

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.928.6-078:577.21.083

Прохватилова Е.В., Ткаченко Г.А., Леденева М.Л., Половец Н.В., Белицкая Л.И., Плеханова Н.Г., Викторов Д.В., Топорков А.В.

ПЕРСПЕКТИВА ПРИМЕНЕНИЯ В ЛАБОРАТОРНОЙ ПРАКТИКЕ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ГИСТОПЛАЗМОЗА С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, 400131, Волгоград, Российская Федерация

Разработаны наборы реагентов для клинической лабораторной диагностики гистоплазмоза методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), проведены их испытания, завершены этапы экспертизы и регистрации как медицинских изделий в Федеральной службе по надзору в сфере здравоохранения. При проведении испытаний оценены диагностические характеристики наборов реагентов для выявления ДНК возбудителя гистоплазмоза методом ПЦР с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени и с электрофоретическим учетом результатов. Критериями оценки наборов реагентов были чувствительность, специфичность (аналитическая и диагностическая), время проведения исследований и выдачи результатов. При проведении клинических испытаний установлено, что диагностическая чувствительность наборов реагентов для выявления ДНК возбудителя гистоплазмоза методом ПЦР составила $\geq 99\%$, диагностическая специфичность – $\geq 97\%$ в пробах биологического материала и объектов окружающей среды.

Ключевые слова: гистоплазмоз; грибы рода *Histoplasma*; полимеразная цепная реакция; микологический метод.

Для цитирования: Прохватилова Е.В., Ткаченко Г.А., Леденева М.Л., Половец Н.В., Белицкая Л.И., Плеханова Н.Г., Викторов Д.В., Топорков А.В. Перспектива применения в лабораторной практике наборов реагентов для диагностики гистоплазмоза с помощью полимеразной цепной реакции. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62 (7): 426-431. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-7-426-431>

Prokhvatilova E.V., Tkachenko G.A., Ledeneva M.L., Polovetz N.V., Belitskaya L.I., Plekhanova N.G., Viktorov D.V., Toporkov A.V.

THE PERSPECTIVE OF APPLICATION OF SETS OF REAGENTS FOR DIAGNOSTIC OF HISTOPLASMOSIS USING POLYMERASE CHAIN REACTION IN LABORATORY PRACTICE

The Volgogradskii research institute anti-plague institute of Rospotrebnadzor, 400131 Volgograd, Russia

The reagents' kits are developed for clinical laboratory diagnostic of hystoplasmosis using polymerase chain reaction technique. The kits were tested. The stages of expertise and registration as medical articles in the Federal service of control in sphere of health care were terminated. During testing the evaluation was implemented concerning diagnostic characteristics of reagents' kits for detecting DNA of agent of histoplasmosis using polymerase chain reaction with fluorescent detection in real-time operation mode and with electrophoresis control of results. The evaluation criteria of reagents' kits were sensitivity, analytical and diagnostic specificity, time of testing implementation and producing of results. During clinical testing, it is established that diagnostic sensitivity of reagents' kits for detection of DNA of agent of histoplasmosis using polymerase chain reaction made up to $\geq 99\%$, diagnostic specificity - $\geq 97\%$ in samples of biological material and objects of environment.

Key words: histoplasmosis; fungi genus *Histoplasma*; polymerase chain reaction; micological method

For citation: Prokhvatilova E.V., Tkachenko G.A., Ledeneva M.L., Polovetz N.V., Belitskaya L.I., Plekhanova N.G., Viktorov D.V., Toporkov A.V. The perspective of application of sets of reagents for diagnostic of histoplasmosis using polymerase chain reaction in laboratory practice. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (7): 426-431. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-7-426-431>

For correspondence: Prokhvatilova E.V., candidate of medical sciences, associate professor, the head of department of biological and technological control. e-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 25.01.2017
Accepted 30.01.2017

Введение. Гистоплазмоз – самый распространенный особо опасный микоз, поражающий преимущественно

