

## КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Лемасова Л.В., Ткаченко Г.А., Прохвятилова Е.В., Белицкая Л.И., Викторов Д.В., Топорков А.В.

### ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛАБОРАТОРНОЙ ПРАКТИКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ САПА И МЕЛИОИДОЗА С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, 400131, Волгоград, Россия

*Для диагностики in vitro разработан набор реагентов «АмплигенBurk-mallei/pseudomallei-РВ» для выявления и дифференциации ДНК возбудителей сапа и мелиоидоза методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени в биологическом (клиническом) материале и культурах микроорганизмов, объектах окружающей среды, твердых пищевых продуктах (рис). В клинических испытаниях изучена диагностическая ценность набора реагентов «АмплигенBurk-mallei/pseudomallei-РВ». Установлена высокая аналитическая чувствительность ( $1 \times 10^3$  м.к./мл) и специфичность 100% ПЦР-РВ с разработанным набором вне зависимости от вида исследуемого материала. Диагностическая чувствительность ПЦР-РВ при применении набора реагентов составила не менее 98,0% и специфичностью не менее 99%. Завершены этапы государственной экспертизы, получено регистрационное удостоверение в Росздравнадзоре, разрешены производство, реализация и применение МИ в медицинской лабораторной практике.*

**Ключевые слова:** набор реагентов; сап; мелиоидоз; полимеразная цепная реакция в реальном времени.

**Для цитирования:** Лемасова Л.В., Ткаченко Г.А., Прохвятилова Е.В., Белицкая Л.И., Викторов Д.В., Топорков А.В. Оценка возможности применения в лабораторной практике набора реагентов для диагностики сапа и мелиоидоза с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (11): 700-704. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-11-700-704>

Lemasova L.V., Tkachenko G.A., Prokhvatilova E.V., Belitskaya L.I., Viktorov D.V., Toporkov A.V.

#### ASSESSMENT OF THE POSSIBILITY OF APPLICATION IN LABORATORY PRACTICE OF REAGENT KIT FOR DIAGNOSIS OF GLANDERS AND MELIOIDOSIS BY REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION

Federal Government Health Institution «Volgograd Research Institute for Plague Control» of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-being, 400131, Volgograd, Russia

*The reagent kit AmpligenBurk-mallei/pseudomallei-RT PCR is designed for detecting in vitro diagnostics and differentiate the DNA of glanders and melioidosis pathogens by real-time multiplex PCR in biological (clinical) material and cultures of microorganisms, as well as environmental objects and solid food products (rice). During clinical testing diagnostic value of reagent kit AmpligenBurk-mallei/pseudomallei-RT PCR has been studied. Based on the results obtained, a high analytical sensitivity ( $1 \times 10^3$  microbe cells/ml) and specificity (100%) of PCR-RT with the developed reagent kit were established, regardless of the type of material being studied. The diagnostic sensitivity of PCR-RT using a set of reagents was at least 98.0% and specificity at least 99%. The stages of state examination have been completed, a registration certificate has been obtained at Roszdravnadzor, production, sale and use of reagent kit in medical laboratory practice have been permitted.*

**Key words:** reagent kit; glanders; melioidosis; real-time polymerase chain reaction.

**For citation:** Lemasova L.V., Tkachenko G.A., Prokhvatilova E.V., Belitskaya L.I., Viktorov D.V., Toporkov A.V. Assessment of the possibility of application in laboratory practice of reagent kit for diagnosis of glanders and melioidosis by real-time polymerase chain reaction. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)/ 2019; 64 (11): 700-704. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-11-700-704>

**For correspondence:** Lemasova L.V., candidate of medical sciences, scientific collaborator of the laboratory of genodiagnostics; e-mail: [vari2@sprint-v.com.ru](mailto:vari2@sprint-v.com.ru)

#### Information about authors:

Lemasova L.V., <https://orcid.org/0000-0003-3256-5025>  
Tkachenko G.A., <http://orcid.org/0000-0003-0199-3342>  
Prokhvatilova E.V., <http://orcid.org/0000-0001-9947-7711>  
Belickaya L.I., <http://orcid.org/0000-0002-1803-9443>  
Viktorov D.V., <http://orcid.org/0000-0002-2722-7948>  
Toporkov A.V., <http://orcid.org/0000-0002-3449-4657>

