

ИСПЫТАНИЕ МЕТОДА ПЦР В РАБОТЕ ИНДИКАЦИОННОЙ ЛАБОРАТОРИИ МОБИЛЬНОГО КОМПЛЕКСА СПЭБ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ПРОБ НА ХОЛЕРУ

С.О. Водопьянов, А.С. Водопьянов, И.П. Олейников, Р.В. Писанов, А.Б. Мазрухо

CHOLERA TOXIN GENE DETECTION BY PCR IN THE WORK OF INDICATIVE LABORATORY OF SAET MOBILE COMPLEX

S.O. Vodop'yanov, A.S. Vodop'yanov, I.P. Oleynikov, R.V. Picanov, A.B. Mazrukho

ФГУЗ РостНИПЧИ Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону

Впервые проведено испытание метода ПЦР в закрытом формате при выявлении гена холерного токсина в ходе работы индикационной лаборатории мобильного комплекса СПЭБ при проведении тактико-специальных учений в автономных условиях. Время получения результата составляло около трех часов с момента поступления материала для исследования. Необходимо оснащение СПЭБ аналогичными тест-системами для выявления широкого спектра возбудителей инфекционных заболеваний.

Ключевые слова: холерный вибрион, ПЦР.

A method of PCR in a proprietary format for detection of the cholera toxin gene was first tested within the work of indicative laboratory of SAET mobile complex during tactical special training under autonomic conditions. The results were obtained in about three hours from the moment of delivery of the material for research. Similar tests for revealing of a broad spectrum of pathogens are necessary for SAET equipment.

Keywords: *Vibrio cholerae*, PCR.

Специализированные противоэпидемические бригады (СПЭБ) функционируют в соответствии с Регламентом (Стандартом) утвержденным приказом Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 22.11.2007 № 330. СПЭБ предназначена для проведения мероприятий по противоэпидемическому и санитарно-гигиеническому обеспечению населения при ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций (ЧС) природного и техногенного характера, в том числе обусловленных эпидемиями и проявлениями биотерроризма, а также при угрозе их возникновения [1].

Лаборатория индикации мобильного комплекса специализированной противоэпидемической бригады (МК СПЭБ) на базе автомобильного шасси предназначена для проведения индикации ПБА I-IV групп патогенности с помощью иммунологических (ИФА-анализ) и молекулярно-биологических (ПЦР-анализ) методов. Модуль смонтирован на базовом шасси прицепа автомобиля-тягача КАМАЗ и может быть оперативно перебазирован в любую точку и развернут как в полном составе СПЭБ в т. ч. в условиях полной автономности, так и в виде специализированных отдельных групп. Инженерные решения, заложенные при проектировании МК СПЭБ и его оснащение (шлюзовые камеры, приточно-вытяжная вентиляция бокса биологической безопасно-

сти III класса с фильтром высокой эффективности, санпропускник) позволяют проводить исследования с соблюдением всех требований СП «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)». СП 1.3.1285—03 и МУ 1.3.1794—03. Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I—II групп патогенности» [1].

Модернизированные по единому стандарту СПЭБ укомплектованы современным лабораторным оборудованием, позволяющим использовать как классические методы лабораторного анализа, так и передовые методы экспресс-диагностики. Имеющийся набор встроенного и съемного лабораторного оборудования мобильного комплекса позволяет проводить молекулярно-биологическую диагностику различных возбудителей методом ПЦР, включая различные варианты ПЦР с гибридационно-флюоресцентным приемом детекции.

Лабораторная база СПЭБ должна быть укомплектована проверенными и апробированными в ходе учений диагностическими препаратами. Для выполнения этой задачи ранее нами была проведена оценка эффективности использования новых питательных сред для культивирования и выделения чумного микроба ЧДС-37 и ЧДС-28 на различных этапах тактико-специального учения (ТСУ) СПЭБ по специфической индикации ПБА [2].

Таблица 1. Результат исследования проб методом ПЦР по конечной точке на наличие гена холерного токсина в лаборатории индикации мобильного комплекса СПЭБ при проведении ТСУ

№ пробы	Источник получения	Концентрация <i>Vibrio cholerae</i> eltor 5879 (м.кл/мл)	Результат ПЦР
1	больной	10 ⁶	положительный
2	больной	10 ⁶	положительный
3	контактный	нет	отрицательный
4	контактный	нет	отрицательный
5	контактный	нет	отрицательный
6	вибрионоситель	10 ⁴	положительный
7	контактный	нет	отрицательный
8	контактный	нет	отрицательный
9	контактный	нет	отрицательный
10	контактный	нет	отрицательный
11	контактный	нет	отрицательный

Целью настоящей работы было проведение испытания метода ПЦР в закрытом формате для выявления гена холерного токсина в ходе работы индикаторной лаборатории мобильного комплекса СПЭБ при проведении тактико-специальных учений в автономных условиях.

