК из образцов биоматериала после предварительной обработки проводили с использованием комплекта реагентов «АмплиТест® Рибо-преп» (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России). Для контроля этапов экстракции ДНК и реакции амплификации был использован экзогенный внутренний контроль (ВКО), представляющий собой искусственно синтезированную последовательность ДНК, заключенную в оболочку фага лямбда. Для контроля этапа LAMP были использованы положительные контрольные образцы (ПКО), представляющие собой фрагменты ДНК-мишени, клонированные в плазмидный вектор. Для определения аналитической чувствительности использовали ПКО, концентрация которых была измерена методом цифровой капельной ПЦР (ddPCR) с использованием системы QX200 Droplet Digital PCR System (BioRad, США).

Результаты. Разработанный тест для выявления ДНК метициллин-резистентных стафилококков и ДНК *S.aureus* на основе метода LAMP включает проведение двух реакций. в каждой из которых регистрируются 2 ДНК-мишени. В первой реакции происходит одновременная амплификация и детекция фрагмента гена-маркера метициллин-резистентных стафилококков *mecA* и ДНК экзогенного внутреннего контроля (ВКО). Во второй реакции происходит амплификация и детекция ДНК-маркера *Staphylococcus aureus* (фрагмента гена *nuc*) и ДНК *Staphylococcus* spp (фрагмента гена 16S рРНК). Для детекции используются мишень-специфичные флуоресцентно-меченые праймеры. Время проведения амплификации составляет около 35 минут.

Предел обнаружения теста составил 10^3 копий/мл для каждой из ДНК-мишеней. Результаты тестирования ДНК клинических изолятов *Staphylococcus aureus*, *S.epidermidis* и *S.hominis*, обладающих геном *mecA* или не имеющих этого гена, с использованием разработанного LAMP-теста полностью совпадали с результатами тестирования с

использованием зарегистрированного для применения в диагностике набора реагентов «АмплиСенс® MRSA-скрин-титр-FL» на основе метода ПЦР-РВ. Получено полное соответствие результатов нового LAMP-теста и вышеназванного ПЦР-набора и при тестировании образцов крови (включая нативные и модельные положительные образцы с содержанием ДНК-мишеней в диапазоне от 500 до 10⁴ копий/мл) и гемокультур, содержащих ДНК *S. aureus* или стафилококков других видов, обладающих геном *tesA* или не имеющих этого гена, а также не содержащих ДНК стафилококков.

Выводы. Разработанный тест на основе петлевой изотермической амплификации LAMP позволяет выявлять ДНК метициллин-резистентных стафилококков и ДНК *Staphylococcus aureus* в образцах биологического материала. Применение метода петлевой изотермической амплификации LAMP для обнаружения названных возбудителей инфекции позволяет сократить полное время анализа до 1 часа, в самые краткие сроки предоставлять информацию важную для своевременного выбора или корректировки антибиотикотерапии.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ST308 С КАРБАПЕНЕМАЗОЙ NDM-1

*Шановалова В.В.*¹, *Чулкова П.С.*², *Агеевец В.А.*², *Авдеева А.А.*², *Нурмуханова В.А.*¹, *Мацвай А.Д.*¹, *Плешков В.Ю.*³, *Попенко Л.Н.*³, *Савочкина Ю.А.*¹, *Шипулин Г.А.*¹, Сидоренко С.В.²

¹ ФГБУ «ЦСП» ФМБА, Москва, Россия

² ФГБУ «ДНКЦИБ» ФМБА, Санкт-Петербург, Россия

³ ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Россия

Введение. *Pseudomonas aeruginosa* — важный внутрибольничный патоген, который может вызывать ряд инфекций, включая инфекции мочевыводящих путей, нижних дыхательных путей, кожи и мягких тканей, генерализованные инфекции, приводящие к сепсису. В последние годы внутрибольничные инфекции, вызванные *P. aeruginosa*, стали еще более значимой проблемой в клинической практике из-за широкого распространением штаммов с приобретенными механизмами устойчивости к основным группам antimicrobных препаратов. У *P. aeruginosa* устойчивость к карбапенемам может быть обусловлена сочетанием наличия β-лактамаз, мутациями в генах поринов, гиперэкспрессией системы эффлюкса *MexAB-OprM* и/или изменениями пенициллин-связывающего белка. Важнейшими β-лактамазами синегнойной палочки являются карбапенемазы группы металло-β-лактамаз (МБЛ), которые гидролизуют все β-лактамы, исключая монобактамы. К наиболее распространенным среди *P. aeruginosa* карбапенемазам относятся ферменты VIM- и IMP-типов. Однако в последние годы в ряде стран были выявлены *P. aeruginosa*, с генами *bla*_{NDM}-типа.

Цель исследования. Провести молекулярно-генетическую характеристику штаммов *P. aeruginosa*, несущих ген *bla*_{NDM-1}, выявленных в многопрофильном стационаре Санкт-Петербурга.

Материалы и методы. В работу включены 9 изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от больных с разными формами внутрибольничных инфекций. Изоляты были получены в декабре 2022 года из стационара города Санкт-Петербурга. Идентификацию культур,

выращенных на агаре Мюллера-Хинтона, проводили с помощью MALDI-TOF масс-спектрометра Microflex LT («Bruker Daltonics», Германия). Оценку МПК антибиотиков проводили методом серийных микроразведений согласно рекомендациям EUCAST. Для детекции генов карбапенемаз использовали ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации. Выделение тотальной бактериальной ДНК проводили с помощью мини-набора Allprep DNA/RNA (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкциями производителя и использовали во всех последующих процедурах. Секвенирование проводили на системе Illumina NextSeq 550 с использованием набора NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5 (150 циклов) (Illumina, США). Сборку геномов осуществляли с помощью программы Spades v.3.15.3 после предварительной оценки качества и очистки ридов программами FastQC и Trimmomatic. Сиквенс типирование проводилось с помощью программы MLST. Аннотацию геномов проводили с помощью программы AMRFinder v.3.11.18. Определение значений средней идентичности нуклеотидов (ANI) осуществляли с помощью программы «FastANI» v.1.34. Филогенетический анализ проведен с помощью программ Snippy v.4.6.0, Gubbins v.3.3.1 и FastTree v.2.1.10.

Результаты. Всего было проанализировано 9 изолятов *P. aeruginosa*, несущих ген *bla*_{NDM-1}. Изоляты проявляли идентичный фенотип, были устойчивы к карбапенемам, цефалоспорином, в том числе ингибитор-защищенным, аминогликозидам, фторхинолонам, хлорамфениколу и ко-тримоксазолу, но оставались чувствительны к колистину. Все изоляты принадлежали к международному клону ST308 и дополнительно к гену *bla*_{NDM-1} обладали генами β-лактамаз *bla*_{OXA-488}, *bla*_{PDC-19a}, *bla*_{PAC-1} и *bla*_{OXA-10}, генами устойчивости к аминогликозидам (*rmtF2*, *aac(6')-Ib*, *aac(6')-II*, *aadA11*, *aph(6)-Id*, *aph(3)-Ib*, *aph(3)-IIb*), сульфаниламидам (*sul1*, *sul2*), триметоприму (*dhfrB5*), хлорамфениколу (*floR*, *catB7*), макролидам (*msrE*), блеомицину (*ble*), фосфомицину (*fosA*) и хинолонам (*crpP* (8/9), *qnrVC1*). Для проведения филогенетического анализа из базы данных NCBI GenBank (01.09.2023) выгружено дополнительно 317 геномов NDM-1-положительных *P. aeruginosa* ST308 из пяти стран: Сингапур (n = 302), США (n = 12), Греция (n = 2) и Ливан (n = 1). Полученная выборка обладала высокими значениями межгеномного нуклеотидного сходства ANI (average nucleotide identity) с минимальным значением 99.74. Филогенетическое дерево NDM-1-положительных геномов *P. aeruginosa* ST308 приведено на Рисунке. Исследуемые образцы из России образовали отдельную ветку с образцами из США, Ливана и Греции.