**Acknowledgment.** The study had no sponsor support.

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

Received 26.09.2019  
Accepted 10.10.2019

**Введение.** Высокопатогенные для человека и различных видов животных возбудители *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei* вызывают особо опасные инфекционные заболевания – сап и мелиоидоз. В связи с тяжёлым течением заболеваний, сложностью постановки диагноза на основании клинических симптомов, высокой летальностью, отсутствием специфических препаратов для профилактики остается актуальной проблема совершенствования средств диагностики *B. mallei* и *B. pseudomallei*. Возбудители обладают близким антигенным родством и высокой степенью сходства геномов *B. mallei* и *B. pseudomallei*. Вследствие этого возникают сложности конструирования диагностических препаратов, позволяющих дифференцировать патогенные буркхольдерии [1, 2].

К середине XX века сап ликвидирован на территориях многих стран мира, в том числе России и США, но в настоящее время его относят к «возвращающимся» инфекциям, поскольку отмечается тенденция к увеличению частоты возникновения эпизоотий и расширение его ареала. Эндемичными территориями считают Иран, Бразилию, Индию, Монголию, в ряде стран (Турция, Германия, Объединенные Арабские Эмираты) регистрируют единичные случаи сапа у сельскохозяйственных и диких животных. В естественных условиях резервуаром и источником инфекции являются больные животные (лошади, ослы, верблюды, мулы) [2-5].

Мелиоидоз распространён в тропических и субтропических областях Западной и Центральной Африки, Южной и Юго-Восточной Азии, Центральной и Южной Америки, в Северо-Восточной Австралии, где возбудитель входит в состав микробиоты почвы и воды стоячих водоёмов. Заболеваемость мелиоидозом в мире составляет порядка 165 тыс. случаев ежегодно, уровень смертности, достигает 58%, что сопоставимо со смертностью от кори. Многообразие клинических проявлений, бессимптомное течение или внутриклеточная персистенция возбудителя, в дополнение с высокой резистентностью его к широкому спектру антибактериальных препаратов, существенно затрудняет адекватную диагностику и своевременное лечение мелиоидоза [6-8].

На территории Российской Федерации сап и мелиоидоз до настоящего времени не регистрировали, возможно, по причине, что данные заболевания не являются эндемичными и относятся к числу «экзотических инфекций». Продолжающееся расширение ареала сапа и мелиоидоза, как на эндемичных территориях, так и в странах, где заболевания носят завозной характер, может быть связано, с одной стороны, с развитием экономических и культурных связей между различными государствами, с другой – является результатом постоянного совершенствования лабораторной диагностики, включая разработку современных экспрессных генетических методов.

В России функционирует Референс-центр по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза (далее Референс-центр), на базе ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, деятельность которого координируется в соответствии с приказом Роспотребнадзора № 1116 от 01.12.2017 г. «О совершенствовании системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации». Важными направлениями деятельности Референс-центра являются проведение научно-исследовательских работ по изучению биологических свойств патогенных буркхольдерий и разработка диагностических наборов реагентов, обеспечивающих с высокой чувствительностью и специфичностью выявление возбудителей сапа и мелиоидоза в окружающей среде и различных пробах клинического материала.

Цель работы – испытание и оценка диагностических характеристик нового набора реагентов для выявления и диф-

ференциации ДНК возбудителей сапа и мелиоидоза методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени.

**Материал и методы.** Использовано медицинского издании для диагностики *in vitro* сапа и мелиоидоза «Набор реагентов для выявления и дифференциации ДНК возбудителей сапа (*Burkholderia mallei*) и мелиоидоза (*Burkholderia pseudomallei*) методом мультиплексной полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-PB» по ТУ 21.20.23-013-01898084-2016». В состав набора реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-PB» входят следующие компоненты: ПЦР-смесь-1 *B. mallei/pseudomallei* – 1 пробирка по 0,3 мл; ПЦР-буфер-2 – 1 пробирка по 0,3 мл; *Taq*-ДНК-полимераза – 1 пробирка по 0,03 мл;  $MgCl_2$  – 1 пробирка по 0,15 мл; ПКО ДНК *B. mallei* (положительный контрольный образец) – 1 пробирка по 0,1 мл; ПКО ДНК *B. pseudomallei* (положительный контрольный образец) – 1 пробирка по 0,1 мл; ВКО (внутренний контрольный образец) – 1 пробирка по 0,08 мл; ТЕ-буфер – 1 пробирка по 1 мл.

