

ЛИТЕРАТУРА

1. Катосова Л.К. Клинико-биологическая оценка пневмотропной флоры при острых и хронических бронхолегочных болезнях у детей // Автореф. дис. д-ра биол. наук. 1990.
2. Duque -Jamaica R., Arevalo-Galvis A., Poutou-Pinales P.A., . Sequential statistical improvement of the liquid cultivation of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 2010; 15: 303–12.
3. Jiang X., Doyle M.P. Growth supplements for *Helicobacter pylori*. // *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38: 1984–7.
4. Joo J.-S., Park K.- C., Song J.-Y. et al. A thin-layer liquid culture technique for the growth of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 2010; 15: 295–302.
5. Lin Y.L., Lee N., Chan E.C. Determination of optimal liquid medium for enzyme expression by *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Pathology*. 1996; 49: 818–20.
6. Secker D.A., Tompkins D.S., Alderson G. Gas-permeable life cell tissue culture flasks give improved growth of *Helicobacter pylori* in a liquid medium. *J. Clin. Microbiology*. 1991; 29: 1060–1.
7. Shadowen R.D., Sciortino C.V. Improved growth of *Campylobacter pylori* in a biphasic system. *J. Clin. Microbiology*. 1989; 27: 1744–7.
8. Xia H.X., English L., Keane C.T. et al. Enhanced cultivation of *Helicobacter pylori* in liquid media. *J. Clin. Pathology*. 1993; 46(8): 750–3.

Поступила 21.11.12

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

УДК 579.862.1:579.252.55].083.18

Т.С. Скачкова, О.Ю. Шипулина, Э.А. Домонова, А.И. Субботовская*, В.С. Козырева*, В.Н. Ильина*, Г.А. Шипулин

РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДНК МЕТИЦИЛЛИНЧУВСТВИТЕЛЬНОГО И МЕТИЦИЛЛИНРЕЗИСТЕНТНОГО *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, А ТАК ЖЕ МЕТИЦИЛЛИНРЕЗИСТЕНТНЫХ КООГУЛАЗОНЕГАТИВНЫХ *STAPHYLOCOCCUS SPP.* МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ "РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ"

ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, 111123, Москва, ФГБУ "ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина" Минздрава России, 630055, Новосибирск*

*Разработан набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК метициллинчувствительных и метициллинрезистентных *S.aureus*, метициллинрезистентных коагулазонегативных *Staphylococcus spp.* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридной флуоресцентной детекцией, обладающий высокими аналитическими и диагностическими характеристиками. Использование данного набора реагентов позволит оптимизировать эпидемиологический надзор за распространением метициллинрезистентных штаммов *Staphylococcus spp.*, значительно снизив длительность и трудоемкость исследования.*

Ключевые слова: метициллинчувствительный *Staphylococcus aureus*, метициллинрезистентный *Staphylococcus aureus*, метициллинрезистентные коагулазонегативные *Staphylococcus spp.*, диагностика, ПЦР в режиме реального времени

T.S. Skatchkova, O.Yu. Shipulina, E.A. Domonova, A.I. Subbotovskaya, V.S. Kozyreva, V.N. Ilyina, G.A. Shipulin

THE DEVELOPMENT AND TESTING OF REAGENTS KIT FOR DETECTION AND QUALITATIVE EVALUATION OF DNA OF METHICILLIN SENSITIVE AND METHICILLIN RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* AND ALSO METHICILLIN RESISTANT COAGULASE NEGATIVE *STAPHYLOCOCCUS SPP.* APPLYING TECHNIQUE OF POLYMERASE CHAIN REACTION IN "REAL TIME" MODE

FBIS "Central Research Institute for Epidemiology" of Rosпотребнадзор, 111123, Moscow, Russian Federation, FSBU "E.N. Meshalkin Novosibirsk Research Institute for Blood Circulation Pathology" of Ministry of Health of the Russian Federation, 630055, Novosibirsk, Russian Federation*

*The reagents kit is developed to identify and quantitatively detect DNA of methicillin sensitive and methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, methicillin resistant coagulase negative *Staphylococcus spp.* in biological material using technique of polymerase chain reaction with hybridizational fluorescent detection and having higher analytical and diagnostic characteristics. The application of the given reagents kit makes it possible to optimize the epidemiologic monitoring of propagation of methicillin resistant strains of *Staphylococcus spp.* Significantly decreasing duration and laboriousness of study.*