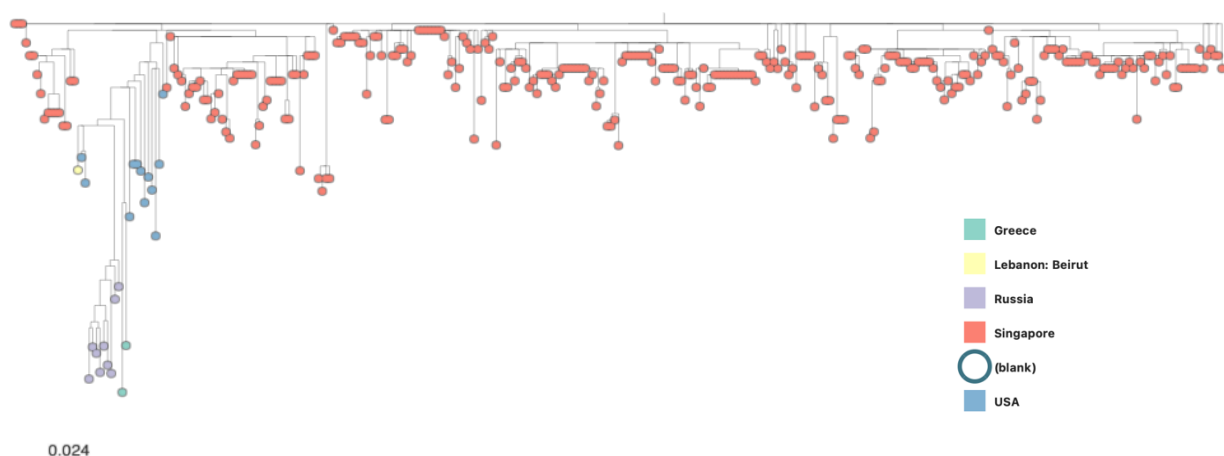


Рисунок. Филогенетическое дерево NDM-1-положительных геномов *P. aeruginosa* ST308.

Заключение. По нашим сведениям, это первое обнаружение *P. aeruginosa* с карбапенемазой NDM-типа в России. Изоляты обладали схожим фенотипом и генотипом резистентности, проявляя устойчивость к различным антибиотикам. На сегодняшний день глобальная популяция NDM-положительных *P. aeruginosa* ST308 характеризуется высокой степенью нуклеотидного сходства, она представлена в основном изолятами из Сингапура, где их первое выделение было зафиксировано в 2013 г. (Prakki, Vasoo, 2023). В пределах этой генетической линии отмечено формирование сублинии, к которой относятся российские NDM-положительные изоляты, анализируемые в данном исследовании, а также изоляты из США, Греции и Ливана. Глобальное распространение указанной сублинии может составить серьезную угрозу системе здравоохранения и позволяет предположить наличие у ее представителей новых свойств, требующих дальнейшего изучения.

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ НА ОСНОВЕ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ КОРИ

Носова А.О., Богословская Е.В., Цыганова Г.М., Шипулин Г.А.

ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, Москва, Россия

Введение. Вирус кори вызывает острое инфекционное заболевание, обладающее высокой контагиозностью. Несмотря на то, что корь относится к заболеваниям, которые возможно контролировать с помощью вакцинации, в последние годы во всем мире регистрируется увеличение числа случаев кори. За первые семь месяцев 2023 года в мире по данным Всемирной организации здравоохранения зарегистрировано 152,5 тыс. случаев кори по сравнению с 59,6 тыс. в 2021 году. Наибольшее число заболевших корью выявлено в Индии, Йемене и Пакистане. В России с начала 2023 года зарегистрировано более 1700 случаев.

В связи с высокой контагиозностью заболевания важна ранняя дифференциальная диагностика кори. Из существующих методов лабораторной диагностики кори наибольшей чувствительностью на раннем этапе заболевания обладают молекулярно-генетические методы, в частности, на основе метода ПЦР. На сегодняшний день в России для выявления РНК вируса кори методом ПЦР доступен единственный набор реагентов «АмплиТест® Корь» (ФГБУ «ЦСП», Россия). В период вспышки кори в 2023 году данный набор хорошо зарекомендовал себя, однако стало понятно, что для максимально быстрого реагирования на вспышку необходимы быстрые тесты. В последние годы активно развиваются технологии, основанные на изотермической амплификации, в частности, реакция петлевой изотермической амплификации (LAMP), с помощью которой результаты можно получить в течение нескольких минут. Разработка таких подходов позволит в будущем проводить исследование быстрее и без применения дорогостоящего оборудования на месте оказания медицинской помощи (у постели больного).

Цель и задачи. Разработка методики для выявления РНК вируса кори методом петлевой изотермической амплификации в режиме реального времени.

Материалы и методы. В качестве мишени для подбора диагностических олигонуклеотидов была выбрана консервативная область гена нуклеопротеина. Выбор праймеров и зондов проводили на основе выравнивания нуклеотидных последовательностей из базы данных NCBI, которое включало 721 представителя.

Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей было проведено с помощью MAFFT. Подбор праймеров проводили с использованием программы Primer Explorer V (Fujitsu, Япония).

В качестве материала для исследования использовали клинический образец мазка из носо- и ротоглотки от пациента с подтвержденным диагнозом кори. Для выделения РНК вируса кори из образцов использовали набор «АмплиТест Рибо-преп» (ФГБУ «ЦСП», Россия).

В качестве набора сравнения использовали набор реагентов «АмплиТест® Корь» (ФГБУ «ЦСП», Россия), который позволяет выявлять вирус кори методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» с аналитической чувствительностью 10^3 коп/мл. В качестве мишени в данном наборе используется фрагмент гена нуклеопротеина.

Основные результаты. Для выявления РНК вируса кори методом LAMP были подобраны 6 праймеров. Детекция результатов основана на использовании праймер-зонда, представляющего из себя петлевой праймер, соединенный с меченой флуоресцентной меткой синтетической последовательностью и комплементарной ей последовательностью, меченой гасителем флуоресценции. Накопление флуоресцентного сигнала происходит при вытеснении Vst-полимеразой последовательности с гасителем.

Разработанная методика позволяет в одну стадию и при постоянной температуре проводить этап обратной транскрипции и амплификации нуклеиновых кислот с помощью 6 праймеров, Vst-полимеразы и обратной транскриптазы. Для сравнения аналитической чувствительности разработанной методики на основе LAMP использовали ПЦР-набор «АмплиТест® Корь» и серию 10-кратных разведений образца с вирусом кори. Амплификацию проводили при 60°C с детекцией сигнала каждые 30 сек., используя прибор CFX. Согласно полученным результатам, чувствительность разработанной методики незначительно уступает методу сравнения (таблица 1), поскольку последнее разведение образца (10^{-7}) находится ниже аналитической чувствительности ПЦР-теста и его выявление носит случайный характер, а предыдущее разведение (10^{-6}) выявлялось обеими методиками. Кроме того, в отличие от метода ПЦР использование LAMP позволило получить результаты менее чем за 10 минут.

ТАБЛИЦА 1. РЕЗУЛЬТАТЫ ТЕСТИРОВАНИЯ ОБРАЗЦОВ ДВУМЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Разведение образца	LAMP	ПЦР
	мин	Ct
Исходный образец	3,62	16,93
10^{-1}	3,96	19,98
10^{-2}	4,51	23,12
10^{-3}	5,23	26,43
10^{-4}	5,97	29,31
10^{-5}	6,63	32,78
10^{-6}	8,39	35,22
10^{-7}	-	38,65

Выводы. Разработана методика быстрого выявления РНК вируса кори с использованием технологии LAMP, позволяющая с высокой эффективностью выявлять РНК вируса кори с чувствительностью, близкой к ПЦР.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ НАБОРОВ ДЛЯ ПРЕДОБРАБОТКИ И ВЫДЕЛЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ДНК ИЗ ФЕКАЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ

Курносков А.С., Глазунова Е.В., Злобовская О.А., Шипулин Г.А.

ФГБУ "ЦСП" ФМБА России, Москва, Россия

Введение. Качество выделения ДНК из образцов оказывают значительное влияние на результаты анализа микробиома. Большинство протоколов существующих наборов для выделения ДНК в РФ используют предварительный этап получения бактериальной суспензии. Этот этап представляет собой предварительное встряхивание образца в физиологическом растворе, центрифугирование и отбор верхней части осадка. Данный процесс трудоёмкий и его результаты существенно зависят от человеческого фактора.

Чаще всего после данного этапа в наборах предусмотрен химический лизис клеток и последующая очистка ДНК различными методами (на колонках, различных сорбентах или с помощью преципитации). Однако, существуют методы дополнительной предобработки образцов: с использованием ферментативной обработки лизоцимом или механического дробления с мелкими частицами, которые увеличивают выход ДНК, особенно из грамположительных бактерий и архей.

