

4. Wilson A.G., Symon J.A. [et al.]. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation / A.G. Wilson [et al.] // Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1997. Vol. 94. № 7. P. 3195-3199.
5. Mathew C.C. The isolation of high molecular weight eucariotic DNA / C.C. Mathew // Methods in molecular biology / ed. J.M. Walker. N.Y.; London., 1984. Vol. 2. P. 31—34.

*Контактная информация:*

Лукманов Мурад Ильгизович,  
тел.: 8 (989) 952-54-82, 8 (347) 273-50-02,  
e-mail: mur-ufa@yandex.ru

*Contact information:*

Lukmanov Murad,  
phone: 8 (989) 952-54-82, 8 (347) 273-50-02,  
e-mail: mur-ufa@yandex.ru

**ОЦЕНКА ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ  
ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК ВОЗБУДИТЕЛЕЙ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ, БРУЦЕЛЛЕЗА  
И ХОЛЕРЫ МЕТОДОМ ПЦР С УЧЕТОМ РЕЗУЛЬТАТОВ В РЕЖИМЕ  
«РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»**

A.C. Абдрашитова<sup>1</sup>, Л.В. Саяпина<sup>2</sup>, А.Н. Малахаева<sup>1</sup>, Н.А. Осина<sup>1</sup>

**ESTIMATION OF DIAGNOSTIC EFFICIENCY OF DIAGNOSTIC ASSAYS  
FOR DETECTION OF DNA OF THE ANTHRAX, BRUCELLOSIS  
AND CHOLERA AGENTS BY «REAL TIME» PCR**

A.S. Abdrashitova, L.V. Sayapina, A.N. Malakhaeva, N.A. Osina

<sup>1</sup>ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов,  
<sup>2</sup>ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», г. Москва

В технических и медицинских испытаниях изучена диагностическая эффективность наборов реагентов для выявления ДНК возбудителей особо опасных болезней методом ПЦР с гибридно-флуоресцентным учетом результатов. Установлены высокие показатели их чувствительности, специфичности и воспроизводимости.

**Ключевые слова:** ПЦР, сибирская язва, бруцеллез, холера.

During technical and medical tests the diagnostic efficiency of diagnostic assays for detection of especially dangerous infectious diseases agents by real-time PCR was assessed. Their high parameters of sensitivity, specificity and reproducibility were established.

**Keywords:** PCR, anthrax, brucellosis, cholera.

Эпидемиологическая ситуация в России по сибирской язве, бруцеллезу и холере остается напряженной, это подтверждается постоянным выделением штаммов из природных очагов и регистрацией sporadических или групповых случаев заболевания людей [2, 3, 5]. В целях повышения эффективности мониторинга за возбудителями особо опасных инфекций (ООИ) в трехуровневой системе их лабораторной диагностики предусмотрена необходимость применения только зарегистрированных диагностических препаратов [4]. Обеспечение учреждений практического здравоохранения зарегистрированными препаратами для ускоренной индикации и идентификации ООИ — важная задача в обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации.

Одним из перспективных методов лабораторной диагностики особо опасных инфекционных болезней является полимеразная цепная реакция (ПЦР), позволяющая за короткий срок (3—4 ч) выявить ДНК патогена в биологическом материале и пробах из объектов окружающей среды при его концентрации от 100 м.к./мл [1]. Для проведения таких исследований, начиная с 1998 г., разработаны и внедрены в практику диагностические препараты для детекции ДНК сибиреязвенного микроба, холерного вибриона и бруцелл методом ПЦР с электрофоретическим учетом результатов. Данные тест-системы имеют определенные недостатки, связанные, главным образом, с использованием учета результатов субъективного и опасно-

го с точки зрения контаминационного заражения метода электрофореза в агарозном геле. Поэтому в ФГУН ЦНИИЭ и ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб» были разработаны наборы реагентов для выявления ДНК микроорганизмов *Bacillus anthracis*, *Brucella spp.* и *Vibrio cholerae* с гибридно-флуоресцентным учетом результатов в режиме «реального времени», предусматривающим регистрацию реакции амплификации по накоплению в пробирке флуоресцентного сигнала.