Key words: methicillin sensitive *Staphylococcus aureus*, methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, methicillin resistant coagulase negative *Staphylococcus spp.*, diagnostics, polymerase chain reaction in "real time" mode

Для корреспонденции:

Скачкова Татьяна Сергеевна, мл. науч. сотр. отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора

Адрес: 111123, Москва, Новогиреевская ул., 3а

Телефон: (8495)-974-96-46

E-mail: skachkova@pcr.ms

В Российской Федерации по данным официальной статистики ежегодно регистрируется примерно 30 тыс. случаев инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи ($\approx 0,8$ на 1000 пациентов), однако эксперты считают, что их истинное число составляет не менее 2–2,5 млн [1]. В настоящее время бактерии рода *Staphylococcus* являются одними из ведущих возбудителей нозокомиальных инфекций.

Основной причиной, усугубляющей течение эпидемиологического процесса, является широкое распространение метициллинрезистентных штаммов. Резистентность бактерий рода *Staphylococcus* к метициллину может быть обусловлена тремя механизмами: продукцией дополнительного пенициллинсвязывающего белка (ПСБ) – ПСБ-2а, кодируемого геном *mecA*; инактивацией вследствие гиперпродукции β -лактамаз; модификацией нормальных ПСБ. При этом клиническое значение имеет *mecA*-обусловленная резистентность, обеспечивающая устойчивость к β -лактамам антибиотикам. Резистентность возбудителя к нескольким основным группам antimicrobных препаратов (пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы, монобактамы) одновременно значительно снижает клиническую эффективность фармакотерапии, что приводит к необходимости замены стандартной схемы стартовой эмпирической антибиотикотерапии вследствие ее безрезультативности, увеличению сроков госпитализации, затрат на лечение и повышению риска неблагоприятного исхода.

Одним из положений "Декларации по борьбе с антимикробной резистентностью", принятой на Всемирном дне резистентности (16.09. 2000 г., Торонто, Онтарио, Канада), является утверждение о том, что мониторинг резистентности и эпидемиологический надзор должны стать рутинными как в поликлинике, так и в стационаре. Наиболее широко применяемый для данных целей бактериологический метод, направленный на выделение возбудителя и его идентификацию в культуре клеток с последующим определением чувствительности к ряду antimicrobных препаратов, к сожалению, имеет ряд ограничений. Это длительность в исполнении, жесткие требования к процедуре взятия, хранения, транспортировки и срокам доставки биологического материала, а так же отсутствие условий для проведения исследований в ряде клинико-диагностических лабораторий лечебно-профилактических учреждений здравоохранения РФ. В связи с этим особую важность приобретает внедрение в клиническую практику молекулярно-биологических методов диагностики, имеющих высокую чувствительность, специфичность и быстроту исполнения, позволяющих проводить идентификацию возбудителя с определением его антибиотикорезистентности без предварительного культивирования.

Целью представленного исследования явились разработка и апробация набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК *S.aureus* с возможностью дифференциации метициллинчувствительных и метициллинрезистентных штаммов/изолятов, а так же метициллинрезистентных коагулазонегативных *Staphylococcus spp.* в биологическом материале методом ПЦР с гибридационно-флюоресцентной детекцией результатов анализа в режиме "реального времени".

Материалы и методы. Для разработки набора реагентов использовали 7 эталонных контрольных штаммов *S.aureus*, полученных из американской коллекции типовых культур (ATCC): № 6538P, 43300, 29213, 25923, 33862, 33591, 12600 и 196 клинических изолятов *Staphylococcus spp.* с различной концентрацией, оцененной по стандарту мутности. Дизайн молекулярной структуры праймеров и флюоресцентно-меченных красителями (флюорофорами) зондов типа "TaqMan" проводили с учетом общих требований при использовании компьютерной программы "Oligo Analyzer" версия 3.1 ("Integrated DNA Technologies", Inc., США) и международной компьютерной базы данных "Gen Bank". Расчет ориентировочных температур плавления и отжига, оценку термодинамических характеристик и возможность образования вторичных структур проводили с использованием компьютерной программы "Oligonucleotide Properties Calculator" [2]. Клонирование рекомбинантных контролей, необходимых для выполнения ПЦР-исследования, проводили по Маниатис Т. и соавт. [3]. Экстракцию ДНК из штаммов и образцов биологического материала проводили с использованием набора реагентов "Рибо-преп" (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора). Состав реакционной