Цель и задачи. Целью данного исследования было сравнение 12 коммерчески доступных наборов для выделения ДНК из фекалий, отличающихся наличием или отсутствием стадии предобработки образца и основанных на различных методах сорбции ДНК для её последующей очистки. Мы сравнивали эффективность выделения бактериальной ДНК, проводя качественную и количественную оценку таксономического состава, а также оценивая общий выход ДНК и чистоту препарата от ингибиторов.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. подготовить 46 независимых образцов фекалий для последующего выделения согласно протоколам к используемым наборам (см. таблицу 1);
2. выделить ДНК из фекалий данными наборами;
3. оценить результаты экстракции с использованием ПЦР-РВ для оценки общей бактериальной ДНК, отдельных представителей грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также контрольных образцов (контроли выделения и ингибирования).

Материалы и методы. Используемый биоматериал: 46 образцов фекалий, замороженные при -80°C сразу после сбора, а также положительные и отрицательные контроли выделения.

ПЦР-РВ. Для оценки выделения для ПЦР-РВ были использованы праймеры и флуоресцентные зонды типа TaqMan:

1. на консервативные участки гена 16S рРНК (для оценки общей бактериальной массы);
2. специфичные к фрагменту гена 16S рРНК представителей грамположительных бактерий *Lactobacillaceae*, *Coprococcus* spp., *Streptococcus* sp., *Clostridium leptum*;
3. специфичные к фрагменту гена 16S рРНК грамотрицательных бактерий *Enterobacteriaceae*, *Akkermansia muciniphila*, *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides fragilis*;
4. на внутренний контроль выделения и на контроль ингибирования.

Состав реакции: 5x MIX буфер (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России); деионизованная вода для ПЦР; концентрация олигонуклеотидов в реакции $-0.08-0.4$ мкМ каждого в зависимости от системы. Объем матрицы ДНК на старте – 5 мкл.

Программа ПЦР: 95°C – 15 мин, 45 циклов: (95°C – 15 сек, 60°C – 30 сек). Обработка результатов: MS Excel 2010.

Таблица 1. Информация об используемых наборах

Производитель	Набор	Метод предобработки	Метод выделения	Общий ранг
QIAGEN	QIAamp® PowerFecal® Pro DNA Kit	Механическое дробление в составе набора	Колоночный	2
QIAGEN	QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit	-	Колоночный	5
Fractal Bio	ФБиоНуклео	Бактериальная суспензия	Колоночный	9
АмплиСенс	РИБО-сорб	Бактериальная суспензия	Сорбент	7
АмплиСенс	ДНК-сорб-В	Бактериальная суспензия	Сорбент	9
ЦСП ФМБА	Магно-Сорб-Комбо (ручное выделение)	Набор "ФекаБит-Макс" (мех. дробление)	Магнитный сорбент	2
ЦСП ФМБА	Магно-Сорб-Комбо (выделение на приборе AllSheng Auto-Pure 96)	Набор "ФекаБит-Макс" (мех. дробление)	Магнитный сорбент	3
ЛабПэк	НК-Магно	Бактериальная суспензия	Магнитный сорбент	4
РеалБест	РеалБест экстракция 100	Бактериальная суспензия	Магнитный сорбент	6
НекстБио	МагноПрайм ЮНИ	Бактериальная суспензия	Магнитный сорбент	8
ЦСП ФМБА	РИБО-преп	Набор ФекаБит-Макс (мех. дробление)	Преципитация	1
ДНК-Технология	ПРОБА НК плюс	Набор Проба Л (лизоцим)	Преципитация	4

Основные результаты. Для сравнения результатов были получены выходы в ГЭ/р-ции (геном эквивалента на грамм) по каждой системе, а затем результаты были пересчитаны с учетом объемов биоматериала на старте выделения, этапов протокола и объема элюции в ГЭ/г фекалии с допущением 100% КПД для каждого выделительного набора.

По полученным концентрациям (ГЭ/г) были присвоены «ранги». Ранги отражают место в рейтинге выделительных наборов по средней концентрации образцов для каждой исследуемой системы. Чем большее количество ГЭ выделяет набор, тем выше место в рейтинге по данной системе. Далее по каждому набору ранги для всех специфичных систем были суммированы – и сумме рангов также придан ранг, который отражен выше в табл. 1.

Также мы оценили количество образцов, для которых отсутствует результат амплификации. Чем больше таких образцов, тем выше потери при выделении набором:

Fast DNA Stool Mini Kit < PowerFecal Pro DNA Kit < РИБО-преп < Магно-Сорб-Комбо (автомат) < Магно-Сорб-Комбо (ручное выделение) < ПРОБА НК плюс < РИБО-сорб < РеалБест экстракция 100 < НК-Магно < МагноПрайм ЮНИ < ДНК-сорб-В < ФБиоНуклео.

Заключение/выводы. Наибольшую эффективность выделения ДНК (перерасчет циклов в ГЭ/г) продемонстрировал комплект выделительного набора РИБО-преп в паре с набором для предобработки ФекаБит-Макс производства ФГБУ «ЦСП» ФМБА России.

СОПОСТАВЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА МЕТОДАМИ 16S NGS И КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ПЦР-РВ

Злобовская О.А., Дементьева Е.В., Курносков А.С., Глазунова Е.В., Макаров В.В., Шипулин Г.А.

ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, Москва

Введение

По мере увеличения базы знаний о взаимосвязи между таксономическим составом микробиоты и состоянием здоровья, возникает интерес к точной диагностике отдельных микроорганизмов. Одним из наиболее точных методов оценки содержания ДНК является количественная ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ); однако наиболее широко используемым подходом к изучению разнообразия и состава микроорганизмов в человеческом организме является секвенирование фрагмента гена 16S рРНК. Данный метод позволяет определить относительное присутствие идентифицируемых таксонов. При этом, имея информацию о общей бактериальной массе, можно рассчитать абсолютное содержание таксонов в образце.

Цель и задачи исследования. В связи со множеством этапов, на которых могут возникнуть искажения, и уникальными характеристиками каждого этапа секвенирования гена 16S рРНК, мы провели исследование, чтобы узнать, насколько оценка данным методом сопоставима со стандартным количественным методом – количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Для этого были поставлены следующие задачи:

1. Оценить таксономический состав микробиоты кишечника пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями методом NGS 16S в зависимости от используемого метода выделения
2. Оценить количество ДНК определенных таксономических групп у данных пациентов методом количественной ПЦР-РВ в зависимости от используемого метода выделения
3. Сопоставить полученные результаты.

Материалы и методы. Биоматериал: фекалии пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями (группа «хроническая сердечная недостаточность» и группа «атеросклероз») и пациентов контрольной группы.

Экстракция ДНК из фекалий: наборы QIAamp - Fast DNA Stool Mini Kit и PowerFecal DNA Kit (Qiagen). Набор PowerFecal отличается от FastStool наличием стадии механической гомогенизации образца для увеличения выхода ДНК грамположительных микроорганизмов.

Анализ методом NGS: регионы V3-V4 гена 16S рРНК (MiSeq, Illumina, v3). Для анализа использовали пакет QIIME2 v 2022.2.0. Последовательности, прошедшие контроль качества (по 19 тысяч на образец), классифицировали по базам данных SILVA и RDP.

Анализ ПЦР-РВ проводили для: семейств Christensenellaceae, Enterobacteriaceae, Lactobacillaceae; родов *Bacteroides* sp., *Bifidobacterium* sp., *Odoribacter* sp., *Oscillibacter* sp., *Ruminococcus* sp., *Subdoligranulum* sp.; видов *Enterococcus faecalis*, *Faecalibacterium prausnitzii*, а также определяли общее бактериальное число по амплификации консервативного участка гена 16S рРНК.

Данные NGS были пересчитаны из относительного содержания таксонов в абсолютное по формуле: $\frac{N_{\text{такс}}}{N_{\text{общ}}} * \text{ОБЧ}$, где $N_{\text{такс}}$ – количество прочтений соответствующего таксона в образце; $N_{\text{общ}}$ – общее количество прочтений для образца; ОБЧ – рассчитанное по данным ПЦР-РВ общее бактериальное число для образца. Полученные абсолютные данные

использовали для прямого сопоставления с результатами ПЦР-РВ.