Клинические испытания МИ проводили с использованием 14 штаммов *B. mallei*, 16 штаммов *B. pseudomallei*, 20 штаммов гетерологичных микроорганизмов, из них 5 штаммов *B. thailandensis*, 7 штаммов *B. cepacia*, 1 штамм *Vibrio cholerae*, 1 штамм *Francisella tularensis*, 1 штамм *Yersinia pestis*, 1 штамм *Bacillus anthracis*, 1 штамм *Pseudomonas putida*, 1 штамм *Pseudomonas aeruginosa*, 1 штамм *Staphylococcus aureus*, 1 штамм *Escherichia coli*, полученных из коллекции живых культур ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

Оценка диагностической чувствительности набора реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-PB» проведена на образцах клинического материала (кровь, моча, спинномозговая жидкость, содержимое абсцессов, мокрота, рвотные массы, отделяемое язв, экссудаты, пунктаты из лимфатических узлов, мазок из носоглотки, испражнения), секционного материала от человека (биоптаты печени, селезёнки, лёгкого, почки, головной мозг), биологического материала от животных (сердце, печень, лёгкое, селезёнка, почки, головной мозг, костный мозг, кровь), объектов окружающей среды (вода, почва), твёрдых пищевых продуктов (рис), искусственно контаминированных *B. mallei* Ц 4, *B. pseudomallei* 100 в конечной концентрации  $1 \times 10^3$  м.к./мл. Для определения диагностической специфичности использованы бактериальные суспензии гетерологичных микроорганизмов в концентрации  $1 \times 10^7$  м.к./мл и образцы клинического и биологического материала, искусственно контаминированные *B. thailandensis* Е 299 в конечной концентрации  $1 \times 10^7$  м.к./мл.

Работу проведена 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», МУ 4.2.2787-10 «Лабораторная диагностика мелиоидоза» и МУ 4.2.2831-11 «Лабораторная диагностика сапа».

Штаммы *B. mallei* и *B. pseudomallei* культивировали на агаре Хоттингера (ФСР 2009/05571), содержащим 5% глицерина, pH среды  $(7,0 \pm 0,2)$ , инкубировали при температуре  $(37 \pm 1)^\circ C$  в течение 24-48 ч. Выраживание близкородственных и гетерологичных видов микроорганизмов проводили с использованием общепринятых требований в соответствии с видом. Количество клеток в приготовленных разведениях проверяли путём посева из микробных взвесей в концентрации  $1 \times 10^3$  м.к./мл по 0,1 мл микробной взвеси каждого тест-штамма на чашки Петри с агаром Хоттингера (ФСР 2009/05571), содержащим 5% глицерина, pH среды  $(7,0 \pm 0,2)$ . Через 24-48 ч инкубации подсчитывали количество колоний, выросших на поверхности агара.

**Выделение ДНК.** Выделение ДНК из проб чистых культур возбудителей сапа и мелиоидоза, гетерологичных микроорганизмов, спинномозговой жидкости, мазков из носоглотки осуществляли в присутствии гуанидинизотиоцианата методом осаждения изопропанолом с использованием коммерческого набора «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Выделение ДНК из проб крови, мочи, мокроты, содержимого абсцессов, рвотных масс, отделяемое язв, экссудатов, пунктатов из лимфатических узлов, биоптатов, испражнений, воды, почвы, риса проводили с помощью коммерческого набора «ДНК-сорб-В» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Работу осуществляли в соответствии с инструкциями к указанным наборам.

Для определения возможной контаминации на этапе выделения ДНК наряду с исследуемыми пробами включали отрицательный контроль выделения (ОКВ), который анализировали далее в ПЦР-РВ. Для этого в отдельную микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл вместо пробы ДНК вносили 100 мкл ТЕ-буфера.

**Постановка и проведение ПЦР-РВ.** В микропробирке объемом 0,6 мл или 1,5 мл готовили реакционную смесь, которая состояла из ПЦР-смесь-1 *B. mallei/pseudomallei*, ПЦР-буфер-2,  $MgCl_2$ , ВКО, Таq-F-ДНК-полимеразы. Подготовленную смесь тщательно перемешивали на микроцентрифуге/встряхивателе и вносили по 15 мкл микропробирки объемом 0,2 мл. Затем в пробирку вносили по 10 мкл ДНК из исследуемых проб и 4 контрольных (отрицательный контроль выделения, отрицательный контроль ПЦР, положительный контроль *B. mallei* положительный контроль *B. pseudomallei*).