смеси: специфические олигонуклеотидные праймеры, специфические зонды с флюоресцентной меткой типа "TaqMan", дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, буфер, TaqF-полимеразы, очищенная ДНК. Постановку ПЦР и последующий анализ полученных результатов проводили с использованием программируемых амплификаторов с системой детекции флюоресцентного сигнала в режиме "реального времени" "Rotor-Gene 3000/6000" ("Corbett Research", Австралия), "Rotor-Gene Q" ("Qiagen", ФРГ); "Mx3000P" ("Stratagene", США); "iCycler iQ5" и "CFX Manager" ("Bio-Rad", США), руководствуясь инструкциями производителей.

Оценку аналитической надежности с определением специфичности и чувствительности проводили согласно ГОСТ Р 53079.1-2008 и ГОСТ Р 53022.2-2008 [4, 5]. Для проверки аналитической специфичности использовали ДНК штаммов и изолятов различных микроорганизмов с концентрацией не менее 10^5 – 10^6 ГЭ/мл: *Chlamydomypha pneumonia*, *Escherichia coli*, *Haemophilus haemolyticus*, *H.influenzae*, *H.parainfluenzae*, *Klebsiella oxytoca*, *K.pneumonia*, *Listeria monocytogenes*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria cinerea*, *N. elongata*, *N. flavescens*, *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *N. mucosa*, *N. sicca*, *N. subflava*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *S. aureus*, *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. simulans* (метициллинчувствительные и метициллинрезистентные); *Streptococcus agalactiae*, *S. milleri*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. salivarius*, *S. sanguis*, *S. suis*, *S.viridans* и ДНК человека. Оценку аналитической чувствительности с определением линейного диапазона измерений проводили методом лимитирующих разведений взвеси штаммов метициллинчувствительных и метициллинрезистентных *S. aureus*, *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. simulans*, концентрацию которых измеряли по стандарту мутности. При определении линейности подсчитывали линейную регрессию и коэффициент корреляции (R^2).

Оценку диагностической (клинической) информативности с определением чувствительности, специфичности выполняли по ГОСТ Р 53022.3-2008 [6]. В рамках клинической апробации разработанного набора реагентов осуществляли традиционное бактериологическое и молекулярно-биологическое (ПЦР) исследование 119 мазков-отпечатков отделяемого стернотомной раны пациентов с клиническими признаками инфекции области хирургического вмешательства отделений ишемической болезни и приобретенных пороков сердца. Сбор, хранение и транспортировку биологического материала проводили согласно методическим рекомендациям "Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики" [7]. Молекулярно-биологическое исследование выполняли с помощью разработанного набора реагентов. Бактериологическое исследование осуществляли в соответствии с приказом Минздрава СССР от 22.04.85 г. № 535 "Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений" [8]. Посев биологического материала выполняли общепринятыми методами. Идентификацию и определение чувствительности проводили на анализаторе "ATB-Expression" ("bioMerieux", Франция). Метициллинрезистентность исследовали диско-диффузным методом с помощью дисков, пропитанных оксациллином и цефокситином ("Bio-Rad", США) на агаре "Мюллер-Хинтон" ("bioMerieux", Франция) в соответствии с рекомендациями Национального комитета по клиническим и лабораторным стандартам США [9] и Методическими указаниями по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам [10].

Результаты и обсуждение. В результате проведенной научно-исследовательской работы разработан набор реагентов "АмплиСенс® MRSA-скрин-титр-FL", предназначенный для выявления и количественного определения ДНК метициллинчувствительных и метициллинрезистентных *S.aureus*, мети-

Принцип интерпретации результатов ПЦР-исследования образцов биологического материала