Статистическую оценку проводили на языке Python. Для оценки корреляции пересекающихся таксонов между примененными методиками был использован метод Спирмена. Для определения точности количественной оценки применили модели машинного обучения: линейный дискриминантный (ЛДА) и многокомпонентный (МГК) анализы.

Основные результаты. Относительное содержание некоторых таксонов для метода NGS существенно отличалось в зависимости от используемой базы данных (SILVA или RDP). Ряд таксонов был определен только по одной из двух баз; а для некоторых общих таксонов количество прочтений, которое определялось в одной базе, значительно отличалось от другой. Эта разница повлияла и на способность предсказывать метод выделения: данные, полученные по базе RDP, привели к лучшей эффективности обучения ЛДА, чем данные, полученные по базе SILVA. Значимая корреляция (коэффициент Спирмена более 0.45) между данными NGS и ПЦР-РВ наблюдалась в случае тех таксонов, для которых при этом была и максимальная корреляция между базами NGS (таксоны *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, *Bacteroides* sp., *Bifidobacterium* sp., *Odoribacter* sp.).

При сравнении эффективности обучения моделей на основе данных NGS и ПЦР-РВ, точность предсказания метода выделения с помощью линейного дискриминантного анализа оказалась выше при обучении на данных ПЦР-РВ, чем на данных NGS. При использовании многокомпонентного анализа на основе результатов ПЦР-РВ образцы, выделенные разными методами, удалось различить по обеим главным компонентам; но при оценке методом NGS различия по первой главной компоненте не были обнаружены. Как результат, оба подхода показали повышенную точность предсказания на основе информации, полученной на данных ПЦР-РВ. При этом в случае ПЦР-РВ использовалось лишь 11 таксонов, в то время как при применении NGS было задействовано более 130 таксонов.

Заключение выводы. Снижение точности количественной оценки с использованием метода 16S NGS может быть обусловлено применением универсальных вырожденных праймеров для амплификации всех таксонов, ограниченной длиной региона для таксономической идентификации (например, при использовании регионов V3-V4, рекомендуется идентификация до уровня семейств) и неточностями в базах данных. Однако метод 16S NGS все проводить анализ содержания ДНК методом ПЦР-РВ.

ACMG AUTO CLASSIFIER: ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ДЛЯ АВТОМАТИЧЕСКОЙ КЛАССИФИКАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ НА ОСНОВЕ РУКОВОДСТВА ACMG.

ACMG AUTO CLASSIFIER: SOFTWARE FOR AUTOMATIC CLASSIFICATION OF GENETIC VARIANTS BASED ON THE ACMG GUIDELINES.

Некрасов А.Ю.¹, Гуськова М.С.¹, Лисица Т.С.¹, Хахина А.О.¹, Черняева Е.Н.¹, Шипулин Г.А.¹

E-mail: ANekrasov1@cspfmba.ru

¹ ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства; Россия, 119121 Москва, Погодинская ул., 10, стр. 1;

Введение. Классификация генетических вариантов, выявленных в результате проведения различных методик секвенирования генома человека, с целью установления степени их патогенности, является важным этапом поиска возможных причин множества наследственных заболеваний. Наибольшее распространение, среди руководств по интерпретации генетических вариантов, получило руководство ACMG (American College of Medical Genetics) [1], включающее в себя 28 критериев патогенности, на основе различных комбинаций которых, выявленным генетическим вариантом присваивается класс патогенности. Использование данного руководства улучшает качество и точность интерпретации генетических вариантов. Однако большой объем выявляемых генетических вариантов, при помощи высокопроизводительных современных методов секвенирования нуклеиновых кислот, создает сложности их классификации в “ручном” режиме. Целью данной работы являлось создание автоматического классификатора генетических вариантов на основе руководства ACMG по интерпретации генетических вариантов и широкого спектра доступных машиночитаемых геномных данных. Необходимость создания собственного программного обеспечения для классификации генетических вариантов связана в первую очередь с сохранением конфиденциальности генетических данных пациентов, что невозможно сделать, при использовании стороннего программного обеспечения, располагающегося на удаленных серверах. Помимо этого, использование собственного программного обеспечения в перспективе позволит настраивать алгоритм с учетом данных и рекомендаций конкретной исследуемой нозологии (онкологические заболевания, заболевания сердечно-сосудистой системы и т.д.).

Материалы и методы. В качестве основного языка программирования, при создании алгоритмов классификатора, использовался Python 3.8. Компоненты классификатора включают в себя различное свободно доступное программное обеспечение для обработки файлов, содержащих данные высокопроизводительного секвенирования (SAMtools), аннотации генетических вариантов (Ensembl Variant Effect Predictor), а также хранения информации (PostgreSQL). В качестве источников данных, необходимых для присвоения критериев патогенности в рамках руководства ACMG по интерпретации генетических вариантов, использовались открытые базы данных (ClinVar, gnomAD, Domino, UniProt, ManeSelect, dbNSFP, SpliceAI, dbSNP, phyloP100way).

Алгоритм классификации ACMG [1] изначально основан на булевой логике, но в работе [2] показано, что можно свести алгоритм к балльной системе и именно эта версия реализована в классификаторе. Каждому критерию сопоставляется число от 0 до 8 в зависимости от силы критерия. Итоговый балл является разностью между суммой

патогенных критериев и суммой доброкачественных критериев, затем по этому итоговому баллу варианту присваивается класс патогенности.

Результаты.

Разработан классификатор “ACMG Auto Classifier”, способный присваивать 16 из 28 критериев патогенности в автоматическом режиме (1 критерий, способный присваиваться в автоматическом режиме не был реализован ввиду отсутствия необходимых данных, оставшиеся 11 критериев являются индивидуальными для каждого конкретного клинического случая и могут быть присвоены только в ручном режиме дополнительно) для генетических вариантов 44 генов ассоциированных с наследственными опухолевыми синдромами. На вход программа принимает файл, содержащий данные о выявленных генетических вариантах в расширении vcf, на выходе формируется файл в расширении tsv, имеющий табличную структуру и содержащий информацию об аннотации и классификации каждого выявленного генетического варианта, с подробным описанием каждого из 16 присвоенных критериев патогенности.

Тестирование классификатора проводилось на 10 063 генетических вариантах, выявленных среди 3026 образцов, которым проводилось секвенирование таргетных регионов 44 генов, ассоциированных с наследственными опухолевыми синдромами. Из найденных вариантов 2976 есть в ClinVar, из которых только 1690 имеют необходимый уровень достоверности (рейтинг две звездочки). На основе 1690 вариантов проводилось сравнение результатов автоматической классификации с данными о патогенности из базы ClinVar. Коэффициент корреляции Спирмена для класса патогенности определенного классификатором и известным из ClinVar составил 0.86. Дополнительно был проведен тест без использования базы данных ClinVar, т.е. исключались признаки BP6 и PP5 [1]. Коэффициент корреляции Спирмена составил 0.74.

Результаты автоматической классификации вариантов, отсутствующих в GnomAD и ClinVar, класса Патогенные или Вероятно патогенные проверялись вручную клиническим специалистом. Для 10 вариантов из 11 классификация совпала с фенотипом образца. В 1 варианте из 11 нельзя сделать выводы о правильности работы программы из-за низкого качества секвенирования образца. Так же эти 11 вариантов сравнивались с результатами классификации VarSome и показали совпадение.

Из 10 063 вариантов 272 варианта были классифицированы как Патогенные, 758 как Вероятно патогенные, 3526 как Неопределенного клинического значения, 4110 как Вероятно доброкачественные и 1397 как Доброкачественные.

Выводы. Представленное программное обеспечение позволяет быстро получать сведения о классе патогенности выявленных генетических вариантов в автоматическом режиме, что позволяет приоритезировать генетические варианты для дальнейшего их рассмотрения в качестве причины заболевания, а также уменьшает вероятность неточной классификации, уменьшая влияние человеческого фактора. В дальнейшем планируется калибровка классификатора для повышения точности, а также его настройка для различных синдромов (в т.ч. сердечно-сосудистых заболеваний).

Литература.