но ретикулоэндотелиальную систему, с вовлечением в процесс различных внутренних органов (легких, печени, селезенки, надпочечников, сердца, лимфатических узлов и др.). Возбудитель заболевания – диморфный микромицет *Histoplasma capsulatum*, который относится к микроорганизмам II группы па-

Для корреспонденции: Прохватилова Елена Валерьевна, канд. мед. наук, доц., зав. отделом биологического и технологического контроля; e-mail: vari2@sprint-v.com.ru

тогенности. Известны три варианта *H. capsulatum*, отличающиеся по географическому распространению, морфологическим признакам, особенностям клиники заболевания. Различия трех вариантов *H. capsulatum* var. *capsulatum*, *H. capsulatum* var. *Duboisii*, *H. capsulatum* var. *farcinosum* выявлены и при секвенировании спейсерных областей рибосомальных генов (*ITS1–5.8S rDNA – ITS2*) [1, 8–10].

Наиболее высокую заболеваемость населения гистоплазмозом регистрируют в Северной, Центральной, Южной Америке. Гистоплазмоз эндемичен для стран Африканского континента. В Южно-Африканской Республике встречается только *H. capsulatum* var. *capsulatum*. В странах Западной, Восточной, Центральной Африки обнаружены оба варианта возбудителя – *H. capsulatum* var. *capsulatum* и *H. capsulatum* var. *duboisii*. Возбудитель выделялся от больных в некоторых азиатских странах (Индонезия, Вьетнам, Таиланд, Пакистан, Китай, Индия, Иран, Турция, Япония), Австралии, ряде стран Европы. Случаи заболевания гистоплазмозом, как правило, связаны с посещением эндемичных регионов [4, 6, 7].

Достоверных сведений о случаях заболевания гистоплазмозом в России нет. Учитывая интенсивное развитие туристических, миграционных, торговых, транспортных связей между странами, весьма вероятно возможность завоза заболевания на территорию Российской Федерации [1, 5].

В естественных условиях *H. capsulatum* обитает во влажной почве, обогащенной остатками растительного или животного происхождения. Чаще всего болезнь возникает при ингаляции почвенной пыли, содержащей фрагменты мицелия или конидии, которые при вдыхании попадают в дистальные отделы легких, где через 2–7 дней происходит конверсия в тканевую форму гриба. В редких случаях гриб может проникать в организм через поврежденные кожные покровы. Наибольшему риску заражения и развития тяжелых форм гистоплазмоза подвергаются иммунокомпрометированные люди [7, 8]. Уровень смертности при гистоплазмозе невысокий, в большинстве случаев заболевание разрешается самопроизвольно, но у иммунокомпрометированных и у ВИЧ-инфицированных смертность составляет 7–23% [1, 3].

В Международной статистической классификации болезней и проблем, связанных со здоровьем (2003), нозологические формы гистоплазмоза отнесены в раздел В39 (острая хроническая легочная инфекция, диссеминированный гистоплазмоз, гистоплазмоз неуточненный, ВИЧ-ассоциированные инфекции и др.). Спектр клинических проявлений гистоплазмоза неспецифичен и широко варьирует от бессимптомной инфекции до острого скоротечного или хронического микоза с образованием полостей в легких и длительным течением, что в значительной мере затрудняет его диагностику [1].

В Российской Федерации действует приказ Роспотребнадзора № 88 от 17.03.2008 г. «О мерах по совершенствованию мониторинга за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней» (в их перечень включен гистоплазмоз). В соответствии

с данным приказом на базе Волгоградского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора функционирует референс-центр по мониторингу возбудителей глубоких микозов (далее – референс-центр), который оказывает научную, консультативно-методическую и практическую помощь учреждениям Роспотребнадзора и медицинским организациям.

Совершенствование методов диагностики глубоких микозов – одно из важных направлений деятельности референс-центра, в задачи которого входит проведение научно-исследовательских работ по изучению структуры и биологических свойств микромицетов, разработке наборов реагентов, обеспечивающих выявление возбудителей глубоких микозов во внешней среде и в организме больных людей с высокой чувствительностью и специфичностью.