Детекцию результатов осуществляли путём измерения интенсивности флуоресцентных сигналов непосредственно в процессе ПЦР-РВ на приборе Rotor-Gene 6000 («Corbett Research», Австралия): по каналу FAM/Green – ДНК *B. mallei*, по каналу TAMRA/Yellow – ДНК *B. pseudomallei*, по каналу Cy5/Red – ВКО (внутреннего контрольного образца). Результаты учитывали на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой накопления флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствовало наличию или отсутствию значения порогового цикла «С<sub>т</sub>» в соответствующей графе в таблице результатов).

Для определения внутривосстановочной воспроизводимости одинаковые положительные пробы исследовали в пяти повторах с использованием двух серий набора реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ». Для определения межвосстановочной и межсерийной воспроизводимости одинаковые положительные пробы исследовали повторно с использованием двух серий набора реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ».

В качестве препарата сравнения использовали коммерческий набор реагентов «Набор реагентов для выявления и идентификации ДНК возбудителей бруцеллёза, сапа и мелиоидоза методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОМ-Скрин-Бру/Сап/Мелиоидоз-РВ) по ТУ 939816-017-46395995-2013», производства ЗАО «Синтол», г. Москва. Учёт и интерпретацию результатов проводили в соответствии с инструкцией к медицинскому изделию.

Статистическую обработку полученных результатов проводили в соответствии с «Методическими рекомендациями по порядку проведения экспертизы качества, эффективности и безопасности медицинских изделий», утв. ФГБУ «ЦМИКЭЭ» и ФГБУ «ВНИИИМТ» 14.11.2013 г., ГОСТ Р 53022.3-2008 «Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов». Статистическую достоверность результатов испытаний оценивали в зависимости от числа параллельных

опытов при доверительной вероятности 90%, используя формулу биномиального распределения Бернулли.

**Результаты и обсуждение.** В диагностике особо опасных инфекций мультиплексная ПЦР-РВ обладает рядом преимуществ: высокой чувствительностью и специфичностью, возможностью одновременной идентификации двух и более патогенных микроорганизмов в любом исследуемом материале за короткое время. Специалистами ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора разработан набор реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ», предназначенный для обнаружения и дифференциации ДНК возбудителей сапа и мелиоидоза в пробах клинического материала (кровь, моча, спинномозговая жидкость, содержимое абсцессов, мокрота, рвотные массы, отделяемое язв, экссудаты, пунктаты из лимфатических узлов, мазок из носоглотки, испражнения), секционного материала (биоптаты печени, селезёнки, лёгкого, сердца, почки, головной мозг), биологического материала от животных (сердце, печень, лёгкое, селезёнка, почки, головной мозг, костный мозг, кровь), объектов окружающей среды (вода, почва), твёрдых пищевых продуктов (рис), выделенных культур микроорганизмов методом мультиплексной полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

Набор реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ» предлагается для применения в клинической лабораторной диагностике при исследовании материала, полученного от лиц с подозрением на сап и/или мелиоидоз вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания, в том числе находившихся на эндемичных территориях по сапу и мелиоидозу, при проведении эпидемиологического мониторинга.

При разработке набора «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ» выбраны уникальные ДНК-мишени и сконструированы пары праймеров и флуоресцентно-меченые зонды для специфичной амплификации *B. mallei* на основе фрагментов гена *ftiP*, кодирующего белок биосинтеза флагеллина (*flagellar biosynthetic protein - ftiP*), имеющего вставку, фланкированную IS407A, для *B. pseudomallei*, комплементарные последовательности гена, кодирующего белок *grb8*, входящий в состав *RimL* региона (ацетилтрансферазы, включающие N-ацетилазы рибосомальных белков) [9].

В ходе контрольных лабораторных испытаний медицинского изделия определены аналитические характеристики набора «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ». Полученные результаты подтвердили заявленную аналитическую чувствительность ПЦР-РВ с использованием данного набора реагентов –  $1 \times 10^3$  м.к./мл. С гетерологичными микроорганизмами в концентрации  $1 \times 10^7$  м.к./мл отсутствовали положительные результаты, что указывало на высокую аналитическую специфичность разработанного набора реагентов равную 100%.

