

информации GeneBank. Был определен участок, высоко специфический для *T. pallidum* и, в пределах данного участка выбраны последовательности для праймеров и гибридизационного зонда. Выбранная область нуклеотидной последовательности 16S рРНК *T. pallidum* комплементарная зонду содержит не менее 8 отличий от гомологичных последовательностей других ближайших представителей вида *T. pallidum*, что обеспечивает высокую аналитическую специфичность разрабатываемой методики. Последовательность прямого праймера была идентична последовательности мишени, а последовательность обратного праймера, кроме последовательности комплементарной мишени, на 5' конце содержала последовательность промотора полимеразы T7 РНК.

Предел обнаружения разработанной методики был исследован на рекомбинантном препарате фага лямбда gt10 с клонированной последовательностью ДНК *T. pallidum* и последовательностью промотора полимеразы T7 РНК. При добавлении такого препарата в реакцию НАСБА, T7 РНК-полимераза взаимодействует с последовательностью промотора и запускает процесс образования молекул РНК. Из исходного препарата была приготовлена серия последовательных разведений. Установленный предел обнаружения составил 20 копий 16S рРНК *T. pallidum* в реакцию, или 4×10^3 копий в мл, что с учетом содержания рРНК в клетке *T. pallidum*, обеспечивает выявление единичных микроорганизмов в исследуемом образце. Указанный предел обнаружения разработанной методики значительно превышает установленный ранее предел обнаружения для ТПМ – 10^5 клеток в мл и обеспечивает более высокую диагностическую чувствительность.

А.С. Горохова, К.А. Ляднова, Е.Н. Жиренкина, Е. В. Степанова, В.П. Сергеев, Е.Н. Понировский, Е.Н. Морозов. **Проблемы пробоподготовки в ПЦР-диагностике паразитарных заболеваний.** ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва

Выявление и определение возбудителей с помощью молекулярно-генетических методов, в первую очередь ПЦР, имеют важное значение в лабораторной практике благодаря главному преимуществу – высокой чувствительности. Выделение ДНК из материала является важным этапом в ПЦР-диагностике, особенно в случаях низкой паразитемии. В клинической лабораторной практике при взятии пробы для исследования количество паразитов не известно.

Нами было проведено сравнительное изучение наборов для выделения ДНК разных производителей. Для этого были приготовлены разведения в 100 мкл среды 1000, 100, 10 и 1 промастигот *Leishmania donovani* референсного штамма МНОМ/IN/80/DD8, концентрацию подтверждали микроскопией. Сравнение результатов проводили по ранее отработанной методике амплификации, позволяющей обнаружить 1–2 возбудителя в образце. Выделение ДНК проводили наборами согласно протоколу производителя: «ДНК-Экстран-1», «ДНК-Экстран-2» (компания «Синтол»), «ПРОБА-ГС» и «ПРОБА-РАПИД» (ООО «ДНК-Технология»). Наиболее чувствительным (обнаружение 1 промастиготы в образце) оказался «ДНК-Экстран-2», недостатком которого является длительный процесс выделения (более 1 рабочего дня). При концентрации 1000 промастигот все образцы показали положительный результат.

В рутинной лабораторной диагностике большое значение играет экономия времени, которая может привести к появлению ложноположительных результатов, особенно при низкой паразитемии в клиническом материале. Поэтому большое значение приобретают высококвалифицированные специалисты лабораторной службы, которые могут оптимизировать при возникновении подобных задач все этапы исследований, и врачи практического здравоохранения, способные правильно интерпретировать результаты. Унификация молекулярно-

генетических методов диагностики паразитарных болезней ближайшее время не удастся достичь, поэтому ВОЗ рекомендует для данных исследований референсные лаборатории.

Д.А. Грядунов, А.Т. Лейнсоо, Б.Л. Шаскольский, Е.В. Кулагина, О.В. Антонова, Е.И. Дементьева, Д.В. Зименков. **Гидрогелевые биочипы для молекулярно-генетического профилирования маркеров лекарственной устойчивости возбудителей инфекционных заболеваний.** Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН (ИМБ РАН), Москва

В 2014 г. ВОЗ опубликован глобальный доклад об эпидемиологическом обследовании «Устойчивость к противомикробным препаратам», в котором отмечается опасность роста антибиотикорезистентности для целого ряда возбудителей инфекций. Среди них присутствуют чрезвычайно актуальные для Российской Федерации возбудители туберкулеза и гонореи. Важной задачей современной лабораторной диагностики является создание методов быстрой и эффективной идентификации лекарственно-устойчивых форм инфекционных агентов. В силу чрезвычайной разнообразия механизмов устойчивости патогенов разрабатываемые методики должны охватывать максимально возможный спектр молекулярных параметров, ассоциированных с резистентностью. Одной из технологий, успешно зарекомендовавших себя для многопараметрического анализа возбудителей инфекционных заболеваний, является платформа гидрогелевых биочипов ИМБ РАН. Разработаны, запатентованы и внедрены в практику учреждений противотуберкулезной службы РФ биочипы для одновременной идентификации более 120 генетических детерминант множественной и широкой лекарственной устойчивости возбудителя туберкулеза. Созданы биочипы для идентификации и анализа генетических маркеров резистентности возбудителей инфекций органов репродукции, включая как облигатные патогены (*Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum*, *Mycoplasma genitalium*), передающиеся половым путем, так и ряд возбудителей оппортунистических инфекций. Идентификация микроорганизма на биочипе с одновременным его генотипированием и анализом маркеров лекарственной устойчивости обеспечивает персонализированный выбор эффективных антимикробных препаратов. Работа выполнена при поддержке Программы ФНИ государственных академий на 2013–2020 годы (№ подтемы 0103-2014-003).