В специализированную лабораторию ГИСК им. Л.А. Тарасевича были представлены следующие наборы реагентов: «АмплиСенс *B. anthracis-FRT*» в основе которой лежит амплификация фрагментов *pagA* гена (*плазмиды pXO1*) и *capA* гена (*плазмиды pXO2*) возбудителя сибирской язвы, и предназначенный для выявления ДНК *Bacillus anthracis* в биологическом материале и объектах окружающей среды; «АмплиСенс *Brucella spp.-FL*», позволяющий на основании выявления фрагмента *wboA* гена бруцелл, детектировать ДНК бактерий *Brucella spp.* в биологическом материале; «АмплиСенс *Vibrio cholerae-FL*» для выявления ДНК *Vibrio cholerae* и идентификации патогенных штаммов *Vibrio cholerae* в биологическом материале и объектах окружающей среды, предусматривающий амплификацию 5 генетических мишеней возбудителя холеры: *ctxA* и *tcpA* генов для определения эпидемической значимости вибрионов, *wbeT* и *wbeF* генов — принадлежности к O1 или O139 серогруппе, соответственно, *hlyA* гена — принадлежность к виду *V. cholerae*. С

Результаты испытаний диагностической эффективности наборов реагентов для выявления ДНК *B. anthracis* и *Brucella* spp. методом ПЦР

Показатели	«АмплиСенс <i>B. anthracis</i> -FRT» %	«АмплиСенс <i>Brucella</i> spp.-FL»	
		вариант FRT, %	вариант FER, %
Чувствительность: в % выявленных положительных проб к числу проб чистых культур, взятых на исследование			
10 спор/мл	17	-	-
10 <sup>2</sup> спор/мл (м.к./мл)	38	54	62
10 <sup>3</sup> спор/мл (м.к./мл)	96	96	96
10 <sup>4</sup> м.к./мл	-	100	100
% выявленных положительных проб к числу проб объектов окружающей среды и биологического материала			
1 × 10 <sup>4</sup> спор/мл (м.к./мл)	100	100	100
1 × 10 <sup>3</sup> спор/мл (м.к./мл)	98	97,4	96,5
% выявленных гетерологичных микроорганизмов			
– к числу исследованных чистых культур	0	0	0
– к числу исследованных проб объектов окружающей среды и биологического материала, инфицированных гетерологичными микроорганизмами	6	0	0
Воспроизводимость: в % совпадения результатов исследования положительной и отрицательной проб при 10-кратном повторении	100	100	100

целью предотвращения получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов новые наборы реагентов дополнены внутренними контрольными образцами (ВКО), амплификация которых осуществляется одновременно с исследуемыми пробами.

**Цель исследований** – определение диагностической эффективности (чувствительность, специфичность, воспроизводимость) представленных наборов реагентов в медицинских испытаниях для решения вопроса о целесообразности регистрации их в качестве изделий медицинского назначения.

**Материалы и методы.** ПЦР-анализ в режиме «реального» времени проводился на амплификаторе с системой детекции флуоресцентного сигнала «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000», ПЦР-анализ с детекцией результатов по «конечной точке» – на амплификаторе «Терцик» и флуоресцентном ПЦР-детекторе «АЛА-1/4».

В работе использовались чистые культуры штаммов микроорганизмов видов *Bacillus*, *Brucella*, *Vibrio* и гетерологичных микроорганизмов из государственных коллекций микроорганизмов ГИСК им Л.А. Тарасевича и РосНИПЧИ «Микроб», пробы биологического материала и объектов внешней среды, искусственно инфицированные микроорганизмами.

