

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА
ФБУН ЦНИИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ РОСПОТРЕБНАДЗОРА
НЕКОММЕРЧЕСКОЕ ПАРТНЕРСТВО «НАЦИОНАЛЬНОЕ НАУЧНОЕ ОБЩЕСТВО ИНФЕКЦИОНИСТОВ»

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА 2014



**СБОРНИК ТРУДОВ
VIII ВСЕРОССИЙСКОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ
КОНФЕРЕНЦИИ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ**

Том II

Москва, 2014

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ
ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ «ЦЕНТРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ЭПИДЕМИОЛОГИИ» ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ
ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

НЕКОММЕРЧЕСКОЕ ПАРТНЁРСТВО «НАЦИОНАЛЬНОЕ НАУЧНОЕ ОБЩЕСТВО ИНФЕКЦИОНИСТОВ»

**VIII Всероссийская научно-практическая конференция
с международным участием**

«МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА -2014»

СБОРНИК ТРУДОВ

Под редакцией академика РАН В.И. Покровского

ГЕНЕРАЛЬНЫЙ СПОНСОР: ООО «ИнтерЛабСервис»

ТОМ II

Москва
2014

УДК 577.21
ББК 28.04
М75

СОСТАВ РЕДАКЦИОННОЙ КОЛЛЕГИИ:

Покровский В.И. (главный редактор)
Шигулин Г.А. (ответственный секретарь)
Альварес Фигероа М.В.
Астахова Т.С.
Гущин А.Е.
Жигалева О.Н.
Карандашова И.В.
Карань Л.С.
Киреев Д.Е.
Коновалов А.
Коновалов А.С.
Куевда Д.А.
Кураков С.В.
Маркелов М.Л.
Мионов К.О.
Неверов А.Д.
Подколзин А.Т.
Рыжих П.Г.
Творогова М.Г.
Чуланов В.П.
Шигулина О.Ю.
Яцышина С.Б.

М75 Молекулярная диагностика. Сб. трудов / колл.авт., под ред. В.И. Покровского. – Т. 2 – М.: ООО "Издательство МБА", 2014. – 564 с.

ISBN 978-5-906325-79-2
ISBN 978-5-906325-81-5

Во втором томе Сборника трудов конференции «Молекулярная диагностика 2014» значительное место уделено результатам исследований российских и зарубежных специалистов в области молекулярной онкологии, медицинской генетики, фармакогенетики, генетического анализа и полногеномного секвенирования (NGS).

Отдельный раздел посвящен вопросам идентификации личности и применения молекулярных методов в судебной медицине и криминалистике.

Особое внимание уделено вопросам стандартизации и управления качеством новых технологий молекулярной диагностики, в том числе с использованием современных автоматизированных решений и программно- аппаратных комплексов.

Также в сборнике рассмотрены вопросы генетического анализа сельскохозяйственных растений и перспективы применения молекулярно-биологических методов в контроле качества и безопасности продуктов питания и ветеринарии.

Для специалистов в области лабораторной диагностики и научных работников. Сборник будет интересен врачам клинической лабораторной диагностики, инфекционистам, гинекологам, урологам, дерматовенерологам, гелатологам, пульмонологам, фтизиатрам, трансфузиологам, трансплантологам, генетикам, судебно-медицинским экспертам, эпидемиологам, врачам общей практики, ветеринарным врачам, студентам медицинских и ветеринарных учебных заведений.

Издано в Российской Федерации по решению Организационного комитета VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2014».

УДК 577.21
ББК 28.04

© Коллектив авторов, 2014

ISBN 978-5-906325-81-5

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНОВ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ – КАРБАПЕНЕМАЗ НА МИКРОЧИПАХ С КОЛОРИМЕТРИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ МЕТОДОМ СЭНДВИЧ-ГИБРИДИЗАЦИИ

Побелелова Ю.И.¹, Рубцова М.Ю.¹, Эйдельштейн М.В.³, Александрова И.А.⁴, Егоров А.М.^{1,2}

¹ Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва

² Кафедра микробиологии Российской медицинской академии постдипломного образования (РМАПО), Москва

³ НИИ антимикробной химиотерапии, Смоленская государственная медицинская академия, Смоленск

⁴ Институт нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко, Москва

Введение. Бета-лактамы антибиотики с момента их открытия и до наших дней являются одними из основных антибактериальных препаратов. Возникновение и распространение резистентности бактерий к данной группе антибиотиков существенно ограничивают возможности химиотерапии инфекционных заболеваний, особенно внутрибольничных инфекций. Известно несколько механизмов устойчивости микроорганизмов к бета-лактамам антибиотикам, однако основным из них является продукция бета-лактамаз – бактериальных ферментов, гидролизующих бета-лактамное кольцо антибиотиков. Из всего многообразия бета-лактамаз в настоящее время карбапенемазы представляют собой наибольшую угрозу, так как обладают высокой каталитической активностью и широким спектром субстратной специфичности, включающим практически все классы бета-лактамов антибиотиков, в том числе и карбапенемы. Благодаря плазмидной локализации генов распространение карбапенемаз среди возбудителей инфекционных заболеваний человека происходит достаточно быстро.