В нашем распоряжении имеется апробированная система праймеров для выявления гена холерного токсина с помощью ПЦР и последующей детекцией результатов с помощью электрофореза [3]. Нами по методике «молекулярных бекон» [4, 5] был сконструирован специфический зонд, меченный по 3' концу флуоресцентным красителем (FAM) и по 5' концу гасителем флуоресценции (BHQ1). Зонд был синтезирован в НПФ Синтол (Москва). Добавление зонда к паре праймеров, специфических к гену *stx*, позволяет проводить детекцию результатов ПЦР по нарастанию флуоресценции. Компоненты реакции можно было хранить при 4 °С.

Сконструированная система позволяет проводить ПЦР для выявления гена *stx* холерного вибриона в закрытом формате: как по конечной точке, так и непосредственно в режиме реального времени. Порог чувствительности разработанного варианта ПЦР составил порядка 10² копий в мл. В случае использования ДНК гетерологичных штаммов и атоксигенных штаммов вибрионов нарастания уровня флуоресценции не зарегистрировано.

При проведении испытаний использовали имитацию проб из объектов внешней среды и от человека, которые контаминировали клетками токсигенного штамма *Vibrio cholerae* eltor 5879.

Клетки выращивали на плотной среде в течение 18 ч, готовили взвесь с концентрацией по оптическому стандарту мутности 10⁹ клеток в мл, которую обеззараживали добавлением мертиолята натрия. После получения отрицательных результатов контрольных высевов взвесь использовали для контаминации проб. Согласно легенде учений для анализа было приготовлено 11 проб, из которых две были получены от заболевших холерой, а одна проба от вибрионосителя. В пробы от заболевших и носителя добавляли контрольный штамм до конечной концентрации 10⁶ и 10⁴ соответственно.

Подготовку проб к исследованию и последующее проведение во встроенном боксе биологической безопасности III класса. Выделение ДНК в случае проб из внешней среды и от людей осуществляли методом нуклеосорбции на силикагеле. Этот этап исследования в условиях мобильного комплекса занимал до 60 мин.

Далее полученные препараты ДНК переносили во встроенный ПЦР-бокс, расположенный в изолированном помещении под отрицательным давлением. В ПЦР-боксе проводили приготовление смеси для постановки ПЦР, разлив смеси по пробиркам и внесение исследуемой ДНК. Постановку ПЦР проводили в амплификаторе «Терцик». Для проведения ПЦР, учитывая легкость транспортировки и уровень энергопотребления, нами был выбран вариант учета результатов по конечной точке с помощью детектора «Джин» отечественного производителя. Проведение этого этапа исследования в условиях мобильного комплекса при анализе 11 проб занимало не более двух часов.

При расшифровке полученных результатов было установлено, что с помощью ПЦР с учетом результатов по конечной точке были идентифицированы как позитивные все пробы, контаминированные токсигенным штаммом возбудителя холеры (табл. 1). Время получения результата составляло около трех часов с момента поступления материала для исследования в лабораторию индикации мобильного комплекса СПЭБ.

Выводы. Впервые в ходе ТСУ СПЭБ получены результаты, свидетельствующие о перспективности использования ПЦР в закрытом формате в практике работы лаборатории индикации СПЭБ. Необходимо оснащение СПЭБ аналогичными тест-системами для выявления широкого спектра возбудителей инфекционных заболеваний.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сборник нормативно-методических документов по организации работы специализированных противоэпидемических бригад Ростпотребнадзора /Под ред. акад. РАМН Г.Г. Онищенко и чл.-корр. РАМН В.В. Кутырева. Саратов: ОАО «Приволжское издательство», 2008. 216 с.
2. Мазрухо А.Б., Каминский Д.И., Ломов Ю.М. и др. Аprobация новых питательных сред для культивирования и выделения чумного микроба ЧДС-28 и ЧДС-37 в ходе тактико-специального учения специализированной противоэпидемической бригады //Здоровье населения и среда обитания. 2010. № 6 (207). С. 42—45.
3. Keasler, S. P., R. H. Hall. 1993. Detecting and biotyping *Vibrio cholerae* O1 with multiplex polymerase chain reaction //Lancet 341:1661.
4. Gubala A. J., Proll D. F. Molecular-Beacon Multiplex Real-Time PCR Assay for Detection of *Vibrio cholerae* //APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Sept. 2006. Vol. 72, No. 9. P. 6424—6428.
5. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. и др. ПЦР «в реальном времени» /Под ред. д.б.н. Д.В. Ребрикова. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. 215 с.: ил.

Контактная информация:

Водоpьянов Сергей Олегович,
тел.: 8-863-240-22-66
e-mail: serge@diagnostica.su

Contact information:

Vodop'anov Sergey Olegovitch,
phone: 8-863-240-22-66
e-mail: serge@diagnostica.su