**Результаты и обсуждение.** Для определения чувствительности набора реагентов «АмплиСенс *B. anthracis*-FRT» были исследованы пробы бактериальных суспензий штаммов возбудителя сибирской язвы, имеющих различный плазмидный профиль с концентрацией 10–1000 спор/мл. Установлено, что ДНК сибиреязвенного микроба детектирована в 17 % случаев при наличии в пробе 10 спор/мл, 38 % – 1 × 10<sup>2</sup> спор/мл, 96 % – 1 × 10<sup>3</sup> спор/мл. При анализе проб объектов окружающей

среды и биологического материала, искусственно инфицированных *B. anthracis* (pXO1+ pXO2+) выявлено 98 % и 100 % проб, содержащих возбудитель в концентрации 1 × 10<sup>3</sup> спор/мл и 1 × 10<sup>4</sup> спор/мл, соответственно. Специфичность при исследовании проб чистых культур *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. megaterium* составила 100 % (положительный ответ регистрировали только при анализе проб, содержащих ДНК сибиреязвенного микроба), проб объектов окружающей среды и биологического материала – 94 % (см. табл.). На основании полученных данных в нормативной документации на набор реагентов установлено требование к показателю чувствительности тест-системы при исследовании чистых культур *B. anthracis* равное 1 × 10<sup>3</sup> спор/мл.

Набор реагентов «АмплиСенс *Brucella* spp.-FL» в зависимости от способа детекции был представлен в двух вариантах: «ПЦР-комплект» варианты FRT и FER с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и по «конечной точке», соответственно. В ходе ряда экспериментов установлено, что набор реагентов при исследовании бактериальных суспензий культур *Brucella* spp. выявлял 54 и 62 % проб при концентрации патогена в них 1 × 10<sup>2</sup> м.к./мл при регистрации результатов по вариантам FRT и FER, соответственно; 96 % и 100 % проб – при концентрации 1 × 10<sup>3</sup> м.к./мл и 1 × 10<sup>4</sup> м.к./мл вне зависимости о способа учета флуоресценции. Следовательно, чувствительность тест-системы при исследовании чистых культур *Brucella* spp. составила 1 × 10<sup>3</sup> м.к./мл. Положительные пробы биологического материала, инфицированного *Brucella* spp. в концентрации 1 × 10<sup>3</sup> м.к./мл, выявлялись с помощью варианта FER в 96,5 % и в 97,4 % случаев (для варианта FRT). В биологическом материале с помощью испытываемого набора

реагентов с регистрацией результатов по обоим способам *Brucella spp.* выявлялась в концентрации  $1 \times 10^4$  м.к./мл в 100 % случаев. Специфичность набора в пробах с чистыми культурами гетерологичных микроорганизмов (*Y. pestis*, *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *F. tularensis*) и пробах инфицированного биологического материала для обоих вариантов составила 100 % (см. табл.).

В ходе испытаний была получена высокая воспроизводимость (100 %) совпадения результатов исследования положительных и отрицательных проб при 10-кратном повторении для всех исследуемых наборов реагентов.

Набор реагентов «АмплиСенс *Vibrio cholerae*-FL» был представлен для проведения технических испытаний на соответствие его требованиям проекта нормативной документации и состоял из двух вариантов «ПЦР-комплект» FRT и FER с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального» времени» и по «конечной точке», соответственно. Установлено, что комплект реагентов с ПЦР-смесью-1-FRT *Vibrio cholerae* скрин выявлял патогенные штаммы *V. cholerae* O1 биовара эльтор и *V. cholerae* O139, а также штаммы *V. cholerae* O1 классического биовара в концентрации  $1 \times 10^3$  м.к./мл; комплект ПЦР-смесь-1-FRT *Vibrio cholerae* тип выявлял штаммы *V. cholerae* и идентифицировал принадлежность к O1 и O139 серогруппам. При проведении контроля комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FER были получены ложноположительные результаты в пробах с *V. cholerae* не O1 по наличию маркера *wbeT*, с отрицательным контрольным образцом выделения ДНК (ОКО) — по маркерам *hlyA* и *wbeT*, а также с *E. coli* — по амплификации последовательности гена *wbeT*. В связи с этим для повышения специфичности анализа производителями было принято решение выпускать наборы реагентов только в формате FRT.