Для проверки технических характеристик набора реагентов и согласования нормативно-эксплуатационных документов в 2016 г. проведены технические испытания МИ на базе Федерального казённого учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб») Роспотребнадзора). В результате испытаний согласованы вид, класс потенциального риска применения в соответствии с номенклатурной классификацией МИ, утверждённой приказом Минздрава России от 06.06.2012 «Об утверждении номенклатурной классификации медицинских изделий», проведена доработка технической и эксплуатационной документации и оформлен акт испытаний.

В 2017 г. набор «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ» представлен к государственной регистрации в Федеральную

службу по надзору в сфере здравоохранения в качестве медицинского изделия. При проведении клинических испытаний с целью определения диагностической чувствительности МИ «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-PB» при анализе 312 проб, из которых 160 проб суспензий микроорганизмов, 72 пробы клинического материала, 12 проб секционного материала, 44 пробы биологического материала, 16 проб объектов окружающей среды, 8 проб твёрдых пищевых продуктов, искусственно контаминированных бактериальными агентами, содержащих возбудителей сапа (*B. mallei*) и мелиоидоза (*B. pseudomallei*) в концентрации  $1 \times 10^3$  м.к./мл, получен положительный результат в 309 случаях (99%).

При определении диагностической специфичности МИ «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-PB» при анализе 184 проб, из которых 108 проб суспензий микроорганизмов, 36 проб клинического материала, 6 проб секционного материала,

22 пробы биологического материала, 8 проб объектов окружающей среды и 4 – твёрдых пищевых продуктов, искусственно контаминированных бактериальными агентами, содержащих близкородственные и гетерологичные микроорганизмы в концентрации  $1 \times 10^7$  м.к./мл получен отрицательный результат в 100% случаев. Внутристановочная и межсерийная воспроизводимость для всех положительных образцов составила 100%.

При проведении клинических испытаний доказана диагностическая эффективность медицинских изделий «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-PB»: диагностическая чувствительность составила не менее 98% с доверительной вероятностью 90% при анализе 312 положительных проб, содержащих возбудителей сапа и мелиоидоза в концентрации  $1 \times 10^3$  м.к./мл, получен положительный результат в 309 случаях; диагностическая специфичность - не менее 99,0% с

**Результаты исследований в ПЦР с использованием набора реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-PB» для выявления и дифференциации ДНК *B. mallei* и *B. pseudomallei* методом ПЦР-PB**

