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

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА | 2017

IX Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА 2017

www.md2017.ru

СБОРНИК ТРУДОВ

IX ВСЕРОССИЙСКОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ

2 том

Москва, 2017 г.

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»

IX Всероссийская научно-практическая конференция

с международным участием

«МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА 2017»

СБОРНИК ТРУДОВ

Под редакцией академика РАН В.И. Покровского

ГЕНЕРАЛЬНЫЙ СПОНСОР: ООО «ИнтерЛабСервис»

ТОМ II

МОСКВА

2017

УДК 577.21
ББК 28.04
М75

СОСТАВ РЕДАКЦИОННОЙ КОЛЛЕГИИ:

Покровский В.И. (главный редактор)
Шипулин Г.А. (ответственный секретарь)
Альварес Фигероа М.В.
Астахова Т.С.
Веселкин А.А.
Гущин А.Е.
Домонова Э.А.
Карандашова И.В.
Карань Л.С.
Киреев Д.Е.
Маркелов М.Л.
Миронов К.О.
Петров В.В.
Платонов А.Е.
Подколзин А.Т.
Савочкина Ю.А.
Скачкова Т.С.
Творогова М.Г.
Хафизов К.Ф.
Чуланов В.П.
Шипулина О.Ю.
Яцышина С.Б.

М75 **Молекулярная диагностика.** Сб. трудов / колл. авт., под ред. В.И. Покровского. – Т. 2. – Тамбов: ООО фирма «Юлис», 2017. – 528 с.
ISBN 978-5-98407-011-9
ISBN 978-5-98407-013-3

Во втором томе сборника трудов конференции «Молекулярная диагностика 2017» значительное место уделено результатам исследований российских и зарубежных специалистов в области генетики мультифакторных заболеваний, полногеномного секвенирования (NGS), а также молекулярной диагностики инфекций в трансфузиологии и трансплантологии.

Отдельные главы посвящены молекулярной диагностике и эпидемиологии природно-очаговых инфекций, внутрибольничных и оппортунистических инфекций, а также вопросам антибиотикорезистентности микроорганизмов и этиологической диагностики и эпидемиологического надзора за инфекционными заболеваниями.

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

Также в сборнике рассмотрены перспективы применения молекулярно-биологических методов в контроле качества и безопасности продуктов питания и ветеринарии.

Сборник предназначен для специалистов в области лабораторной диагностики и научных работников и будет интересен врачам клинической лабораторной диагностики, инфекционистам, эпидемиологам, гинекологам, урологам, дерматовенерологам, гастроэнтерологам, гепатологам, пульмонологам, онкологам, фтизиатрам, трансфузиологам, трасплантологам, генетикам, врачам общей практики, ветеринарным врачам, студентам медицинских и ветеринарных учебных заведений.

Издано в Российской Федерации по решению Организационного комитета IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2017».

УДК 577.21
ББК 28.04

© Коллектив авторов, 2017

ISBN 978-5-98407-013-3

swine fever / Office International des Epizooties [Электронный ресурс]. – Paris, France, 2008. – 6th ed. – Режим доступа: http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.08.01_ASF.pdf. – Загл. с экрана.

3. Середа, А.Д. Белки вируса африканской чумы свиней / А.Д. Середа, Д.В. Колбасов // Научный журнал КубГАУ. – 2012. – № 77(03). – С. 21–37. – 0421200012\0181. http://ej.kubagro.ru/2012/03/pdf/48.pdf.

ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СТРИПОВАННЫХ СУХИХ ОБРАЗЦОВ

Саушкин Н.Ю., Самсонова Ж.В., Осипов А.П., Кондаков С.Э.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Москва, Россия
ООО «Иммуновед», Москва, Россия

Технология сухих пятен крови (от англ. DBS – Dried Blood Spot) в последние годы получает все более широкое распространение в медицине и ветеринарии [1]. Для получения сухих пятен образец жидкой крови по каплям наносят на специальную мембранную карточку, как правило, из целлюлозного материала и высушивают. Полученный таким образом образец обладает высокой стабильностью при хранении и транспортировке даже при комнатной температуре, что дает возможность направлять сухие образцы биологических жидкостей в диагностическую лабораторию посредством курьерской или почтовой службы без использования холодовой цепи. Для проведения анализа из мембраны специальным устройством вырезают круг определенного диаметра, с которого элюируют содержащийся на этом участке высушенный образец. Далее в полученном растворе проводят выявление исследуемых веществ стандартными аналитическими методами.