Н.В. Дмитриева, И.Н. Петухова, Н.С. Багирова, З.В. Григорьевская, С.А. Дьякова, И.В. Терещенко, Е.Н. Соколова. **Распространенность нозокомальных микроорганизмов в онкологической клинике.** Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина Минздрава РФ, Москва

Цель: выявление распространенности мультирезистентных штаммов грамотрицательных микроорганизмов в онкологической клинике.

Идентификация микроорганизмов и определение чувствительности к антибиотикам проводились с использованием автоматических микробиологических систем MS Maldi Tof, Vitek-2, MicroScan WalkAway. Было проанализировано 8326 микроорганизмов из которых 5003 были представлены грамотрицательными палочками. Бактерии были изолированы из из патологических материалов от онкологических больных (без повторных выделений) за последние 5 лет. Патологические материалы были представлены в 86% случаев отделяемым из ран (РИ) или дренажей (ОД) при поверхностных, глубоких и органнопространственных инфекциях, из крови при бактериемии и сепсисе (КР), из мочи при инфекциях мочевых путей (МИ) и из мокроты или бронхоальвеолярный лаваж или забор стерильными щетками при бронхоскопии при инфекциях нижних дыхательных путей (ИД).

Наиболее частыми возбудителями инфекций были: *Acine-*

tobacter baumannii, синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*), *Klebsiella pneumoniae*, Кишечная палочка (*Escherichia coli*). *A. baumannii* среди прочих грамотрицательных микроорганизмов была выявлена при ИД в 34,3% случаев, ОД – 27,0% ОР – 9,4%, МИ – 12,7%, КР – 4,9%, прочие 11,6%. *P. aeruginosa* составила при ИД – 30,8%, ОД – 24,0%, ОР – 8,7%, МИ – 17,3%, КР – 5,2%, прочие – 13,9%. *K. pneumoniae* составила при ИД – 31,7%, ОД – 24,9%, ОР – 8,6%, МИ – 21,7%, КР – 5,8%, прочие – 7,3%. *E. coli* составила при ИД – 9,9%, ОД – 22,1%, ОР – 6,8%, МИ – 48,3%, КР – 4,2%, прочие – 8,8%. Количество карбапенем-резистентных штаммов встречалось для имипенема и меропенема соответственно среди *P. aeruginosa* в 29 и 59%, среди *K. pneumoniae* 29 и 85%, в отношении *A. baumannii* – 100 и 86%. Среди *E. coli* карбапенем-резистентные штаммы не встречались, однако количество продуцентов бета-лактамаз расширенного спектра составила 44%.

Таким образом, нозокомиальные инфекции были вызваны в основном грамотрицательными микроорганизмами *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*. Высокое количество карбапенем-резистентных штаммов (29–100%) диктует необходимость ограничения использования этих антибиотиков в современной клинике.

М.Ю. Дмитриюкова¹, Т.Н. Романюк¹, Л.И. Короленкова², О.Ю. Шипулина¹. **Частота выявления интегрированных форм ВПЧ ВКР при тяжелой дисплазии и микроинвазивном раке шейки матки.** ¹ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва; ²Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Этиологической причиной развития тяжелой дисплазии и РШМ является вирус папилломы человека ВПЧ высокого онкогенного риска. ВПЧ – ДНК-содержащий эпителиотропный вирус. В инфицированных клетках вирус может персистировать в эписомальной либо интегрированной форме. При интеграции обычно повреждается ген E1 или E2, продукты которого являются транскрипционными факторами, регулирующими синтез онкогенов E6 и E7. Таким образом, интеграция ДНК ВПЧ в геном клетки – важный фактор развития злокачественного процесса.

Цель работы: изучить распространение генотипов и частоту интеграции ВПЧ у лиц с подтвержденным гистологическим диагнозом тяжелая дисплазия шейки матки.

Было исследовано 94 образца соскоба эпителия цервикального канала, взятых у женщин с подтвержденным диагнозом тяжелая дисплазия ШМ и микроинвазивный РШМ. Возраст пациентов составил 20–78 лет, медиана – 33 года. Забор проводился с 2012 по 2015 год. Определение концентрации ВПЧ ВКР и генотипирование проводилось с использованием наборов реагентов «АмплиСенс® ВПЧ ВКР скринитр-FL» и «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-FL». Наличие интегрированной формы определялось путем одновременной специфической амплификации E2 и E7 участков генома ВПЧ.