Цель работы. Разработка сэндвич-варианта метода гибридного анализа на ДНК-микрочипах для определения генов карбапенемаз.

Материалы и методы. Амплификацию генов карбапенемаз проводили с помощью мультиплексной ПЦР. Гибридный анализ в сэндвич-варианте состоял из следующих стадий: на микрочипе иммобилизовали набор «улавливающих» специфических олигонуклеотидных зондов, бактериальную ДНК выделяли из клинического образца и амплифицировали, проводили гибридную ДНК-мишени с иммобилизованными «улавливающими» зондами и «детектирующими» олигонуклеотидными зондами, меченными биотином. Молекулы биотина в полученных ДНК-дуплексах выявляли с использованием конъюгата стрептавидин-пероксидаза хрена с последующей колориметрической детекцией фермента. Далее мембранные микрочипы сканировали на сканере высокого разрешения. Полученное изображение (в tiff формате) обрабатывали количественно с использованием программы Scan Array Express (PerkinElmer, version 3.0).

Основные результаты. На основе выравнивания кодирующих последовательностей генов карбапенемаз внутри VIM, IMP, OXA групп ферментов было выделено несколько подгрупп, ферменты KPC, SPM, SIM и GIM типов рассматривались как состоящие из одной подгруппы. Для проведения молекулярного дизайна «улавливающих» и «детектирующих» олигонуклеотидных зондов анализировали степень гомологии различных участков кодирующих последовательностей. В качестве групп-специфических олигонуклеотидных зондов использовали последовательности, комплементарные консервативным участкам генов, наиболее гомологичных для представителей данной группы. Выбирали по два групп-специфических зонда на каждую группу ге-

нов, комплементарных прямой и обратной цепи. Для идентификации генов на уровне подгрупп использовали участки нуклеотидных последовательностей, не содержащие мутаций внутри подгруппы, но наиболее сильно отличающие представителей данной подгруппы. Для идентификации подгрупп выбирали для дальнейшего тестирования по несколько олигонуклеотидных зондов, комплементарных разным участкам последовательностей соответствующих генов. Для того, чтобы олигонуклеотидные зонды гибридовались в фиксированном температурном диапазоне, подбирали улавливающие зонды длиной 17-27 нуклеотидов, с GC-составом 35-70%. Различие в температурах плавления для разных олигонуклеотидов составляло не более 5-10°C (температуры плавления подбирались в диапазоне 60-70°C). Структуры всех олигонуклеотидных зондов были проанализированы на возможность образования димеров и вторичных структур (шпилек).

Далее в работе проведена оптимизация условий проведения гибридного анализа. Проведен выбор оптимальной температуры гибридной реакции. Диапазон исследуемых температур 40-50°C. Наблюдали следующую закономерность: абсолютные интенсивности сигналов были выше при более низких температурах и уменьшались с увеличением температуры. При 40°C наблюдалась перекрестная гибридная реакция с фрагментами генов карбапенемаз других подгрупп. Температура 45°C была выбрана в качестве оптимальной для проведения гибридной реакции, так как аналитический сигнал при гибридной реакции всех вариантов зондов был достаточно высоким, а сигнал неспецифической гибридной реакции был низким либо отсутствовал. Мы также оптимизировали солевой состав гибридного буфера и определили, что оптимальным является использование буфера с 0,3 М хлорида натрия.

Тестирование микрочипов проводили с использованием контрольных штаммов, несущих гены известных карбапенемаз классов A, B и D. Разработанный и оптимизированный метод гибридного анализа в сэндвич-варианте (с использованием немеченой ДНК и двух олигонуклеотидных зондов) сравнили с применяемым ранее методом гибридного анализа на основе прямой схемы, основанном на взаимодействии анализируемой ДНК, меченой биотином в процессе ПЦР, с олигонуклеотидами на поверхности микрочипа. Результаты были различны в зависимости от типа генов, но в большинстве случаев для метода в сэндвич-варианте чувствительность и воспроизводимость гибридного анализа была выше.

Разработанный метод был применен для исследования клинических штаммов *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.* и *Enterobacteriaceae spp.* с различным уровнем чувствительности к карбапенемам (чувствительные или резистентные) по данным фенотипирования. Установлена хорошая

корреляция полученных результатов с данными фенотипирования. Все штаммы *Acinetobacter baumannii*, резистентные к карбапенемам, являлись продуцентами генов двух OXA-карбапенемаз (OXA-51 в сочетании с OXA-23 (1 штамм), OXA-40 (5 штаммов) и OXA-58 (4 штамма)). У всех резистентных к карбапенемам штаммов *Pseudomonas aeruginosa* был обнаружен ген металло-бета-лактамазы VIM-2 типа. При тестировании штаммов, чувствительных к бета-лактамам антибиотикам, гены БЛРС и карбапенемаз не обнаружены.

МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ИЗ УЛЬТРАЗВУКОВЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ

М.В. Патрушев, В.Е. Патрушева, Е.А. Богданов, И.Н. Доминова

ФГАОУ ВПО «Балтийский федеральный университет им. И. Канта»

Выделение нуклеиновых кислот является важнейшим этапом при проведении молекулярно-генетического анализа, как клинической, так и в других областях применения этой группы методов. Современные методы выделения и очистки ДНК, базирующиеся на использовании сорбционных способностей некоторых соединений, является наиболее перспективным с точки зрения как простоты применения, возможности автоматизации, так и экономической эффективности. Однако, используемые методы, в основе которых, в большинстве случаев, лежит либо колоночный метод, либо метод сорбции на силиконизированных магнитных частицах, не позволяют проводить исследования ультрамалых или сильно деградированных образцов.

Нами разработан метод, позволяющий выделять ДНК из ультрамалых образцов, включая одиночные клетки. В основе метода лежат созданные на базе БФУ им. И. Канта ПЦР-пробирки, внутренняя поверхность которых покрыта наноструктурированной пленкой из диоксида кремния,

Заключение. Метод сэндвич-гибридизации для одновременной идентификации семи типов (KPC, VIM, IMP, SPM, SIM, GIM, OXA) генов карбапенемаз на ДНК-микрочипах с колориметрической детекцией характеризуется хорошей точностью и производительностью. Он может быть использован в клинических микробиологических лабораториях для диагностики данного типа устойчивости микроорганизмов к карбапенемам, а также при проведении эпидемиологических исследований.

имеющей определенную поверхность, которая позволяет максимально эффективно, избирательно сорбировать нуклеиновые кислоты.

Особенностью данного метода, помимо высокой чувствительности, является совмещение процессов выделения ДНК и амплификации в одной пробирке. Кроме того, за счет уменьшения количества манипуляций, удалось сократить время, затрачиваемое на пробоподготовку и себестоимость этого процесса. Немаловажным является и тот факт, что разработанное нами изделие позволяет полностью автоматизировать процесс анализа, проводимого методами ПЦР в реальном времени таким образом, что лаборанту требуется лишь установить в автоматическую систему для выделения образцы с биологическим материалом и на последнем этапе лишь интерпретировать результат (возможно лишь для отдельных типов амплификаторов).

В настоящий момент, на базе БФУ им. И. Канта, организовано опытное производство изделий.

РАЗРАБОТКА ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ *HELICOBACTER PYLORI* В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

Бызова Н.А., Урусов А.Е., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, Россия

Контроль клеток *Helicobacter pylori* является важным элементом диагностики язвы двенадцатиперстной кишки и язвы желудка. При этом принципиальное значение имеет возможность быстрого и простого тестирования, что обуславливает интерес к иммунохроматографическим методам. Проведенные работы были направлены на создание иммунохроматографической тест-системы для детекции антигенов и клеток *Helicobacter pylori* в кале.

Для реализации иммунохроматографического анализа получены препараты коллоидного золота со средним диаметром 34 нм. Синтезированы конъюгаты нанодисперсного золота с моноклональными антителами против белковых антигенов клеток *Helicobacter pylori*. Сопоставлена антигенсвязывающая способность конъюгатов разного состава; показана оптимальность использования препарата с мольным отношением антитело : наночастица при синтезе 100:1. Охарактеризованы процессы формирования детектируемых иммунных комплексов в ходе иммунохроматографии с использованием различных мембранных носителей. Установлены условия нанесения иммунореагентов на мембраны

и их концентрации, обеспечивающие максимальную чувствительность анализа и воспроизводимость получаемых результатов. Определены режимы стабилизации иммобилизованных реагентов, показана неизменность аналитических характеристик тест-системы при хранении (не менее 12 месяцев). Для документирования результатов анализа использовали портативный видеодетектор «Рефлекс» (ООО «Синтеко-Комплекс», Москва), измеряя интенсивность окрашивания зон тест-полоски. Во внелабораторных условиях возможна достоверная визуальная оценка результатов тестирования.

Предложен режим пробоподготовки, определен состав рабочего буфера для гомогенизации проб кала. При апробации изготовленных тест-систем показана возможность определения в кале антигенов *Helicobacter pylori* в концентрациях до 100 нг/мл. Длительность анализа, включая пробоподготовку, – 10 минут. Экспрессность и методическая простота иммунохроматографии позволяют рассматривать разработанные тесты как эффективную альтернативу существующим диагностическим методам.