Цель исследования – разработка, испытание и внедрение в лабораторную практику новых диагностических наборов реагентов для выявления ДНК возбудителя гистоплазмоза методом ПЦР.

Материал и методы. Наборы реагентов для диагностики *in vitro* гистоплазмоза. «Набор реагентов для выявления ДНК микромицетов рода *Histoplasma* методом ПЦР с флуоресцентной детекцией «АмплигенГисто-РВ» (далее – «АмплигенГисто-РВ»). «Набор реагентов для выявления ДНК микромицетов рода *Histoplasma* методом ПЦР «АмплигенГисто-ЭФ» с электрофоретическим учетом результатов (далее – «АмплигенГисто-ЭФ»). Область применения МИ – клиническая лабораторная диагностика, эпидемиологический мониторинг.

Штаммы микроорганизмов получали из лаборатории коллекционных штаммов микроорганизмов Волгоградского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора.

Для постановки ПЦР с наборами «АмплигенГисто-РВ» и «АмплигенГисто-ЭФ» использовали 38 штаммов возбудителей гистоплазмоза и гетерологичных микроорганизмов: 15 штаммов *H. capsulatum* var. *capsulatum*, 4 штамма *H. capsulatum* var. *duboisii*, 1 штамм *H. capsulatum* var. *farcinosum*, 3 штамма *Blastomyces dermatitidis*, 3 штамма *Coccidioides immitis*, 3 штамма *Coccidioides posadasii*, 2 штамма *Paracoccidioides brasiliensis*, 1 штамм *Penicillium citreoviridae*, 1 штамм *Penicillium citrinum*, 1 штамм *Cryptococcus neoformans*, 1 штамм *Geotrichum immitis*, 1 штамм *Aspergillus fumigatus*, 1 штамм *Candida kruissi*, 1 штамм *Pseudomonas aeruginosa*.

Для оценки диагностической чувствительности «АмплигенГисто-РВ» и «АмплигенГисто-ЭФ» отобраны чистые культуры микромицетов (суспензии в концентрации $1 \cdot 10^4$ кл./мл), пробы клинического материала: кровь, мокрота человека, суспензии органов мелких млекопитающих (печень, селезенка, легкие), пробы объектов окружающей среды (вода открытых водоемов, почва, смывы с поверхности), искусственно контаминированные *H. capsulatum* var. *capsulatum* 6652, *H. capsulatum* var. *duboisii* B-630, *H. capsulatum* var. *farcinosum* 12–89, *C. neoformans* 9/22 до конечной концентрации $1 \cdot 10^4$ кл./мл.

Работу проводили в соответствии с СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)», МУ 1.3.2569–09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности» (Москва, 2009), опыты с животными проводили с соблюдением основных требований «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ МЗ СССР от 12.08.1977 № 755).

Пробоподготовка для ПЦР. При анализе чистых культур методом ПЦР культивирование микромицетов в дрожжевой форме осуществляли в пробирках на мясо-пептонном агаре, содержащем 5% цистеина и 5% дефибринированной крови, в течение 7–14 сут при 37 ± 1 °C. Культуры гетерологичных нитчатых микромицетов – на среде Сабуро при 28 ± 1 °C в течение 14–30 сут. Исследуемые грибы, выросшие на плотных питательных средах, суспендировали в 0,9% стерильном растворе натрия хлорида. После обеззараживания мертиолятом натрия (до конечной концентрации 1:1000), проводили подсчет дрожжевых клеток исходных взвесей в камере Горяева. Конечная концентрация взвеси соответствовала средней арифметической подсчетов из нескольких разведений. Затем суспензии микромицетов разводили в 0,9% стерильном растворе натрия хлорида, рН $7,2 \pm 0,1$ до концентрации $1 \cdot 10^4$ кл/мл, а взвеси гетерологичных микроорганизмов до $1 \cdot 10^7$ кл/мл.

Каждый образец исследуемой пробы был объемом не менее 0,5 мл. Все пробы до постановки опыта хранились при температуре -18 °C, во время опыта при $+4$ °C, но не более 3 сут. Выделение ДНК осуществляли путем гуанидинтиоцианат-фенольной экстракции с последующим осаждением ДНК изопропанолом с необходимыми модификациями [2, 3]. Все пробы одновременно исследованы методом ПЦР с применением испытываемых наборов реагентов и микологическим методом.