Таким образом, в ходе проведенных испытаний представленных наборов реагентов установлены высокие показатели их чувствительности, специфичности и воспроизводимости, при существенном сокращении продолжительности исследования и исключении регистрации ложноположительных результатов. Полученные результаты послужили основанием для регистрации новых наборов реагентов в РФ в установленном порядке.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Генодиагностика инфекционных заболеваний: Сборник тез. докл. 5-й Всерос. науч.-практ. конф., 19-21 окт. 2004 г. М., 2004.
2. Лямкин Г.И., Тихенко Н.И., Манин Е.А. и др. Об эпидемической ситуации и заболеваемости бруцеллезом в Российской Федерации в 2011г. и прогноз на 2012 г. // Проблемы особо опасных инфекций. Вып. 1(111). 2012. С. 26—29.
3. Москвитина Э.А., Мазрухо А.Б., Адаменко О.Л., Кругликов В.Д. Холера в начале XXI века. Прогноз на глобальном уровне // Проблемы особо опасных инфекций. Вып. 1(111). 2012. С. 11—16.
4. Онищенко Г.Г., Кузькин Б.П., Кутырев В.В. и др. Актуальные направления совершенствования лабораторной диагностики особо опасных инфекционных болезней // Проблемы особо опасных инфекций. Вып. 1(99). 2009. С. 5—10.
5. Рязанова А.Г., Еременко Е.И., Цыганкова Е.А. и др. Анализ заболеваемости сибирской язвой в 2011 г. и прогноз на 2012 г. // Проблемы особо опасных инфекций. Вып. 1(111). 2012. С. 37—38.

#### Контактная информация:

**Абдрашитова** Адиля Сапеджановна,  
тел. 8 (845) 251-52-11,  
e-mail: rusrap@microbe.ru

#### Contact information:

**Abdrashitova** A dila,  
phone: 8 (845) 251-52-11,  
e-mail: rusrap@microbe.ru

## ОПЫТ РАБОТЫ ПО САНИТАРНОЙ ОХРАНЕ ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ НА ЮЖНОМ УЧАСТКЕ ГОСУДАРСТВЕННОЙ ГРАНИЦЫ

*Т.М. Бутаев, Д.Г. Габеева, Ф.Т. Бекузарова, З.З. Каболова*

## EXPERIENCE OF THE WORK ON SANITARY GUARD TERRITORY OF THE TO RUSSIAN FEDERATION ON SOUTH AREA OF THE STATE BORDER

*T.M. Butaev, D.G. Gabeeva, F.T. Bekuzarova, Z.Z. Kabolova*

Управление Роспотребнадзора по РСО-Алания, г. Владикавказ,  
ГОУ ВПО «Северо-Осетинская государственная медицинская академия»

Рассматривается опыт работы Управления Роспотребнадзора по Республике Северная Осетия – Алания по санитарной охране на Южном участке государственной границы РФ, как одной из важнейших функций Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

**Ключевые слова:** санитарная охрана, пункт пропуска, государственная граница.

Experience of working Rospotrebnadzor Republic of North Ossetia-Alania on sanitary protection in the Southern part of the state border of the Russian Federation, as one of the most important functions of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare

**Keywords:** sanitary guard, point of the gap, state border.

Важнейшей функцией Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека является санитарная охрана территории от заноса особо опасных инфекционных заболеваний, а также предупреждение

ввоза опасных для человека химических, биологических и радиоактивных отходов и грузов. Одним из факторов риска глобализации является высокоскоростное транспортное сообщение, способствующее быстрому распространению возбудите-