Наименование проб	Число проб	Положительный ответ в ПЦР		
		«Амплиген <i>Burk-mallei/pseudomallei</i> -PB»		Образец сравнения «ОМ-Скрин-Бру/Сап/Мелиоидоз-PB»
		Серия 4/18	Серия 5/18	
1	2	3	4	5
Пробы чистых культур, содержащие <i>B. mallei</i> в концентрации $1 \times 10^3$ м.к./мл	38	38	38	38
Пробы чистых культур, содержащие <i>B. pseudomallei</i> в концентрации $1 \times 10^3$ м.к./мл	42	42	40	40
Пробы клинического материала, содержащие <i>B. mallei</i> концентрации $1 \times 10^3$ м.к./мл	18	18	18	18
Пробы клинического материала, содержащие <i>B. pseudomallei</i> в концентрации $1 \times 10^3$ м.к./мл	18	18	17	12
Пробы секционного материала, содержащие <i>B. mallei</i> в концентрации $1 \times 10^3$ м.к./мл	3	3	3	2
Пробы секционного материала, содержащие <i>B. pseudomallei</i> в концентрации $1 \times 10^3$ м.к./мл	3	3	3	2
Пробы биологического материала, содержащие <i>B. mallei</i> в концентрации $1 \times 10^3$ м.к./мл	11	11	11	10
Пробы биологического материала, содержащие <i>B. pseudomallei</i> в концентрации $1 \times 10^3$ м.к./мл	11	11	11	4
Пробы объектов окружающей среды, содержащие <i>B. mallei</i> в концентрации $1 \times 10^3$ м.к./мл	4	4	4	4
Пробы объектов окружающей среды, содержащие <i>B. pseudomallei</i> в концентрации $1 \times 10^3$ м.к./мл	4	4	4	4
Пробы пищевых продуктов, содержащие <i>B. mallei</i> в концентрации $1 \times 10^3$ м.к./мл	2	2	2	2
Пробы пищевых продуктов, содержащие <i>B. pseudomallei</i> в концентрации $1 \times 10^3$ м.к./мл	2	2	2	2
Итого положительных проб, содержащих <i>B. mallei</i> , в концентрации $1 \times 10^3$ м.к./мл	76	76	76	74
Итого положительных проб, содержащих <i>B. pseudomallei</i> в концентрации $1 \times 10^3$ м.к./мл	80	80	77	64
Итого положительных проб, содержащих <i>B. mallei</i> , <i>B. pseudomallei</i> в концентрации $1 \times 10^3$ м.к./мл	156*	156	153	138*
Пробы чистых культур, содержащие близкородственные и гетерологичные микроорганизмы в концентрации $1 \times 10^7$ м.к./мл	54	0	0	0
Пробы клинического материала, содержащие близкородственные микроорганизмы в концентрации $1 \times 10^7$ м.к./мл	18	0	0	0
Пробы секционного материала, содержащие близкородственные микроорганизмы в концентрации $1 \times 10^7$ м.к./мл	3	0	0	0
Пробы биологического материала, содержащие близкородственные микроорганизмы в концентрации $1 \times 10^7$ м.к./мл	11	0	0	0
Пробы объектов окружающей среды, содержащие близкородственные микроорганизмы в концентрации $1 \times 10^7$ м.к./мл	4	0	0	0
Пробы пищевых продуктов, содержащие близкородственные микроорганизмы в концентрации $1 \times 10^7$ м.к./мл	2	0	0	0
Итого отрицательных проб, содержащих близкородственные и гетерологичные микроорганизмы в концентрации $1 \times 10^7$ м.к./мл	92*	0	0	0

Примечание. \* - образцы анализировали в 2 повторях.

доверительной вероятностью 90% при исследовании 184 отрицательных проб, содержащих близкородственные и гетерологичные микроорганизмы в концентрации  $1 \times 10^7$  м.к./мл, получен отрицательный ответ в 184 случаях.

В качестве препарата сравнения использован набор реагентов «ОМ-Скрин-Бру/Сап/Мелиоидоз-РВ», зарегистрированный на территории Российской Федерации. Чувствительность ПЦР-РВ при исследовании проб с помощью набора «ОМ-Скрин-Бру/Сап/Мелиоидоз-РВ», содержащих возбудителей *B. mallei*, *B. pseudomallei* в концентрации  $1 \times 10^3$  м.к./мл составила – 89%. Специфичность ПЦР-РВ с препаратом сравнения при анализе проб, содержащих близкородственных и гетерологичных микроорганизмов в концентрации  $1 \times 10^7$  м.к./мл, составила 100%.

Результаты клинических испытаний, сводные данные по эффективности (чувствительности и специфичности) набора реагентов представлены в табл. 1.

На основании полученных данных набор реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ» рекомендован к государственной регистрации в Российской Федерации в качестве медицинского изделия. Проведена экспертиза документов регистрационного досье на МИ, 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 МИ в соответствии с Правилами государственной регистрации медицинских изделий, утверждёнными Постановлением Правительства Российской Федерации от 27.12.2012 № 1416.

В 2018 г. получено в Федеральной службе по надзору в сфере здравоохранения Регистрационное удостоверение № РЗН 2018/7999 от 29.12.2018 г. и разрешены производство, реализация и применение МИ в медицинской лабораторной практике.

**Заключение.** Внедрение новых диагностических препаратов позволит расширить спектр средств для лабораторной диагностики патогенных буркхольдерий, что даст возможность избежать ложноотрицательных результатов и повысить надёжность анализа. Мультиплексная ПЦР-РВ позволит проводить качественный анализ нескольких возбудителей в одной пробирке и дифференцировать близкородственные виды одновременно, такие как возбудители сапа и мелиоидоза, гибридно-флуоресцентная детекция поможет сократить продолжительность исследования, трудоёмкость анализа и снизить риск контаминации.