Проведение ПЦР. Постановку ПЦР осуществляли с использованием амплификаторов «Терцик» (ЗАО «НПФ ДНК-технология», Россия), Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) с наборами реагентов «АмплигенГисто-ЭФ» и «АмплигенГисто-РВ» соответственно. В случае электрофоретической детекции продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле и визуализировали окрашиванием бромистым этидием. Детекцию результатов ПЦР в режиме реального времени осуществляли путем измерения интенсивности флуоресцентных сигналов при накоплении ампликонов. Учет результатов проводили на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией.

Для сравнения использован микологический метод исследования микромицетов в соответствии с СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)». Для этого культивирование *H. capsulatum*, *C. immitis*, *C. posadasii* и других микромицетов осуществляли

в пробирках на плотной питательной среде Сабуро, содержащей 5% левомецитина, рН $6,8 \pm 0,2$ и инкубировали при температуре 28 ± 1 °C в течение 30–45 сут. Конверсию в дрожжевую фазу возбудителя гистоплазма осуществляли на мясо-пептонном агаре, содержащем 5% цистеина и 5% дефибринированной крови, в течение 7–14 сут при 37 °C. Учет и интерпретацию результатов проводили визуально по наличию характерных морфологических структур микромицетов.

P. aeruginosa выращивали на чашках Петри с агаром Хоттингера рН $7,2 \pm 0,1$, инкубировали в течение 24–48 ч при температуре 37 ± 1 °C, после чего смывали и инактивировали добавлением раствора мертиолята натрия до конечной концентрации 0,01 мг/мл (1:10 тыс.) с последующим прогреванием 30 мин при 56 ± 1 °C.

Статистическую обработку результатов клинических испытаний проводили в соответствии с «Методическими рекомендациями по порядку проведения экспертизы качества, эффективности и безопасности медицинских изделий» (2013). Статистическую достоверность полученных результатов испытаний оценивали в зависимости от числа параллельных опытов при доверительной вероятности 90%, используя формулу биномиального распределения Бернулли.

Результаты и обсуждение. Наиболее значим для оперативной диагностики гистоплазма метод ПЦР, который позволяет напрямую выявлять возбудителя в исследуемых пробах в минимальном количестве, получить предварительный результат через 4–6 ч от момента исследования, своевременно верифицируя клинический диагноз [3, 6, 10]. Специалистами референс-центра разработаны два набора реагентов: «АмплигенГисто-РВ», «АмплигенГисто-ЭФ», предназначенные для экспресс-обнаружения ДНК возбудителей гистоплазма в пробах клинического материала и из объектов окружающей среды, чистых культурах методом ПЦР с флуоресцентной и электрофоретической детекцией соответственно. При конструировании наборов этап выбора специфического фрагмента в качестве ДНК-мишени и подбор праймеров играл важнейшую роль в специфичности проведения амплификации. Праймеры, сконструированные на основе фрагментов гена *MS8 (mold-specific MS8 protein)*, кодирующего белок *H. capsulatum*, обеспечивали специфичную амплификацию фрагмента ДНК и высокую чувствительность ПЦР.

Установлено, что набор реагентов «АмплигенГисто-РВ» позволяет выявлять с помощью ПЦР ДНК возбудителей гистоплазма *H. capsulatum var. capsulatum*, *H. capsulatum var. duboisii*, *H. capsulatum var. farciminosum*. Детекция результатов осуществляется путем измерения интенсивности флуоресцентных сигналов непосредственно в процессе ПЦР-РВ. По каналу ROX/Orange детектируется продукт амплификации ДНК *H. capsulatum*. По каналу Cy5/Red детектируется продукт амплификации ВКО (внутреннего контрольного образца). В случае детекции результатов ПЦР с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле набор реагентов «АмплигенГисто-ЭФ» позволяет выявлять ДНК *H. capsulatum var.*

capsulatum, *H. capsulatum* var. *duboisii*, *H. capsulatum* var. *farciminosum* на основании амплификации фрагмента гена *MS8* (*mold-specific MS8 protein*) размером 361 п. н. Результаты учитывали на основании наличия или отсутствия на электрофореграмме специфических полос амплифицированной ДНК.