1. Richards S. et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology // Genet. Med. Nature Publishing Group, 2015. Vol. 17, № 5. P. 405–423.
2. Tavtigian S.V. et al. Fitting a naturally scaled point system to the ACMG/AMP variant classification guidelines // Hum. Mutat. Wiley Online Library, 2020. Vol. 41, № 10. P. 1734–1737.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВИРУЛЕНТНЫХ ПЛАЗМИД, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ *Klebsiella pneumoniae*

Нурмуқанова В.А.¹, Шаповалова В.В.¹, Мацвай А.Д.¹, Шипулин Г.А.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Введение. С каждым годом *Klebsiella pneumoniae* (*Kpn*) признается все более важным внутрибольничным патогеном, представляющим угрозу в том числе для иммунокомпетентных пациентов. Спектр клинических состояний при инфекции *Kpn* варьирует и может проявляться пневмонией, менингитом, инфекцией кровотока и др. В настоящее время в стационарах циркулируют два патотипа: классический – «с*Kp*» и гипервирулентный – «h*vKp*», последний связан с повышенной патогенностью и летальностью в случае инфекции. Смене фенотипа на гипервирулентный, способствует в том числе приобретение плазмид, несущих гены факторов вирулентности. Однако, только треть генов, кодируемых этими плазмидами, имеют известную функцию. В 2018 году был впервые описан конвергентный фенотип *Kpn*, проявляющий одновременно признаки множественной лекарственной устойчивости и гипервирулентности. Инфекции, вызванные h*vKp*, часто диагностируются на основании клинической картины, поскольку не существует согласованного фенотипического теста на гипервирулентность, но было показано, что маркеры, присутствующие на плазмидах вирулентности, могут быть дополнительным фактором для дифференциации штаммов h*vKp* и с*Kp*.

Цель исследования. Определить распространенность различных генов репликонов плазмид, несущих кластер генов фактора гипервирулентности аэробактина, из комплекса *Klebsiella pneumoniae*, представленных в общедоступных базах данных последовательностей. Определить распространенность других факторов гипервирулентности и генов резистентности на исследуемых плазмидах.

Материалы и методы. Последовательности плазмид с геном аэробактина A были выгружены из баз данных PLSDB v.2021_06_23_v2 и BV-BRC 3.30.5. Была проведена фильтрация хромосомных и неполных плазмидных последовательностей; включены последовательности только из изолятов комплекса *Klebsiella spp*. Репликоны плазмид вирулентности, факторы вирулентности, гены устойчивости к антибиотикам были идентифицированы с помощью Abricate и Kleborate с базами данных PlasmidFinder, Resfinder, при минимальном покрытии 60% и минимальной идентичности 90%.

Результаты. Всего было проанализировано 296 последовательностей плазмид, на которых гены репликонов группы IncFIB были выявлены почти во всех последовательностях (96,3%) в эту группу входили гены: repB_KLEB_VIR (n=192), IncFIB(pNDM-Mar) (n=43), IncFIB(K) (n=4), IncFIB (AP001918) (n=3), IncFIB(pKPHS1) (n=2), IncFIB(K)(pCAV1099-114) (n=2), IncFIB(pQil) (n=2). Другими распространенными репликонами были IncHI1B (72,3%), а также IncFII (11,5%); минорная группа была представлена IncFIA, IncQ1, IncR, IncFIC (от 4% до 0,7%). Большинство плазмид (78,7%) несли два репликона, тогда как комбинация репликонов IncHI1B(pNDM-MAR) и repB_KLEB_VIR была идентифицирована более чем в половине проанализированных плазмид. Более 30 плазмид несли мультирепликон IncHI1B(pNDM-MAR)/IncFIB(pNDM-Mar), наиболее распространенными

типами одиночных репликонов были *repB_KLEB_VIR* и *IncFIB(K)*. Гены синтеза сальмохелина были выявлены только в 37,1% исследуемых образцов. Проведено сравнение наличия этих факторов гипервируленности в зависимости от типов репликонов на плазмиде: 88,9% плазмид с одним репликоном *repB_KLEB_VIR* несли полный *iro*-кластер, тогда как только 1 плазида с мультирепликоном *IncHI1B(pNDM-MAR)/IncFIB(pNDM-Mar)* и 1 плазида с репликоном *IncFIB(K)* несли этот кластер в полном составе генов. Было замечено, что исследуемые плазмиды вирулентности также несли локусы мукоидного фенотипа *tmpADC* (62,2%) и *tmpA2* (82,1%). Носительство гена транспортера *peg-344* составляло не более 40% в плазмидах всех типов репликонов. 88,2% плазмид с мультирепликоном *IncHI1B(pNDM-MAR)/IncFIB(pNDM-Mar)* несли гены устойчивости к антибиотикам, тогда как только 6% плазмид с мультирепликоном *IncHI1B(pNDM-MAR)/repB_KLEB_VIR* были гибридными, то есть несущими сочетание генов гипервирулентности и резистентности.

Заключение. Были исследованы генетические особенности плазмид, несущих факторы гипервирулентности и выделенные из представителей комплекса *Kpn*. Плазмиды несли одиночные и множественные репликоны; варианты репликона *IncFIB* (конъюгативной плазмиды, которая ассоциирована в том числе с распространением вариантов гена *bla*), присутствовали почти в каждой из отобранных плазмид. Плазмиды с репликоном *repB_KLEB_VIR* (как одиночным, так и мультирепликонным), выявленным в большинстве плазмид с репликоном из группы *IncFIB*, чаще других плазмид несли кластер генов сальмохелина (*iroBCDN*) в качестве дополнительного маркера гипервирулентности, locus гипермукоидного фенотипа *tmpADC* и ген регулятора капсульного полисахарида *tmpA2*. Почти треть плазмид вирулентности были гибридными, кодирующими гены устойчивости к антибиотикам.

СИСТЕМА ШИРОКОГО СКРИНИГА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ВИРУСНЫХ ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ (NGS)

Д.А. Григорян¹, И.Ф. Стеценко¹, А.Д. Мацвай¹, Г.А. Шипулин¹

¹ ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Введение. Наиболее распространенной группой вирусных заболеваний во всем мире являются острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ), которые представляют собой основную причину сезонных вспышек заболеваемости. К инфекционным агентам, вызывающим респираторные заболевания, относятся такие вирусы, как респираторно-синцитиальные вирусы, коронавирусы, вирусы гриппа, вирусы парагриппа, аденовирусы, энтеровирусы, парэховирусы, бокавирусы и другие. В последние годы наблюдается рост случаев инфекционных заболеваний неустановленной этиологии и регистрируются вспышки новых инфекционных заболеваний, переходящие в эпидемии и пандемии. Контроль и оценка путей распространения известных патогенов и выявление новых видов патогенных микроорганизмов позволит своевременно реагировать на вновь возникающие угрозы, прогнозировать и выявлять вспышки вирусных заболеваний.

Нами разработан новый подход к созданию мультипраймерных панелей, предназначенных для проведения обширного скрининга вирусных инфекций, вызывающих заболевания человека. Данный подход был использован для разработки системы скрининга группы возбудителей инфекций, вызывающих заболевания органов дыхательной системы.

Цель исследования. Разработка и исследование аналитических характеристик скрининговой тест-системы, основанной на применении мультиплексной панели олигонуклеотидов для обогащения участков геномов вирусных патогенов, вызывающих симптомы респираторных заболеваний, с последующим высокопроизводительным секвенированием.

Материалы и методы. Дизайн первичных структур библиотек олигонуклеотидов для обогащения целевых локусов широкого спектра возбудителей респираторных заболеваний был реализован с применением разработанного нами программного обеспечения, алгоритм работы которого основан на высокоэффективных методах расчета систем праймеров с использованием матричных представлений, реализованных на графических ускорителях, что позволяет работать с базами данных, содержащими большое количество гетерогенных последовательностей. Для исследования аналитических характеристик скрининговой тест-системы применялся контрольный материал, содержащий нуклеиновые кислоты 24 различных видов вирусных патогенов, вызывающих ОРВИ. В ходе таргетной амплификации с применением целевой пары праймеров из панели олигонуклеотидов был получен продукт для каждого вида вирусов с дальнейшей оценкой числа копий целевого ампликона в каждом контрольном образце с применением капиллярного электрофореза на приборе Agilent 2100 Bioanalyzer. После чего, с использованием биологического материала человека (ротоглоточного мазка) была подготовлена серия 10-кратных разведений с копийностью $5 \cdot 10^3$ - $5 \cdot 10^7$ копий/мл. Для всех разведений исследование было проведено с применением тестируемой мультиплексной праймерной панели. Для амплификации на приборе QuantStudio 5 Real-Time PCR Systems (Thermo Fisher Scientific), поддерживающем регистрацию сигнала флуоресценции в режиме реального времени по каналу Green (FAM), была использована термостабильная TaqF-полимераза с «горячим стартом». После очистки амплификатов магнитными частицами Кара PureBeads проводилась пробоподготовка библиотек для высокопроизводительного секвенирования, которая включала в себя фосфорилирование 5'-ОН конца двухцепочечных ДНК-фрагментов с применением фермента полинуклеотидкиназы, лигирование универсальных Y-образных адаптеров и последующее присвоение каждой библиотеке уникальной комбинации индексов посредством ПЦР с праймерами, содержащими последовательность баркода. Далее в ходе высокопроизводительного секвенирования на платформе MiSeq (Illumina) были получены парноконцевые прочтения длиной 250 п.о.