Разработанный специалистами ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора набор реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ» для диагностики *in vitro* сапа и мелиоидоза методом ПЦР-РВ даёт возможность выявлять возбудителей в пробах клинического и биологического материала, культурах микроорганизмов, объектах окружающей среды, твёрдых пищевых продуктах (рис), что позволит в кратчайшие сроки обнаружить и дифференцировать ДНК патогенных буркхольдерий, что важно для установления своевременного и точного диагноза. Использование данного молекулярно-генетического подхода значительно повысит эффективность диагностики заболеваний и выбор тактики лечения, обеспечит своевременное проведение необходимых противоэпидемических мероприятий.

**Благодарности.** *Выражаем благодарность сотрудникам ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора: канд.мед.*

*наук, зав. лаб. мол. диагностики Осиной Н.А., и.о. зав. отд. диагностики инфекционных болезней Портенко С.А.; зав. отд. биологического и технологического контроля Лобовиковой О.А.; зав. отд. стандартизации, качества и метрологии Шульгиной И.В.; науч.сотр. лаб. оперативной диагностики инфекционных болезней Касьян Ж.А. за организацию и проведение испытаний, подтверждающих безопасность и уровень качества медицинского изделия «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ».*

**Финансирование.** *Исследование не имело спонсорской поддержки.*

**Конфликт интересов.** *Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 3-5, 7, 8 см. REFERENCES)

1. Онищенко Г.Г., Кутырева В.В., ред. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. 2-е изд. М.: ЗАО Шико; 2013.
2. Топорков А.В., ред. Мелиоидоз и сап. Волгоград: Волга-Пресс; 2016.
6. Захарова И.Б., Топорков А.В., Викторов Д.В. Мелиоидоз и сап: современное состояние проблемы и актуальные вопросы эпидемиологического надзора. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2018; 6: 103-9.
9. Лемасова Л.В., Ткаченко Г.А., Савченко С.С., Антонов В.А. Разработка мультиплексной тест-системы для обнаружения и дифференциации *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei* методом ПЦР в режиме реального времени. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2016; 4: 56-9.

#### REFERENCES

1. Onishchenko G.G., Kutuyev V.V., eds. Laboratory diagnosis of dangerous infectious diseases. Practical guidance [Laboratornaya diagnostika opasnykh infektsionnykh bolezney. Prakticheskoe rukovodstvo]. 2<sup>nd</sup> ed. Moscow: Shiko; 2013. (in Russian)
2. Toporkov A.V., ed. Melioidosis and glanders Feder [Melioidoz I sap]. Volgograd: Volga-Press; 2016. (in Russian)
3. Khan I., Wieler L.H., Melzer F., Elschner M.C., Muhammad G., Ali S. et al. Glanders in animals: a review on epidemiology, clinical presentation, diagnosis and countermeasures. *Transboundary and emerging diseases.* 2013; 60 (3): 204-21.
4. Mota R.A., da Fonseca Oliveira A.A., da Silva A.M., Junior J.W., da Silva L.B., de Farias Brito M. et al. Glanders in donkeys (*Equus Asinus*) in the state of pernambuco, Brazil: A case report. *Brazilian journal of microbiology.* 2010; 41 (1): 146-9.
5. Verma A.K., Saminathan M., Tiwari R., Dhama K., Vir Singh S. Glanders- a re-emerging zoonotic disease: A Review. *Journal of Biological Sciences.* 2014; 14: 38-51.
6. Zakharova I. B., Toporkov A. V., Viktorov D. V. Melioidosis and glanders: current state of the problem and topical issues of epidemiological surveillance. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2018; 6: 103-9. (in Russian)
7. Currie B.J. Melioidosis: evolving concepts in epidemiology, pathogenesis, and treatment Seminars in respiratory and critical care medicine. *Thieme Medical Publishers.* 2015; 36 (01): 111-25.
8. Wiersinga W.J., Virk H.S., Torres A.G., Currie B.J., Peacock S.J., Dance D., Limmathurotsakul D. Melioidosis. *Nature reviews. Disease primers.* 2018; 4: 17107.
9. Lemasova L.V., Tkachenko G.A., Savchenko S.S., Bondareva O.S., Antonov V.A. Development of real time multiplex PCR test-system for detection and differentiation of *B. mallei* and *B. pseudomallei*. *Problemy osobo opasnykh infektsiy.* 2016; 4: 56-9. (in Russian)

Поступила 26.09.19

Принята к печати 10.10.19