Нами был предложен новый формат пробоподготовки в виде образцов, высушенных на полосках мембраны из пористого стекловолоконного материала. Полоска входит в состав карточки-конверта, предназначенного для удобного хранения и транспортировки [2]. За счет равномерной структуры стекловолоконной мембраны биологическая жидкость под действием капиллярных сил равномерно распределяется вдоль полоски. В отличие от целлюлозы, исключаются адсорбция материала внутрь волокон и проявление хроматографического эффекта, влияющие на точность дальнейшего анализа. Для проведения анализа один или несколько участков мембраны определенной площади можно легко отделить обычными ножницами. В данном случае отпадает необходимость использования специального устройства для вырезания круга заданного диаметра из зоны с высушенным образцом. Стрипованные образцы были успешно применены для отбора, хранения и анализа сухих образцов крови методом иммуноферментного анализа (ИФА), например, для определения антител к вирусу лейкоза, вирусной диареи и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота (КРС) [3], а также для определения провирусной ДНК вируса лейкоза методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени [4]. Ниже приведены некоторые примеры апробации стрипованных сухих образцов для диагностики инфекционных заболеваний различными методами в биологических жидкостях (цельная кровь, сыворотка крови).

Инфекционный бронхит и болезнь Ньюкасла кур. Значения титров, полученных в ИФА, позволяют определить общую напряженность иммунитета стаи и оценить эффективность проведенной в птичнике вакцинации. Для выявления антител к вирусам инфекционного бронхита и болезни Ньюкасла кур методом ИФА использовали пробы нативных (жидких) и сухих стрипованных сывороток кур, доставленных из Казахстана. Корреляция значений полученных титров в сухих и жидких пробах при исследовании 144 образцов сыворотки крови составила 0,87 для инфекционного бронхита кур и 0,93 для болезни Ньюкасла.

Вирус лейкоза КРС. Определение провирусной ДНК вируса лейкоза КРС проводили с использованием метода ПЦР в режиме реального времени. Использовали жидкие образцы цельной крови и соответствующие им сухие, полученные в фермерских хозяйствах Московской области. Было показано, что использование стрипованных образцов сухой цельной крови КРС позволяет проводить эффективное выявление вируса наравне с традиционным выделением ДНК из жидких проб.

Артрит-энцефалит коз. Образцы нативной сыворотки крови и соответствующие им сухие образцы (6 из которых в виде сухой цельной крови) 92 голов мелкого рогатого скота (МРС) из мелких фермерских козоводческих хозяйств Республики Татарстан исследовали на наличие антител к антигену p28 возбудителя артрита-энцефалита коз методом ИФА. Среди образцов сыворотки было выявлено 31 отрицательный и 55 положительных, среди образцов крови – 2 отрицательных и 4 положительных. Результаты для сухих и жидких образцов были идентичны.

Токсоплазмоз (козы, кошки). Реакцию латекс-агглютинации использовали для проведения качественного теста с целью выявления антител к *возбудителю токсоплазмоза Toxoplasma gondii* в крови МРС (коз) и домашних животных (кошек). Всего исследовали 14 образцов крови/сыворотки крови коз и 13 – кошек, в жидком и стрипованном виде. Было выявлено 14 отрицательных образцов, 1 сомнительный и 11 положительных. Значения титров для всех образцов (жидких и десорбированных с мембраны) совпадали или отличались на один шаг разведения без влияния на окончательную интерпретацию результатов.

Таким образом, на примере нескольких инфекционных заболеваний было показано, что сухие стрипованные образцы могут успешно применяться для целей ветеринарной диагностики животных и птицы различны-

ми методами. В России использование высушенных в каком-либо виде образцов практически не распространено в ветеринарии, несмотря на все преимущества так называемого «сухого формата» перед жидким. Использование предложенного формата сухих стрипованных образцов является перспективным для частичной замены традиционного отбора и анализа жидких проб. Получение сухих проб биологических жидкостей в удобной стрипованной форме в местах содержания животных позволит снизить затраты на транспортировку и хранение образцов, что особенно важно для удаленных и труднодоступных районов. Во многих случаях исключается стадия отделения сыворотки, отсутствует необходимость закупки вакуумных пробирок для отбора крови и др.

Литература

1. Demirev, P.A., 2013. Dried blood spots: analysis and applications. Analytical Chemistry 85, 779–789.

2. Осипов А.П., Кондаков С.Э., Григоренко В.Г., Смоленский В.И., Прокопцева О.С., Самсонова Ж.В. Устройство для получения, хранения и транспортировки сухих образцов жидкостных объектов, предназначенных для последующего проведения лабораторного анализа. Патент РФ № 2519030.