Результаты. Разработанная мультиплексная панель олигонуклеотидов, состоящая из 78 вырожденных структур, позволяет выявить следующие семейства вирусов: *Enterovirus*, *Betapolyomavirus*, *Vocaparvovirus*, *Betacoronavirus*, *Alphacoronavirus*, *Mastadenovirus*, *Metapneumovirus*, *Orthopneumovirus*, *Parechovirus*, *Respirovirus*, *Rubulavirus*, *Morbillivirus*, *Alphainfluenzavirus*, *Betainfluenzavirus*, *Gammmainfluenzavirus*. На основании анализа данных высокопроизводительного секвенирования, обработанных алгоритмом для таксономической идентификации прочтений, была определена аналитическая чувствительность исследования с применением данной библиотеки олигонуклеотидов для 24 видов вирусов, вызывающих острые респираторные инфекции. Для видов *Human polyomavirus 3*, *Human parechovirus A*, *Human orthopneumovirus*, *Influenza A virus*, *Human mastadenovirus B*, *Human coronavirus HKU1*, *Human rhinovirus A*, *Human rubulavirus 2* и *Human rubulavirus 4* аналитическая чувствительность в биологическом образце составляет $5 \cdot 10^4$ копий/мл.

Для видов *Enterovirus A*, *Enterovirus B*, *Enterovirus C*, *Human rhinovirus B*, *Human rhinovirus C*, *Human metapneumovirus*, *Human bocavirus*, *Influenza B virus*, *Human respirovirus 1*, *Human coronavirus NL63* уровень чувствительности детекции тест-системой составляет $5 \cdot 10^5$ копий/мл. Наименьший уровень аналитической чувствительности исследования был определен для *Human mastadenovirus C* – $5 \cdot 10^6$ копий /мл и для *Human coronavirus 229E* – $5 \cdot 10^7$ копий /мл.

Наилучший показатель аналитической чувствительности исследования ($5 \cdot 10^3$ копий/мл) был установлен для одних из самых распространенных возбудителей вирусных респираторных инфекции – *SARS-CoV-2*, *Human respirovirus 3* и *Measles morbillivirus*.

Заключение. Нами разработана скрининговая тест-система, основанная на применении мультиплексной панели олигонуклеотидов для обогащения фрагментов геномов инфекционных агентов, вызывающих острые респираторные заболевания. Праймерная панель состоит из 78 вырожденных структур и обеспечивает расчетное покрытие 99,81% геномных последовательностей референсной базы данных. На основании полученных данных исследования установлена аналитическая чувствительность разработанной скрининговой тест-системы, составляющая $5 \cdot 10^3$ копий/мл – $5 \cdot 10^7$ копий/мл.

РАЗРАБОТКА ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ ДЛЯ ВИДОВОЙ КЛАССИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ НА ОСНОВЕ ДАННЫХ СЕКВЕНИРОВАНИЯ УЧАСТКА ГЕНА 16S rRNA

Б.С. Гуков^{1, 2}, А.Д. Мацвай¹, Г.А. Шипулин¹

¹ ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия

² Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова (МГУ), Москва, Россия

Введение. Задача классификации состава бактериальных сообществ с точностью до вида становится все более актуальной для различных областей, от экологических исследований до клинической медицины. С развитием методов секвенирования, ученые получили мощный инструмент для глубокого изучения микробиома. Эти методы позволяют анализировать миллионы генетических последовательностей, выявляя и классифицируя различные виды бактерий, основываясь на их генетических маркерах, в качестве которых используется последовательность гена 16S rRNA. Современные платформы производят десятки миллионов прочтений, для анализа которых был существует большое количество готовых программных решений, которые, тем не менее обладают рядом ограничений, основными из которых являются невозможность/ограниченность классификации данных частичного секвенирования гена 16S rRNA до уровня вида. Видовая идентификация патогена является первоочередной задачей в клинической диагностике бактериальных инфекций и обуславливает ограниченность применения данных методов в молекулярной диагностике.

Цель и задачи. Основной целью работы стала разработка алгоритма классификации данных частичного секвенирования гена 16S rRNA бактериальных сообществ до уровня

вида и реализация его в виде программного обеспечения. Для возможности применения методов, основанных на локальных выравниваниях без значительных потерь в производительности, требовалась разработка алгоритма, включающего иерархическую кластеризацию прочтений и вычисление репрезентативных консенсусных последовательностей.

Материалы и методы. Для разработки программного обеспечения, в качестве основного языка программирования был использован Python 3.10. Программа использует следующие сторонние свободно распространяемые программы / библиотеки: NumPy, BioNumPy, NGmerge, kmerhash, UMAP, HDBSCAN, abPOA, Blastn.

Для тестирования и отладки программы была использована база данных GreenGenes 13_5 от 2019 года (БД). БД была отфильтрована так, чтобы каждая последовательность имела таксономию до вида. Кроме того, были убраны записи, содержащие sp., genomosp. и genosp. Была проведена фильтрация по длине последовательностей. Каждая последовательность в отфильтрованной БД имеет длину не менее 1250 нуклеотидов. После были убраны последовательности, содержащие хотя бы одну вырожденную позицию. С использованием обработанной БД была произведена симуляция прочтений участка гена 16S rRNA для платформ Illumina (парно-концевое чтение со средним качеством секвенирования $Q = 40$) и платформ Oxford Nanopore (одноконцевое чтение со средним качеством секвенирования $Q = 12$).

Основные результаты. Разработанное программное обеспечение работает в интерфейсе командной строки и реализует полный цикл анализа данных секвенирования, начиная от сырых прочтений, заканчивая выдачей отчета о результатах исследования; осуществляет обработку как одноконцевых, так и парно-концевых прочтений; может быть также использована для анализа данных нанопорового секвенирования.

Программа реализует разработанный алгоритм таксономической классификации, начинающийся с кодирования каждого прочтения в одномерный вектор длины 46 частот 6-меров с последующим расчётом для каждой пары векторов расстояния по метрике Евклида. Полученная матрица подвергается нелинейному снижению размерности. Далее происходит иерархическая пространственная кластеризация на основе плотности проекции матрицы дистанций на двумерную плоскость. Для каждого выделенного кластера строится ациклический граф множественного выравнивания и, с использованием адаптивного динамического программирования, происходит построение консенсуса. Таким образом каждый консенсус становится репрезентативной последовательностью соответствующего кластера, который используется для классификации. По результатам классификации рассчитывается значение «уверенности» результата, как отношение количества присваиваний данного консенсуса к конкретной таксономической группе к полному количеству находок для данного консенсуса. Еще одной отличительной особенностью разработанной программы является последующее аннотирование выявленных таксономических групп и автоматическое присвоение статуса патогенности для клинически значимых видов бактерий.

Тестирование разработанного программного обеспечения на симуляционном датасете включало 500 различных видов бактерий, относящихся к 276 родам, 136 семействам. Для данных, симулирующих парно-концевые прочтения участка гена 16S rRNA на платформе Illumina, была получена верная классификация до уровня вида для 97.2% записей. Процент прочтений, неверно классифицированных на уровне порядка составил 0,95%, 0,22% прочтений были неверно классифицированы на уровне семейства и 1,57% на уровне вида. Для симуляционных данных нанопорового секвенирования верная классификация до уровня вида была получена для 99.6% записей. Все неверно классифицированные прочтения относились к роду *Sphingomonas*.

Заключение. Применение комплексного подхода к решению задачи видовой классификации бактерий по результатам секвенирования 16S рРНК позволяет не только идентифицировать известные виды бактерий, но и открывает возможности для выявления новых, ранее неизвестных организмов.