Наименование канала детекции//выявляемая мишень			Результат/расчет концентрации, коп/мл
"FAM/Green"//ДНК <i>S.aureus</i>	"JOE/HEX/Yellow"// ДНК гена <i>mecA</i> <i>Staphylococcus spp.</i>	"ROX/Orange"//ДНК внутреннего контрольного образца	
A	B	C	
+	-	+/-	Обнаружена ДНК метициллинчувствительного <i>S.aureus</i> /(A ¹ /C ²) x коэффициент ВКО ³ · N ⁴
-	+	+/-	Обнаружена ДНК метициллинрезистентного коагулазонегативного <i>Staphylococcus spp.</i> /(B ⁵ /C ²) x коэффициент ВКО ³ · N ⁴
+	+	+/-	Расчитать десятичный логарифм для А и В. 1) Если А отличается от В не более чем на 0,3 lg – обнаружена ДНК метициллинрезистентного <i>S.aureus</i> /(B ⁵ /C ²) x коэффициент ВКО ³ · N ⁴ 2) Если А отличается от В более чем на 0,3 lg – обнаружена ДНК метициллинрезистентного <i>Staphylococcus spp.</i> , в том числе метициллинрезистентного <i>S.aureus</i> и метициллинрезистентных коагулазонегативных <i>Staphylococcus spp.</i> /(B ⁵ /C ²) x коэффициент ВКО ³ · N ⁴
-	-	-	Невалидный
-	-	+	Не обнаружено

¹ – расчетная концентрация выявления ДНК по каналу детекции для флюорофора "FAM/Green",
² – расчетная концентрация выявления ДНК по каналу детекции для флюорофора "JOE/HEX/Yellow",
³ – концентрация ДНК внутреннего контрольного образца, добавляемого в процессе экстракции,
⁴ – коэффициент пересчета объема N = 100/объем экстракции, мкл,
⁵ – расчетная концентрация выявления ДНК по каналу детекции для флюорофора "ROX/Orange",
 + – положительный, - – отрицательный.

циллинрезистентных коагулазонегативных *Staphylococcus spp.* в биологическом материале методом ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной детекцией. Диагностические мишени: специфичный ген *S.aureus* Ferridoxin-dependent glutamate synthase и мобильный генетический элемент *mec* (*SCCmec*) бактерий *Staphylococcus spp.*, обнаруживаемый только у метициллинрезистентных штаммов. При проведении анализа выбранных нуклеотидных последовательностей специфических олигонуклеотидных праймеров и зондов с флюоресцентной меткой типа "TaqMan" на предмет наличия гомологии с частично и полностью секвенированными геномами различных организмов совпадения не обнаружено. Условия проведения ПЦР-исследования были подобраны экспериментально. Набор реагентов предназначен для программируемых амплификаторов с системой детекции флюоресцентного сигнала в режиме "реального времени", не менее чем по трем каналам. По каналу для флюорофора "FAM/Green" детектируется специфический фрагмент ДНК *S.aureus*. По второму каналу для флюорофора "JOE/HEX/Yellow" выявляется фрагмент ДНК гена *mecA*, расположенный в специфической области, обнаруживаемой только у метициллинрезистентных штаммов *Staphylococcus spp.*, и позволяющий проводить дифференциацию метициллинрезистентных от метициллинчувствительных *Staphylococcus spp.* По третьему каналу "ROX/Orange" происходит регистрация флюоресцентного сигнала экзогенного неконкурентного внутреннего контроля, добавляемого на этапе экстракции. Для отслеживания эффективности проведения ПЦР-исследования кроме экзогенного неконкурентного внутреннего контроля используются положительные контроли этапов экстракции и амплификации, представляющие собой, искусственно сконструированные специфические фрагменты ДНК двух ранее заявленных диагностических мишеней, клонированных в плазмиду. Принцип интерпретации результатов ПЦР-исследования представлен в табл. 1. Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флюоресценции с установленной на заданном уровне пороговой линией, с последующим расчетом концентрации в исследуемых образцах относительно калибраторов – положительных контролей этапа амплификации, охарактеризованных количеством. При тестировании биологического материала, в котором одновременно присутствуют и метициллинчувстви-