При проведении контрольных лабораторных испытаний медицинских изделий подтверждены заявленные разработчиками функциональные характеристики «АмплигенГисто-РВ» и «АмплигенГисто-ЭФ». В ПЦР с использованием данных наборов реагентов показатель аналитической чувствительности для микромицетов рода *Histoplasma* составил $1 \cdot 10^4$ кл/мл, для гетерологичных микроорганизмов аналитическая специфичность была $1 \cdot 10^7$ кл/мл.

Для подтверждения нормированных технических характеристик медицинских изделий (МИ) и согласования нормативно-эксплуатационных документов проведены в 2013 г. технические испытания МИ испытательной лабораторией на базе кафедры клинической лабораторной диагностики ДПО РМАПО Минздрава России. Установлено, что наборы реагентов «АмплигенГисто-РВ», «АмплигенГисто-ЭФ» могут быть использованы для проведения клинической диагностики гистоплазмоза. В результате технических испытаний согласованы вид МИ и класс потенциального риска применения МИ в соответствии с номенклатурной классификацией МИ, утвержденной приказом Минздрава России от 06.06.2012 г. «Об утверждении номенклатурной классификации медицинских изделий».

В ходе испытаний проведены анализ и доработка технической и эксплуатационной документации на МИ, оценка и анализ данных, относящихся к безопасности их применения, оформлен акт технических испытаний. Полученные результаты эксперты оценивали как положительные, подтвердили качество и безопасность применения перечисленных наборов реагентов для диагностики *in vitro* гистоплазмоза.

В 2015 г. наборы реагентов представлены в качестве медицинских изделий к государственной регистрации Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения. Регистрировали МИ на основании экспертизы представленных документов, результатов технических и клинических испытаний, представляющих собой формы оценки соответствия МИ по классам в зависимости от потенциального риска их применения, экспертизы качества, эффективности и безопасности в соответствии с Правилами государственной регистрации медицинских изделий, утвержденными Постановлением Правительства Российской Федерации от 27.12.12 № 1416.

При проведении клинических испытаний с целью контроля чувствительности «АмплигенГисто-РВ» при анализе 208 проб, содержащих микромицеты рода *Histoplasma* в концентрации $1 \cdot 10^4$ кл/мл (100 проб суспензий микромицетов и 108 проб клинического, биологического материала, объектов окружающей среды), получен положительный результат в 100%; а в 90 пробах, содержащих гетерологичные микроорганизмы в концентрации $1 \cdot 10^4$ кл/мл (72 пробы суспензий микромицетов и 18 проб клинического,

биологического материала, объектов окружающей среды), – отрицательный результат в 100% случаев. Внутрипостановочную и межсерийную воспроизводимость для всех положительных образцов оценивали в двух повторах и на двух сериях МИ, и она составила 100%.

При проведении клинических испытаний доказана диагностическая эффективность МИ «АмплигенГисто-РВ»: диагностическая чувствительность $\geq 99\%$ с доверительной вероятностью 90% при анализе 208 проб, содержащих суспензии микромицетов рода *Histoplasma* в концентрации $1 \cdot 10^4$ кл/мл; диагностическая специфичность $\geq 97\%$ с доверительной вероятностью 90% при анализе 208 проб, содержащих суспензии микромицетов рода *Histoplasma* в концентрации $1 \cdot 10^4$ кл/мл и 90 проб, содержащих гетерологичные микроорганизмы в концентрации $1 \cdot 10^4$ кл/мл.