В будущем предполагается дальнейшее совершенствование программы, учет новых методологических подходов, адаптация под узкоспециализированные задачи исследований, а также разработка пользовательского графического интерфейса для удобного использования программы.

РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОГО / КОЛИЧЕСТВЕННОГО ПРИБОРНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МАРКЕРА СЕПСИСА ПРОКАЛЬЦИТОНИНА В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ МЕТОДОМ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА «АМПЛИТЕСТ® SEPSIS-ИХА»

Шипулин Г.А., Тарасова Ж.Е., Костенко С.Н., Свиридова М.А.

Центр постгеномных технологий ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, Москва, Россия

Прокальцитонин- белок, вырабатываемый клетками щитовидной железы, маркер бактериальных инфекций и сепсиса, его концентрация в крови коррелирует с тяжестью инфекционного процесса. При системном воспалении количество данного вещества в крови резко увеличивается в течение 6-12 ч. Определение уровня прокальцитонина позволяет диагностировать сепсис, оценивать тяжесть бактериального поражения и гнойно-воспалительных реакций в организме, а также определить эффективность антибиотикотерапии. Уровень прокальцитонина может служить показателем этиологии инфекции и руководством для принятия решения о назначении антибактериальных препаратов.

В 2019 году *Всемирная организация здравоохранения* опубликовала документ, признающий прокальцитонин единственным маркером, рекомендованным в качестве вспомогательного теста для решения вопроса о необходимости назначения антибактериальной терапии.

Период полувыведения прокальцитонина составляет 25-35 часов, что позволяет быстро отследить снижение его концентрации при улучшении состояния пациента. Именно поэтому тест на прокальцитонин может быть использован для мониторинга течения заболевания и эффективности проводимой антибактериальной терапии.

Концентрация прокальцитонина в сыворотке/плазме крови здоровых людей менее 0,1 нг/мл. Уровень от 0,1 нг/мл до 0,5 нг/мл - локальный инфекционный процесс. 0,5 нг/мл - 2 нг/мл свидетельствуют о том, что возможна системная бактериальная инфекция. Уровень прокальцитонина выше 2 нг/мл до 10 нг/мл - системная воспалительная реакция, сепсис. Значения выше 10 нг/мл указывают на развитие тяжелого сепсиса и/или септического шока. В данном случае очень важно следить за концентрацией прокальцитонина с целью мониторинга динамики течения воспалительного процесса.

Цель работы: создание и апробация высокочувствительного набора реагентов для быстрого полуколичественного / количественного приборного определения маркера сепсиса прокальцитонина в сыворотке и плазме крови методом иммунохроматографического анализа (ИХА).

В основе разработанного набора реагентов лежит принцип тонкослойной хроматографии и специфической связи антигена с антителом в комплексе с цветным маркером. Интенсивность окрашивания аналитических зон прямо пропорциональна концентрации прокальцитонина в образце. Регистрация сигнала производится визуально или с помощью видеоцифрового диагностического анализатора.

В ходе исследования в качестве окрашенного маркера для тест-системы выбраны латексные наночастицы диаметром 300 нм. Разработаны и оптимизированы условия синтеза конъюгатов латексных частиц с моноклональными антителами, специфическими к прокальцитонину. Подобран состав мультимембранного композита, условия и буферный состав для эффективной сорбции реагентов тест-системы. Экспериментально проверена чувствительность, специфичность, воспроизводимость и стабильность работы набора реагентов. Проведена калибровка видеоцифрового анализатора для компьютерной визуализации, анализа и документирования результатов определения концентрации маркера сепсиса – прокальцитонина.

С помощью тест-кассет набора проводится определения прокальцитонина в сыворотке и плазме крови методом ИХА двумя способами:

- полуколичественный – с использованием карты пациента со сравнительной шкалой;
- количественный приборный – с использованием видеоцифрового анализатора. Прибор позволяет в течении 1 минуты измерить коэффициенты отражения аналитической и контрольной зон теста, и в зависимости от интенсивности окрашивания, определить концентрацию прокальцитонина в пробе.

Заключение. В результате исследований разработан и апробирован высокочувствительный набор реагентов для быстрого полуколичественного / количественного приборного определения маркера сепсиса прокальцитонина в сыворотке и плазме крови методом ИХА. Аналитическая чувствительность набора 0,1 нг/мл, время анализа 15 минут. Первый отечественный приборный (количественный) иммунохроматографический тест на прокальцитонин имеет большой потенциал для практического использования в сфере лабораторной диагностики.

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ МЕТОДОМ РНК-СЕКВЕНИРОВАНИЯ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Морозов К.В.¹, Шматов Ф.М.², Шипулин Г.А.¹, Черняева Е.Н.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Туберкулез (ТБ) - инфекционное заболевание, распространенное во всех странах мира, которое является важной проблемой современной системы здравоохранения, оказывающей значимое социальное и экономическое влияние. ТБ - одна из десяти основных причин смерти и основной причиной смерти, обусловленной каким-либо одним возбудителем инфекции (опережая ВИЧ/СПИД). Возбудителем туберкулеза является *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ), которая входит в состав комплекса *Mycobacterium tuberculosis complex* и чаще всего поражает легкие. Серьезной проблемой является широкое распространение МБТ с множественной и широкой лекарственной устойчивостью, что значительно снижает успешность терапии. Инфекция МБТ может иметь различные клинические проявления от латентного бессимптомного носительства до активного легочного или внелегочного проявления заболевания с различным рядом симптомов. ТБ, как и многие другие инфекции, относится к многофакторным заболеваниям. В его распространении и развитии большую роль играют социальные факторы, генетические особенности возбудителя, влияющие на патогенность, чувствительность к противотуберкулезным препаратам, а также особенности иммунной системы хозяина, которые могут быть обусловлены генетическими и эпигенетическими факторами.

Целью данной работы являлся поиск и анализ молекулярных биомаркеров наличия ТБ, а также оценки степени прогрессии заболевания и его типа (латентный или активный ТБ). Решение данной задачи позволит разработать надежную и эффективную систему для мониторинга ТБ статуса населения страны и быстро реагировать в случае необходимости. Для достижения поставленной цели, необходимо было предварительно решить ряд задач, а именно: анализ соответствующей литературы по тематике работы, выбор метода анализа и дизайна исследования, сбор данных из открытых источников для сравнительного анализа, а также последующий анализ данных и создание аналитической системы.

В качестве объекта исследования были выбраны образцы РНК-секвенирования клеток периферической крови человека (с предварительной деплецией генов глобина). При сборе образцов, была использована открытая база данных образцов секвенирования РНК GEO [1]. Среди всех датасетов были отобраны 5, представляющих когорту взрослых (от 20 до 75 лет) мужчин и женщин европеоидной расы, разделенных на 2 группы - здоровые доноры и больные туберкулезом, которые в части датасетов также делились на две подгруппы - те, у кого была диагностирована латентная и активная форма ТБ. Количество доноров в одном датасете варьировалось от 43 до 434 человек. Суммарно было отобрано 937 образцов доноров, из которых 624 были здоровы (не было выявлено признаков инфекционных заболеваний), а у 313 была диагностирована ТБ инфекция.

В результате проведенного исследования, был обнаружен 91 ген, связанный с различными процессами, происходящими в клетке (в частности миграция иммунных клеток из кровотока, а также маркеры активации Т клеток), вошедший в топ 100 изменивших экспрессию генов одновременно в как минимум 2 независимых датасетах (43 гена повысивших свою экспрессию в образцах больных ТБ и 48 понизивших). Из них 9 генов попали в топ 100 изменивших экспрессию генов одновременно в как минимум 3 и более независимых датасетах, что показывает их потенциальную важность при туберкулезной инфекции, что делает их сильными претендентами в качестве молекулярных биомаркеров для диагностики туберкулеза. В частности, были обнаружены изменения в экспрессии цитокинов и связанных с ними белков, активирующих и мобилизирующих иммунную систему (IL2, IL27, IFI27, IFI6, IFI44 и др); белков связанных с активацией В- и Т-лимфоцитов и рецепторов киллерных клеток (NK-клеток) (CD274, CD69, KLRC2); а также поверхностных белков, связанных с антигенпрезентирующими клетками и процессом распознавания инородных патогенов, в частности ТБ (HLA-A, HLA-B, HLA-DQA, HLA-DOA).