3. Saushkin, N.Y., Samsonova, J.V., Osipov, A.P., Kondakov, S.E., Efimova, M.A., and Chernov, A.N. A new sampling format for the diagnostics of bovine infectious diseases in dried blood spots by ELISA. Moscow University Chemistry Bulletin 71, 4 (2016), 253–257.

4. Saushkin, N.Y., Samsonova, J.V., Osipov, A.P., Kondakov S.E., Khammadov N.I., Usoltsev K.V., Makaev Kh.Z., Chernov A.N. Comparison of PCR and ELISA methods for the detection of bovine leucosis in dried blood spots. Moscow University Chemistry Bulletin, Vol. 71, 5 (2016), 319–323.

РАЗРАБОТКА ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСА БОЛЕЗНИ ШМАЛЛЕНБЕРГ

Губенко О.Г., Бьядовская О.П., Кононова С.В.

ФГБУ «ВНИИЗЖ», Владимир, Россия

Введение. Болезнь Шмалленберг – малоизученная (2011 г.) трансмиссивная арбовирусная инфекция крупного рогатого скота, овец и коз всех возрастных групп, характеризующаяся абортами, мертворождением, лихорадкой, истощением, снижением удоев. Наибольший риск представляют ввозимые из Европы на территорию Российской Федерации животные [1].

В настоящее время животные, имеющие антитела к вирусу болезни Шмалленберг, выявлены уже в 18 странах Европейского союза, и существует тенденция к дальнейшему распространению инфекции [2].

Целью данной работы была разработка отечественных иммуноферментных методов комплексной диагностики болезни Шмалленберг для контроля распространения данного возбудителя на территории РФ. Для достижения поставленной цели необходимо было решить задачи по разработке непрямого «сэндвич»-варианта ИФА для выявления антигена вируса болезни Шмалленберг и конкурентного варианта ИФА для выявления антител к данному возбудителю в сыворотках крови крупного и мелкого рогатого скота.

Материалы и методы. *Вирус*. В ходе работы по очистке и концентрированию использовали вирус болезни Шмалленберг, изолят BH80/11-4 (полученный из Института Фридриха Леффлера, Германия), адаптированный в ФГБУ «ВНИИЗЖ» к перевиваемой линии культуры клеток почки сирийского хомяка (BHK-CT) и почки сайги (ПС) с титром инфекционной активности 4,0 $lgТЦД_{50}/см^3$.

Электрофорез. Для оценки степени чистоты и гомогенности концентрированного препарата вируса использовали электрофорез в 12% полиакриламидном геле (ПААГ) (Laemmli, 1970 г.).

Измерение концентрации белка. Концентрацию белка в препаратах антигена вируса болезни Шмалленберг измеряли по методу Бредфорда с использованием стандартных растворов бычьего сывороточного альбумина.

ПЦР-РВ. Для оценки специфичности очищенного вирусного антигена проводили постановку полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Нуклеиновую кислоту выделяли из 100 мкл исследуемого биологического материала с помощью набора для выделения «РИБО-сорб» («НекстБио», г. Москва) согласно инструкции изготовителя. Для выявления генома вируса Шмалленберг использовали праймеры, амплифицирующие участок S-сегмента генома.

ИФА-«IDVET». Относительную чувствительность, специфичность и точность определяли при параллельном тестировании разных выборок проб сывороток крови КРС в валидируемой тест-системе ИФА и с использованием коммерческого набора «Schmallenberg virus Competition Multi-species» IDVET (Франция) согласно инструкции производителя.

Обработка результатов. При оценке основных валидационных параметров использовали статистическую обработку и анализ полученных данных с использованием компьютерной программы «Statistica: Basic Statistic and Tables, версия 10,0».

Основные результаты. Все тестируемые в ПЦР-РВ образцы антигенов вируса болезни Шмалленберг имели пороговое значение (СТ) меньше 35 и были в диапазоне от 17 до 23 СТ, что свидетельствует о высоком содержании вируса в препаратах.

Концентрация белка в препаратах антигена вируса болезни Шмалленберг, полученная по методу Бредфорда с использованием стандартных растворов бычьего сывороточного альбумина (10, 5, 2,5 и 1,25 мкг белка) при длине волны 595 нм, составила 0,25–0,5 мг/мл.

Разработка непрямого «сэндвич»-варианта ИФА