При проведении клинических испытаний с целью контроля чувствительности МИ «АмплигенГисто-ЭФ» при анализе 208 проб, содержащих микромицеты рода *Histoplasma* в концентрации $1 \cdot 10^4$ кл/мл (100 проб суспензий микромицетов и 108 проб клинического, биологического материала, объектов окружающей среды), получен положительный результат в 100%; в 90 пробах, содержащих гетерологичные микроорганизмы в концентрации $1 \cdot 10^4$ кл/мл (72 пробы суспензий микромицетов и 18 проб клинического, биологического материала, объектов окружающей среды) – отрицательный результат в 100% случаев. Внутрипостановочную и межсерийную воспроизводимость для всех положительных образцов оценивали в двух повторах и на двух сериях МИ, и она составила 100%.

При проведении клинических испытаний доказана диагностическая эффективность МИ «АмплигенГисто-ЭФ»: диагностическая чувствительность $\geq 99\%$ с доверительной вероятностью 90% при анализе 208 проб, содержащих суспензии микромицетов рода *Histoplasma* в концентрации $1 \cdot 10^4$ кл/мл; диагностическая специфичность – не менее 97% с доверительной вероятностью 90% при анализе 208 проб, содержащих суспензии микромицетов рода *Histoplasma* в концентрации $1 \cdot 10^4$ кл/мл и 90 проб, содержащих гетерологичные микроорганизмы в концентрации $1 \cdot 10^4$ кл/мл.

Результаты клинических испытаний, сводные данные по эффективности (чувствительности и специфичности) наборов реагентов представлены в таблице.

Поскольку аналогов названным наборам реагентов, зарегистрированным на территории Российской Федерации, не существует, испытания проводили без использования препарата для сравнения.

После завершения регламентированной процедуры государственной регистрации Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения в 2016 г. принято решение о регистрации МИ, оформлены регистрационные удостоверения и разрешены производство, реализация и использование в медицинской лабораторной практике.

Заключение. Разработка и внедрение в практику

Выявление ДНК микромицетов рода *Histoplasma* в ПЦР с использованием наборов реагентов «АмплигенГисто-РВ» и «АмплигенГисто-ЭФ»

Наименование проб	Число проб	Положительный ответ в ПЦР «АмплигенГисто-РВ», %		Положительный ответ в ПЦР «АмплигенГисто-ЭФ», %		Микологический метод
		серия 1/15	серия 2/15	серия 3/15	серия 4/15	
Пробы, содержащие суспензии <i>H. capsulatum</i> в концентрации $1 \cdot 10^4$ кл/мл	50	100	100	100	100	50
Пробы биологического материала, содержащие <i>H. capsulatum</i> в концентрации $1 \cdot 10^4$ кл/мл	30	100	100	100	100	30
Пробы объектов окружающей среды, содержащие <i>H. capsulatum</i> в концентрации $1 \cdot 10^4$ кл/мл	24	100	100	100	100	24
Итого положительных проб, содержащих <i>H. capsulatum</i> в концентрации $1 \cdot 10^4$ кл/мл	104*	100	100	100	100	104*
Пробы, содержащие <i>B. dermatitidis</i>	6	0	0	0	0	6
Пробы, содержащие <i>C. immitis</i>	6	0	0	0	0	6
Пробы, содержащие <i>C. posadasii</i>	6	0	0	0	0	6
Пробы, содержащие <i>P. brasiliensis</i>	4	0	0	0	0	4
Пробы, содержащие <i>P. citreoviridae</i>	2	0	0	0	0	2
Пробы, содержащие <i>P. citrinum</i>	2	0	0	0	0	2
Пробы, содержащие <i>C. neoformans</i>	2	0	0	0	0	2
Пробы, содержащие <i>G. immitis</i>	2	0	0	0	0	2
Пробы, содержащие <i>A. fumigatus</i>	2	0	0	0	0	2
Пробы, содержащие <i>C. kruissi</i>	2	0	0	0	0	2
Пробы, содержащие <i>P. aeruginosa</i>	2	0	0	0	0	2
Пробы биологического материала, содержащие <i>C. neoformans</i>	5	0	0	0	0	5
Пробы объектов окружающей среды, содержащие <i>C. neoformans</i>	4	0	0	0	0	4
Итого отрицательных	45*	0	0	0	0	45*

Примечание. * – образцы анализировали в двух повторах.