В результате работы можно заключить, что имеется большое число генов, связанных с наличием и развитием туберкулезной инфекции, изменения которых воспроизводятся между независимыми датасетами, и которые можно использовать в качестве эффективных биомаркеров для диагностики туберкулеза.

Список литературы:

1. База данных образцов секвенирования РНК GEO.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi>

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ НОВОГО НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДНК *Mycobacterium tuberculosis complex* МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Зайцева А.И., Микулович Ю.Л., Шипулин Г.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России), Москва, Россия

Введение. Быстрая и точная диагностика туберкулеза (ТБ), осуществляемая благодаря использованию молекулярно-генетических методов (МГМ) исследования, является одним из основных направлений в работе по элиминации ТБ. МГМ позволяют выявлять ДНК возбудителя ТБ – *Mycobacterium tuberculosis complex* (МБТ) – и получать результаты в течение 1 рабочего дня после сдачи биологического материала в лабораторию, в то время как результаты исследования культуральными методами получают не ранее чем через 30 дней. Разработанный в ФГБУ «ЦСП» ФМБА России и зарегистрированный набор реагентов (НР) «АмплиТест® МБТ» (РУ № РЗН 2023/20838) относится к МГМ и предназначен для качественного и количественного определения ДНК *M. tuberculosis complex* в образцах биологического материала человека (мокроты, бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ), биоптата (операционного материала), мочи) и бактериальных культурах методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Для качественного определения ДНК МБТ используются 2 многокопийные мишени IS6110 и IS1081, которые позволяют повысить чувствительность НР, а также определять ДНК МБТ в образцах с нулевой копийностью IS6110. Количество ДНК МБТ определяется по однокопийному гену *mpb64*. Набор реагентов выпускается в 3 формах комплектации: формы 1 и 2 включают комплект реагентов для выделения ДНК вручную, форма 3 – комплект реагентов для автоматического выделения ДНК. Формы 2 и 3 включают ПЦР-комплект, содержащий готовую лиофилизированную реакционную смесь в стрипованных пробирках, что обуславливает удобство хранения НР (в холодильной камере, а не морозильнике) и его использования, экономию времени пробоподготовки и расходных материалов.

Цель и задачи. Цель работы – оценить эффективность нового НР «АмплиТест® МБТ» для обнаружения и количественного определения ДНК *M. tuberculosis complex* относительно зарегистрированного в РФ набора сравнения, аналогичного по назначению, в рамках проведенных дорегистрационных клинических испытаний. Для достижения цели

были поставлены следующие задачи: 1) анализ одних и те же образцов с использованием испытуемого набора «АмплиТест® МБТ» и набора сравнения, 2) сравнение результатов, 3) вычисление показателей эффективности испытуемого НР относительно набора сравнения, в том числе линейной корреляции количественных результатов, полученных двумя наборами.

Материалы и методы. В ходе проведенных в государственном бюджетном учреждении здравоохранения Московской области «Московский областной клинический противотуберкулезный диспансер» (ГБУЗ МО «МОКПТД») клинических испытаний было исследовано 475 образцов биологического материала человека (мокроты (N=115), БАЛ (N=109), биоптата (операционного материала) (N=145), мочи (N=106)) и 100 образцов бактериальных культур. Все образцы, кроме бактериальных культур, были предварительно обработаны с помощью NALC-NaOH. В качестве набора сравнения использовали «Амплитуб-РВ» (ООО «Синтол», Россия, РУ № ФСР 2010/07635). ПЦР-РВ проводили с использованием амплификаторов: Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия), CFX96 (Bio-Rad, США), ДТпрайм (ДНК-Технология, РФ), QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США) – вручную и с помощью специального ПО для автоматического учета результатов.

В работе оценивали следующие характеристики эффективности НР (с доверительной вероятностью 95%): **положительное соответствие результатов (ПСР)** – доля образцов, в которых с помощью испытуемого НР обнаружена ДНК МБТ, среди образцов с ДНК МБТ, выявленной с помощью набора сравнения; **отрицательное соответствие результатов (ОСР)** – доля образцов, в которых с помощью испытуемого НР не обнаружена ДНК МБТ, среди образцов, в которых ДНК МБТ не выявлена с помощью набора сравнения. Данные показатели были рассчитаны отдельно для каждого вида биологического материала. Доверительные интервалы (ДИ 95%) рассчитывали по методу Клоппера и Пирсона [1]. Также была определена линейная корреляция количественных результатов, полученных испытуемым набором и набором сравнения.

Основные результаты. Из 115 образцов мокроты в 58 образцах была обнаружена ДНК МБТ при использовании как испытуемого НР, так и набора сравнения. В 57 образцах ДНК МБТ не выявлена ни одним из наборов реагентов. Следовательно, ПСР для образцов мокроты составило 100 % (ДИ 95%: 93,84–100%), ОСР – 100 % (ДИ 95%: 93,73-100%).

Среди 109 образцов БАЛ 60 образцов были положительными в отношении ДНК МБТ по результатам применения как испытуемого НР, так и набора сравнения. 49 образцов были отрицательными в отношении ДНК МБТ согласно результатам использования обоих наборов реагентов. Таким образом, ПСР для образцов БАЛ составило 100 % (ДИ 95%: 94,04–100%), ОСР – 100 % (ДИ 95%: 92,75-100%).

При анализе 145 образцов биоптата (операционного материала) ДНК МБТ обнаружена в 97 образцах и испытуемым набором, и набором сравнения. В 48 образцах ДНК МБТ не выявлена ни одним из наборов реагентов. Следовательно, ПСР для образцов биоптата составило 100 % (ДИ 95%: 96,27–100%), ОСР – 100 % (ДИ 95%: 92,60-100%).

Из 106 образцов мочи ДНК МБТ была обнаружена в 51 образце как испытуемым набором, так и набором сравнения. В 55 образцах ДНК МБТ не выявлена никаким набором реагентов. Таким образом, ПСР для образцов мочи составило 100 % (ДИ 95%: 93,02–100%), ОСР – 100 % (ДИ 95%: 93,51-100%).

Среди 100 образцов бактериальных культур в 50 образцах была обнаружена ДНК МБТ и в 50 образцах ДНК МБТ не была выявлена при использовании и испытуемого набора, и набора сравнения. ПСР для образцов бактериальных культур составило 100 % (ДИ 95%: 92,89–100%), ОСР – 100 % (ДИ 95%: 92,89-100%).

Дискордантных результатов не выявлено.

На основании количественных результатов ДНК МБТ, полученных с помощью испытуемого набора и набора сравнения, были построены графики корреляции

концентраций, выраженных в десятичном логарифме, и определен коэффициент корреляции R^2 . Величина R^2 составила выше 0,90 при тестировании каждого из указанных выше видов материала с помощью всех форм комплектации НР, что свидетельствует о линейной корреляции между количественными результатами, полученными разными методами.

Выводы. По итогам проведенных клинических испытаний НР «АмплиТест® МБТ» показана его высокая эффективность в отношении качественного и количественного определения ДНК МБТ: ПСР и ОСР при анализе каждого из указанных видов биологического материала составило 100%, коэффициенты корреляции количественных результатов, полученных двумя разными методами, составили выше 0,9. Количественный формат определения ДНК МБТ может быть использован для оценки эффективности проводимой противотуберкулезной терапии и для отбора проб ДНК МБТ, пригодных для анализа с помощью НР «АмплиТест® МБТ-Резист-1» и «АмплиТест® МБТ-Резист-1 Луо» производства ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, предназначенных для выявления мутаций, связанных с устойчивостью МБТ к рифампицину и изониазиду.

Работа выполнена в рамках проекта «Разработка панели диагностических тестов на основе методов амплификации нуклеиновых кислот для быстрого выявления ДНК микобактерий туберкулеза, обладающих множественной и широкой лекарственной устойчивостью» по Соглашению № 020-15-2021-004 от 07.10.2021 с Минпромторгом России о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета бюджетным учреждениям на реализацию проектов по разработке лекарственных препаратов и медицинских изделий согласно постановлению Правительства Российской Федерации от 21.12.2020 № 2187.

Литература

4. Clopper C., Pearson E. The use of confidence or fiducial limits illustrated in the case of the binomial // *Biometrika*. – 1934. – V. 26, № 4. – P. 404-413.