Было отобрано 94 образца с подтвержденным диагнозом HSIL. Распространенность ВПЧ ВКР составила: ВПЧ 16 генотипа обнаружено у 61 пациента (64,9%); 18 – 4 (4,3%); 31 – 7 (7,4%); 33 – 13 (13,8%); 35 – 3 (3,2%); 45, 51 – по 2 (2,1%); 52, 58 – по 1 (1,0%). При этом 16 тип в 7 случаях был в интегрированной форме, 2 из которых были полными. 18 тип – 1 случай полной интеграции. Оба случая обнаружения 45 типа было ассоциировано с интегрированной формой, причем 1 образец содержал полностью интегрированный геном ВПЧ. Кроме того, один из 7 образцов, содержащих ВПЧ 31, был в частично интегрированной форме.

Таким образом, у всех пациентов с тяжелой дисплазией выявлялся ВПЧ ВКР, при этом в 11,7% случаев выявлялась интегрированная форма ВПЧ.

С.Н. Дробченко¹, О. Марголин². **Детермин Комбо – экспресс-тест нового 4-го поколения.** ¹ЗАО «Биоград», Санкт-Петербург; ²Alere Medical Co Ltd, Япония

Тесты 3-го поколения, к которому относятся большинство выпускаемых экспресс-тестов, не позволяют определять раннюю стадию инфицирования ВИЧ, так называемый период серонегативного окна. Именно на эту стадию приходится пик концентрации вируса в крови, когда организм еще не выработал антитела к вирусу. Поэтому вероятность передачи ВИЧ-инфекции на этой стадии выше, чем на последующих этапах, до развития выраженной иммуносупрессии. Именно поэтому компанией Alere были разработаны инновационные тесты на ВИЧ 4-го поколения – экспресс-тест Determine™ HIV-1/2 Ag/Ab Combo (Alere, Япония). Данный экспресс-тест определяет наличие, как антител к ВИЧ-1 и ВИЧ-2, так и антигена р24 ВИЧ. Высокая точность теста подтверждена испытаниями на тысячах образцов. В данной работе описаны результаты исследования образцов сероконверсионных панелей первыми в мире экспресс-тестами 4-го поколения Determine™ HIV-1/2 Ag/Ab Combo.

Исследования были проведены на сероконверсионных панелях: панель Zepmetrix (BCP) 6246, США и 33 панели ВВИ, США. Тесты Determine™ HIV-1/2 Ag/Ab Combo выпускаются в формате тест-карт – по 10 тест-полосок, герметично индивидуально упакованных в фольгу. На каждую тест-полоску нанесены рекомбинантные антигены ВИЧ-1/ВИЧ-2, синтетические пептиды, антитела анти-р24 и авидин. Для проведения анализа отделяли одну тест-полоску от тест-карты, удаляли защитную фольгу с тест-полоски и наносили 50 мкл образца. Результат проявлялся в виде окрашенных полос в зоне результата через 20 минут. Если антиген р24 ВИЧ присутствовал в образце, красная линия появлялась в области окна антигена (Ag). При наличии в образце антител к ВИЧ-1, ВИЧ-1 группы О и/или ВИЧ-2 проявлялась красная полоса в области окна антител (Ab). Во всех образцах появлялась контрольная полоса.

На панели BCP тест Determine™ HIV-1/2 Ag/Ab Combo сначала определял наличие антигена р24, при этом полоса антигена выявлялась слабой, затем интенсивность полосы антигена росла (15, 16 образцы) и, начиная с 16 образца, появлялась слабая полоса антител. Далее интенсивность полосы антител возрастала, а полоса антигена исчезала полностью. Тесты 3-го поколения на данной панели определяли ВИЧ, начиная с 16 образца, когда появлялась слабая полоса антител. Тесты 3-го поколения не определяли ВИЧ-положительные образцы 14 и 15, на которые приходится наибольшая концентрация вируса в крови. На образцах данной панели применение теста 4-го поколения позволило выявить ВИЧ на 7 дней раньше. На 10 панелях ВВИ тест Determine™ HIV-1/2 Ag/Ab Combo определял ВИЧ инфекцию, начиная с одного и того же образца, что и тест 3-го поколения и на 23 панелях опережал тест 3-го поколения на 2–20 дней.

Тесты 4-го поколения Alere Determine™ HIV-1/2 Ag/Ab Combo, способны выявлять ВИЧ-инфекцию на ранней стадии, еще до появления определяемых титров антител. Determine™ HIV-1/2 Ag/Ab Combo дифференцирует выявление антигена ВИЧ р24 и антител к ВИЧ в одном анализе, что позволяет определить статус каждого из маркеров. Экспресс-тесты Детермин обладавая высокой чувствительностью, специфичностью, характеризуются простотой постановки анализа, легкостью интерпретации и стабильностью результата. Высокое значение PPV тестов Детермин позволяет быть уверенным в полученном положительном результате.

Тесты Детермин зарегистрированы Росздравнадзором, имеют CE-марку, разрешены FDA для использования в США. По результатам испытаний и инспекций производства включены в список преквалифицированных диагностиче-