здравоохранения новых диагностических и индикаторных наборов реагентов, обеспечивающих с высокой чувствительностью и специфичностью выявление возбудителей особо опасных микозов в организме больных людей и окружающей среде, развитие научно-производственной деятельности, ориентированной на выпуск эффективных и надежных диагностических наборов отечественного производства, своевременное представление информации для специалистов медицинских организаций о новых зарегистрированных микологических наборах – важные направления деятельности референс-центра по мониторингу возбудителей глубоких микозов, созданного базе Волгоградского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора.

Разработанные специалистами референс-центра наборы реагентов для диагностики *in vitro* гистоплазмоза методом ПЦР обеспечивают обнаружение и идентификацию возбудителя заболевания в кратчайшие сроки, что особенно важно в условиях чрезвычайных ситуаций, вызванных выявлением случаев особо опасных инфекций. Эти наборы предложены для применения в лабораториях различного уровня на этапах клинической лабораторной диагностики гистоплазмоза.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки. Выполнено в рамках государственной НИР 054-5-10 и отраслевой научно-исследовательской программы «Научные исследования и разработки с целью обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия и снижения инфекционной заболеваемости в Российской Федерации» (НИР 065-5.2-11, НИР 067-6.7-11).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Малеев В.В., ред. *Особо опасные микозы*. Волгоград: Волга-Паблицер; 2013.
2. Вьючнова Н.В., Ткаченко Г.А., Гришина М.А., Савченко С.С., Антонов В.А., Липницкий А.В. Сравнительный анализ методов выделения ДНК из клеток *Histoplasma capsulatum* Darling. *Проблемы медицинской микологии*. 2009; 11 (3): 38–42.
3. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., ред. *Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: Практическое руководство*. 2-е изд., переработанное и дополненное. М.: ЗАО «Шико»; 2013.
4. Кашкин П.Н., Лисин В.В. *Практическое руководство по медицинской микологии*. Л.: Медицина; 1983.
5. Попова А.Ю., Топорков А.В., Липницкий А.В., Половец Н.В., Викторов Д.В. Распространение в мире особо опасных микозов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2016; 3: 120–6.

6. Cano M., Hajjeh R. A. The epidemiology of histoplasmosis: a review. *Semin. Respir. Infect.* 2001; 16: 109–18.
7. Cimponeriu D., LoPresti P., Lavelanet M. Gastrointestinal histoplasmosis in HIV infection: two cases of colonic pseudocancer and review of the literature. *Am. J. Gastroenterol.* 1994; 89 (1): 129–31.
8. Kasuga T., Taylor J.W., White T.J. Phylogenetic relationships of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* Darling. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37 (3): 653–63.
9. Kasuga T., White T.J., Koenig G. et al. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Molecular. Ecology.* 2003; 12: 3383–401.
10. Kauffman C.A. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. *Clin. Microbiol. Rev.* 2007; 20 (1): 115–32.

REFERENCES

1. Maleev V.V., ed. *Especially Dangerous Mycoses. [Osobo opasnye mikozy]*. Volgograd: Volga-Publisher; 2013. (in Russian)
2. V'yuchnova N.V., Tkachenko G.A., Grishina M.A., Savchenko S.S., Antonov V.A., Lipnitskiy A.V. The comparative analysis of DNA extraction methods from *Histoplasma capsulatum* Darling cells. *Problemy meditsinskoy mikologii.* 2009; 11 (3): 38–42. (in Russian)
3. Onishchenko G.G., Kutuyev V.V., eds. *Laboratory diagnosis of dangerous infectious diseases. Practical Guidance. [Laboratornaya diagnostika opasnykh infektsionnykh bolezney: Prakticheskoe ru-*