тельный/резистентный *S.aureus*, и метициллинрезистентные коагулазонегативные *Staphylococcus spp.*, интерпретация при получении положительного сигнала одновременно по двум каналам ("FAM/Green" и "JOE/HEX/Yellow") основана на количественном расчете, подобранном экспериментально. ПЦР-исследование 7 эталонных контрольных штаммов *S.aureus* и 196 клинических изолятов *Staphylococcus spp.* показало, что средняя величина различия количества фрагмента ДНК гена *S.aureus* по отношению к количеству фрагмента ДНК гена *mecA Staphylococcus spp.* при анализе метициллинрезистентных *S.aureus* составила 0,06 ± 0,086 lg, при этом максимальное значение – 0,26 lg. Таким образом, если выявляемое количество фрагмента ДНК гена *S.aureus* отличается от количества фрагмента ДНК гена *mecA Staphylococcus spp.* не более чем на 0,3 lg, результат означает: обнаружена ДНК метициллинрезистентного *S.aureus*. Если количество фрагмента ДНК гена *S.aureus* отличается от количества фрагмента ДНК гена *mecA Staphylococcus spp.* более, чем на 0,3 lg, мы не можем дифференцировать метициллинрезистентный *S.aureus* от метициллинрезистентных коагулазонегативных *Staphylococcus spp.* В этом случае результат трактуется как смесь ДНК метициллинрезистентных штаммов *Staphylococcus spp.*, в том числе метициллинрезистентный *S.aureus* и метициллинрезистентные коагулазонегативные *Staphylococcus spp.*

Проверка аналитической специфичности набора реагентов "АмплиСенс® MRSA-скрин-титр-FL" продемонстрировала отсутствие ложноположительных результатов при тестировании ДНК 39 различных микроорганизмов, ДНК человека в 100% случаев. Результаты тестирования штаммов метициллинрезистентных *Staphylococcus spp.* представлены в табл. 2. Оценка аналитической чувствительности показала, что набор реагентов "АмплиСенс® MRSA-скрин-титр-FL" позволяет выявлять 400 копий ДНК *Staphylococcus spp.*/мл. Линейный диапазон измерения составляет 800–10 000 000 копий ДНК *Staphylococcus spp.*/мл (R² ≥ 0,98).

Результаты сравнительных бактериологических и молекулярно-биологических исследований при проведении клинического испытания набора реагентов "АмплиСенс® MRSA-скрин-титр-FL" были следующими. Результат ПЦР-исследования – положительный, бактериологического исследования – положительный в 70 случаях, отрицательный – в

Результаты ПЦР-исследования штаммов метициллинрезистентных *Staphylococcus spp.*

Наименование штаммов метициллинрезистентных <i>Staphylococcus spp.</i>	Наименование канала детекции//выявляемая мишень					Результат//концентрация ДНК <i>Staphylococcus spp.</i> , коп/мл
	"FAM/Green"//ДНК <i>S.aureus</i>		"JOE/HEX/Yellow"//ДНК гена <i>mecA</i> <i>Staphylococcus spp.</i>		"ROX/Orange"//ДНК внутреннего контрольного образца	
	коп/мл	Ig	коп/мл	Ig	коп/мл	
<i>S. simulans</i>			3,2•10 ⁵	5,5	4,2•10 ⁴	Обнаружена ДНК метициллинрезистентных коагулазонегативных <i>Staphylococcus spp.</i> // 4,3•10 ⁵
<i>S. epidermidis</i>			5,0•10 ⁶	6,7	5,0•10 ⁴	Обнаружена ДНК метициллинрезистентных коагулазонегативных <i>Staphylococcus spp.</i> // 5,7•10 ⁶
<i>S. cohnii</i>			2,5•10 ⁶	6,4	4,8•10 ⁴	Обнаружена ДНК метициллинрезистентных коагулазонегативных <i>Staphylococcus spp.</i> // 3,0•10 ⁶
<i>S. aureus</i>	1,6•10 ⁶	6,2	1,6•10 ⁶	6,2	3,7•10 ⁴	Обнаружена ДНК метициллинрезистентного коагулазонегативного <i>Staphylococcus spp.</i> // 2,4•10 ⁶
<i>S. haemolyticus</i>			3,2x•10 ⁵	5,5	3,8•10 ⁴	Обнаружена ДНК метициллинрезистентных коагулазонегативных <i>Staphylococcus spp.</i> // 4,7•10 ⁵
<i>S. saprophyticus</i>			6,3x•10 ⁵	5,8	4,5•10 ⁴	Обнаружена ДНК метициллинрезистентных коагулазонегативных <i>Staphylococcus spp.</i> // 8,0•10 ⁵

