

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМ НА ОСНОВЕ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ЭПИДЕМИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

Яцышина С.Б., Осина Н.А.¹, Астахова Т.С., Ильичев Ю.А.², Куличенко А.Н.¹, Хайтович А.Б.², Шипулин Г.А.

ФГУН ЦНИИ эпидемиологии, Москва, Россия; 1- ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, Россия; 2 – Крымская ПЧС МЗ Украины, Крымский ГМУ им. С.И. Георгиевского, Симферополь, Украина.

Введение

Факт широкого распространения холерных вибрионов в окружающей среде должен обращать на себя внимание эпидемиологов и способствовать организации мониторинга за эпидемическим потенциалом циркулирующих холерных вибрионов. Для быстрой оценки эпидемической ситуации целесообразно применение новых методов индикации, позволяющих одновременно обнаружить микроорганизм и охарактеризовать его значимость (определить наличие маркеров патогенности и серогруппу). Оптимальным решением этой задачи является применение мультилокусной ПЦР.

Цель

Разработка ПЦР тест-систем для проведения экспресс-анализа на присутствие возбудителей холеры с их одновременной характеристикой по признакам эпидемической значимости.

Материалы и методы

В работе использовали штаммы из коллекций КПЧС и из Государственной коллекции патогенных бактерий (РосНИПЧИ «Микроб»). ПЦР проводили на амплификаторе Терцик (ДНК-технология, Москва), ПЦР с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени проводили на амплификаторах Rotor Gene 3000 (Corbett Research, Австралия), для детекции флуоресценции после окончания амплификации использовали прибор Ala-1 (Biosan, Латвия).

Результаты

В ФГУН ЦНИИЭ совместно с КПЧС разработана тест-система «АмплиСенс *V.cholerae*» для выявления ДНК *V. cholerae* всех серогрупп (по наличию последовательности *Hly*) и идентификации патогенных штаммов *Vibrio cholerae* (по наличию основных факторов вирулентности – *ctxA*, *tcpA*) и доказательства принадлежности к серогруппе O1 (по наличию амплификации мишени *wbeT*) или к серогруппе O139 (по наличию амплификации мишени *wbeF*) в воде открытых водоемов, а также в фекалиях с помощью ПЦР с детекцией методом электрофореза. Постановка реакции осуществляется в мультиплексном формате с использованием «горячего старта» в двух пробирках: «Скрин» - амплификация мишеней *ctxA* (554 п.н.), *tcpA* (E10r и Classica) – (202 п.н.) и внутреннего контроль-

ного образца (ВКО) (751 п.н.) и «Тип» - амплификация мишеней *Hly* (517 п.н.) и *wbeT* (204 п.н.) и *wbeF* (345 п.н.) и ВКО (770 п.н.). Аналитическая специфичность тест-системы доказана при тестировании близкородственных микроорганизмов, представителей нормальной микрофлоры и ряда других возбудителей кишечных инфекций: *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Morganella morganii*, *Enterobacter faecalis*, *Escherichia coli*, *Aeromonas*, *Plesiomonas shideli*, *Comamonas*, а также вибрионов других видов (18 шт. из коллекции КПЧС) – *V.parahaemolyticus*, *V.alginolyticus*, *V.anguillarum*, *V.mimicus*, *V.splendidus*, *V.fluvialis*, *V.proteolyticus* и на 50 образцах фекалий людей с энтеритами различной бактериальной и вирусной этиологии. Ложноположительные, либо неспецифичные реакции не были зарегистрированы. Аналитическая чувствительность тест-системы определялась при тестировании референтных штаммов - P-1, KM-569, 10588 и 17 полевых изолятов *V.cholerae* O1 серогруппы, выделенных в 1991, 1994 и 1999 годах и 15 полевых изолятов *V.cholerae* других серогрупп, выделенных в 2000, 2001 и 2002 годах (из коллекции КПЧС) и на образцах ДНК, охарактеризованных количественно методом лимитирующих разведений ДНК, и составила 100%, и в количественном выражении - 1000 геномных эквивалентов в 1 мл тестируемого образца. Разработанная тест-система используется для проведения мониторинга открытых водоемов и сточных вод городских очистных сооружений автономной республики Крым (Украина).

В ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора совместно с РосНИПЧИ «Микроб» разработана аналогичная тест-система с гибридационно-флуоресцентной детекцией фрагментов ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-ФРВ) и после окончания амплификации – по конечной точке (ПЦР-ФКТ). Постановка реакции проводится в мультиплексном формате в двух пробирках: «Скрин» – амплификация мишеней *ctxA* (FAM), *tcpA* (EiTor) – (ROX) и ВКО (JOE) и «Тип» – амплификация мишеней *Hly* (JOE) - холерные вибрионы всех серогрупп, *wbeT* (FAM) – принадлежность к серогруппе O1, *wbeF* (ROX) – принадлежность к серогруппе O139. В эту тест-систему входят праймеры, использованные в тест-системе «АмплиСенс *V. cholerae*». Тест-система апробирована на референтных штаммах *V.cholerae* - P-1, KM-569, 10588, KM 26, M045 и изолятах, выделенных от больных в 1965 г. (Узбекистан), 1970 г. (Астрахань), 1991 г. (Украина), 1994 г. (Дагестан) и 2004 г. (Белозерск) из Государственной коллекции патогенных бактерий (РосНИПЧИ «Микроб»). Аналитическая специфичность была доказана при тестировании гетерологичных микроорганизмов других родов: *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Klebsiella*, *Listeria*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Morganella*

morganii, Enterobacter, E.coli, Aeromonas, Plesiomonas, а также вибрионов других видов – V.paragemoliticus, V.alginolyticus, V.anguillarum, V.mimicus, V.splendidus, V.fluvialis, V.proteoliticus, а также на 100 образцах фекалий людей без энтеритов и 50 образцов фекалий людей с энтеритами различной бактериальной и вирусной этиологии. Ложно-положительные, либо неспецифичные результаты не были зарегистрированы.

Отсутствие перекрестной реакции при определении принадлежности к серогруппе O1 и O139 доказано при тестировании штаммов V.cholerae из Государственной коллекции патогенных бактерий (РосНИПЧИ «Микроб»), относящихся к 66 различным серогруппам: O2-O9, O11-O14, O16-O33, O35, O36, O39-O63, O65-O69, O71, O73-O75, O77, O79-O82. Чувствительность анализа в мультиплексном формате по каждой из тестируемых мишеней составила 10 микробных клеток в ПЦР, специфичность – 100%.

Заключение

Внедрение данных тест-систем в практику здравоохранения позволит оптимизировать эпидемиологический надзор за холерой за счёт значительного снижения времени и трудоемкости исследования.