- kovodstvo]*. 2st ed. processed and added. Moscow: Shiko; 2013. (in Russian)
4. Kashkin P.N., Lisin V.V. *Practical Guidance on a Medical Mycology. [Prakticheskoe rukovodstvo po meditsinskoy mikologii]*. Leningrad: Meditsina; 1983. (in Russian)
5. Popova A.Yu., Toporkov A.V., Lipnitskiy A.V., Polovets N.V., Viktorov D.V. Distribution in the world of especially dangerous mycoses. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2016; 3: 120–6. (in Russian)
6. Cano M., Hajjeh R. A. The epidemiology of histoplasmosis: a review. *Semin. Respir. Infect.* 2001; 16: 109–18.
7. Cimponeriu D., LoPresti P., Lavelanet M. Gastrointestinal histoplasmosis in HIV infection: two cases of colonic pseudocancer and review of the literature. *Am. J. Gastroenterol.* 1994; 89 (1): 129–31.
8. Kasuga T., Taylor J.W., White T.J. Phylogenetic relationships of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* Darling. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37 (3): 653–63.
9. Kasuga T., White T.J., Koenig G. et al. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Molecular. Ecology.* 2003; 12: 3383–401.
10. Kauffman C.A. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. *Clin. Microbiol. Rev.* 2007; 20 (1): 115–32.

Поступила 25.01.17
Принята к печати 30.01.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.157-078:577.21.083

Щуплова Е.А., Черкасов С.В., Плотников А.О.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА FISH ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ БАКТЕРИЙ, ЛОКАЛИЗОВАННЫХ НА ПОВЕРХНОСТИ И ВНУТРИ ЭРИТРОЦИТОВ

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, 460000, Оренбург, Россия

Проникновение бактерий внутрь эукариотических клеток – широко распространенное явление. В последнее время описана способность различных микроорганизмов проникать внутрь эритроцитов, что часто приводит к развитию бактериемии и сепсиса. Существуют разные методы обнаружения бактерий в кровотоке, характеризующиеся различной эффективностью и длительностью процедуры. Общепринятые микробиологические методы диагностики длительны и ограничены в выявлении некультивируемых форм микроорганизмов. Существуют молекулярно-генетические методы диагностики бактериемии и сепсиса, позволяющие сокращать время проведения исследований и выявлять широкий спектр микроорганизмов. Цель данного исследования – разработка оптимального протокола флуоресцентной *in situ* гибридизации для изучения взаимодействия бактерий с эритроцитами. Представлены результаты применения молекулярно-генетического метода FISH, адаптированного для выявления бактерий, расположенных на поверхности и внутри эритроцитов. Разработан оптимальный протокол фиксации эритроцитов, исключающий их лизис, на основе тестирования разных видов антикоагулянтов и концентраций фиксирующих растворов. Подобраны температурный режим и оптимальное время гибридизации образцов с флуоресцентными зондами, мечеными FITC. С помощью люминесцентной и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии по характерному свечению обнаружены адгезия и внутриэритроцитарная локализация бактерий в исследуемых образцах крови. При использовании FISH время исследования сокращается до 8–12 ч. Одновременно проводят идентификацию микроорганизмов, так как ДНК и рРНК бактерий гибридизуется с ДНК-зондами, комплементарными таксон-специфическим участкам гена 16S рРНК. Другое преимущество FISH – возможность проведения лабораторной диагностики бактериемии и сепсиса в образцах крови больных без выделения гемокультуры.

Ключевые слова: бактерии; эритроциты; внутриклеточное паразитирование; ДНК-зонд; FISH; диагностика; бактериемия; сепсис.

Для цитирования: Щуплова Е.А., Черкасов С.В., Плотников А.О. Применение метода FISH для выявления бактерий, локализованных на поверхности и внутри эритроцитов. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2017; 62 (7): 431–435. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-7-431-435>

Schuplova E.A., Cherkasov S.V., Plotnikova A.O.

THE APPLICATION OF FISH TECHNIQUE FOR DETECTION OF BACTERIA LOCALIZED ON THE SURFACE AND WITHIN ERYTHROCYTES

The institute of cellular and intracellular symbiosis of the Ural branch of the Russian academy of sciences, 460000 Orenburg, Russia

Для корреспонденции: Щуплова Елена Алексеевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. экологии микроорганизмов; e-mail: Khanina83@yandex.ru