11 случаях. Из 119 анализируемых образцов бактериологическим методом было выделено 72 штамма *Staphylococcus spp.*, 56 из которых были метициллинрезистентными: 48 штаммов *S. epidermidis*, 1 штамм *S. haemolyticus*, 2 штамма *S. aureus* и 5 штаммов *S. saprophyticus*. Для данных образцов в 70 (97,2%) случаях наблюдалось полное совпадение результатов тестирования сравниваемых методов как по метициллинрезистентности, так и по виду возбудителя (*S. aureus* или коагулазонегативные *Staphylococcus spp.*). Концентрация ДНК *Staphylococcus spp.* варьировала от 96 до 5,3•10⁹ коп/мл (среднее 2,74•10⁸ коп./мл, медиана 7,4•10⁴ коп/мл). В 47 исследуемых образцах биологического материала метициллинрезистентных штаммов бактериологическим методом выявлено не было. При этом полное совпадение результатов наблюдалось только в 36 (76,6%) случаях, а в 11 (23,4%) разработанным набором реагентов были выявлены ДНК метициллинрезистентных коагулазонегативных *Staphylococcus spp.* Таким образом, исходя из анализа полученных результатов диагностическая чувствительность ПЦР-исследования по отношению к бактериологическому составу составила 97,2%, диагностическая специфичность – 76,6%. Учитывая, что положительные результаты ПЦР-исследования были получены при тестировании образцов биологического материала пациентов с установленными ранее результатами выделения бактерий *Staphylococcus spp.* в культуре клеток, возможные расхождения можно объяснить более высокой чувствительностью метода ПЦР по сравнению с традиционным бактериологическим. Концентрации ДНК метициллинрезистентных коагулазонегативных *Staphylococcus spp.* в данных дискордантных образцах составляла 2,07 • 10²–3,6 • 10³ (среднее 1,4 • 10³, медиана 1,1 • 10³). Полное совпадение результатов тестирования сравниваемых методов составило бы 100% при концентрации ДНК *Staphylococcus spp.* более 3,6 • 10³ коп/мл исследуемого образца.

Заключение. Разработан набор реагентов "АмплиСенс® MRSA-скрин-титр-FL" для выявления и количественного определения ДНК метициллинчувствительных и метициллинрезистентных *S. aureus*, метициллинрезистентных коагулазонегативных *Staphylococcus spp.* в биологическом материале методом ПЦР с гибридационно-флюоресцентной детекцией, обладающий высокими аналитическими и диагностическими характеристиками. Анализ отличается достаточной простотой и воспроизводимостью, что открывает перспективы его широкого применения в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений здравоохранения России. Использование данного набора реагентов позволит оптимизировать эпидемиологический надзор за распространением метициллинрези-

стентных штаммов *Staphylococcus spp.*, значительно снизить длительность и трудоемкость исследования.

Набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК метициллинчувствительного и метициллинрезистентного *Staphylococcus aureus*, метициллинрезистентных коагулазонегативных *Staphylococcus spp.* в биологическом материале методом ПЦР с гибридационно-флюоресцентной детекцией "АмплиСенс® MRSA-скрин-титр-FL" (ТУ 9398-190-01897593–2012) зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере здравоохранения. Регистрационное удостоверение № ФСР 2012/13998 от 29.10.12 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Национальная концепция профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, 2011; 31.
2. Kibbe W.A. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. Nucl. Acids Res. 2007; 35 (2): 43–6.
3. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. М.: Мир, 1984: 239–41.
4. ГОСТ Р 53079.1–2008. Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 1. Правила описания методов исследования. М., Стандартинформ, 2009.
5. ГОСТ Р 53022.2–2008. Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 2. Оценка аналитической надежности методов исследования (точность, чувствительность, специфичность). М., Стандартинформ, 2009.
6. ГОСТ Р 53022.3–2008. Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов. М., Стандартинформ, 2009.
7. Методические рекомендации "Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики". М.: ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, 2008.
8. Приказ № 535 Минздрава СССР от 22.04.1985. "Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений". М., 1985.
9. NCCLS. 2004. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing. Fourteenth informational supplement. NCCLS document M100-514. NCCLS, Wayne, Pa.
10. Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам, МУК 4.2.1980-04 Минздрава России, 2004.

Поступила 13.11.12