

**Отчет о проделанной работе в рамках научного проекта**  
**«Создание набора для ПЦР-диагностики генов *B.ceracia complex* в**  
**нативной мокроте пациентов с муковисцидозом»**

2 этап

Создание тест – системы со специфичностью и чувствительностью на штаммы *Burkholderia multivorans*

Старт проекта: декабрь 2017 года

Разработка набора, оптимизация и тестирование на верифицированных штаммах: декабрь 2017 года – июнь 2018 года

Клиническая апробация (100 проб мокроты, пациенты РФ) март 2018 года – январь 2019 года

Компания разработчик: ООО «Нуклеоген», г.Ульяновск. Генеральный директор Викторов Денис Александрович [viktorov@testgen.ru](mailto:viktorov@testgen.ru)

Тестовые штаммы: Штаммы *Burkholderia multivorans*, *Achromobacter spp.* и других генетически сходных родов, выделенные от пациентов с муковисцидозом (для корректировки системы).

Координатор: врач-бактериолог Микробиологического отдела КДЛ Клиник ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» МЗ РФ, к.м.н. Кондратенко Ольга Владимировна, +79272005500, [helga1983@yandex.ru](mailto:helga1983@yandex.ru)

Обоснование актуальности исследования:

Муковисцидоз продолжает оставаться одной из актуальных патологий в современной медицине. В настоящее время, вследствие внедрения неонатального скрининга, улучшения качества диагностики и лекарственного обеспечения, формируется тенденция к значительному увеличению продолжительности жизни пациентов. В то же время, бактериальные осложнения заболевания, в частности инфицирование штаммами *Burkholderia ceracia complex* может в значительной степени усугубить течение и прогноз для жизни больных.

Муковисцидоз входит в программу 7 ресурсозатратных заболеваний, госпитализация и лечение пациентов являются дорогостоящими. При этом наиболее затратными являются случаи лечения пациентов, инфицированных штаммами *Burkholderia ceracia complex*, способными приводить к развитию такого грозного осложнения, как «*ceracia*-синдром», характеризующегося

развитием пневмонии, септициемии и большом проценте случаев проводящее к гибели пациента. По этой причине раннее выявление и терапия в случае выделения этого патогена является актуальной задачей. В Европе и мире есть практика поиска гес А гена *B.ceracia* в нативной мокроте методом ПЦР, разработаны наборы для исследований. Но в России этот вопрос остается открытым. Большинству производителей экономически невыгодно выпускать на рынок подобные наборы, т.к. на данный момент на них нет спроса среди врачей-диагностов. Между тем, считается, что ДНК возбудителя появляется в мокроте пациентов в среднем за 1,5-2 года до первичного высева микробиологическими методами. Конечно, на данном, по своей сути, доклиническом этапе, можно добиться эрадикации возбудителя и не допустить распространение инфекции между пациентами, которые еще не знают, что инфицированы.

Не желая отставать от общемировых стандартов лабораторной диагностики, мы планируем провести исследование 100 проб мокроты на наличие генов *Burkholderia ceracia complex*.

**Тест-система, созданная в рамках 1 этапа проекта «Создание набора для ПЦР-диагностики генов *B.ceracia complex* в нативной мокроте пациентов с муковисцидозом» показала высокую специфичность и чувствительность в отношении *Burkholderia cenocepacia*, однако не было получено адекватных данных в отношении штаммов *Burkholderia multivorans*. Указанные геномодули являются ведущими по частоте встречаемости у пациентов с муковисцидозом в мире, и в РФ в частности. В связи с этим, считаем необходимым провести доработку тест-системы в отношении штаммов *Burkholderia multivorans*.**

Разработчиком тест-системы будет являться компания ООО ООО «Нуклеоген», г.Ульяновск.

#### 1. Разработка тест системы:

Процесс разработки набора включал следующие этапы:

- 1.1. Подбор гена-кандидата, обладающего 100% специфичностью для генома *B.multivorans* и максимальным спектром штаммов;
- 1.2. Выбор невариабельного региона в отобранном гене в качестве окончательной мишени;
- 1.3. Дизайн зондов и праймеров;
- 1.4. Создание лабораторного образца;
- 1.5. Составление инструкции;

Эти этапы кроме 1.4. проводились *in silico*.

- 2.1. Постановка ПЦР на образцах референтных штаммов *B.cenoseracia* и *B.multivorans*,
- 2.2. Оптимизация протокола амплификации, концентраций праймеров, зондов (и магния) в реакционной смеси на положительном референтном штамме;
- 2.3. Определение микробиологической специфичности на гетерологических штаммах (другие виды и роды бактерий - не менее 10),
- 2.4. Определение микробиологической чувствительности (спектра штаммов *B.cenoseracia* и *B.multivorans*, выявляемых полученной тест-системой - не менее 10),
- 2.5. Определение параметров реакции: эффективности, линейности, аналитической чувствительности и специфичности.
- 2.6. Разработка положительного контрольного образца.
- 2.7. Корректировка инструкции.
3. Разработка внутреннего контрольного образца или контроля взятия материала - по необходимости.
- 4.1. Получение готовой тест-системы (набора реагентов),
- 4.2. Составление НТД на производство готовой тест-системы.

Для этапов 2.1-2.6 были предоставлены клинические штаммы, идентифицированные с помощью MALDI-Tof-mass-спектрометра MicroFlex, Bruker (Germany), а также штаммы, реидентифицированные с помощью 16s-RNA-секвенирования. Отправка штаммов разработчику осуществлялась в декабре 2017 года.

Клиническая апробация набора осуществлялась на базе ПЦР-лаборатории КДЛ Клиник ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» МЗ РФ.

## 2. Результаты клинической апробации тест-системы

Для проведения клинической апробации тест системы был произведен отбор и заморозка 108 проб биоматериала от 91 пациента сиз 14 регионов РФ. Из них 12 пациентов ранее принимали участие в реализации 1 этапа проекта.

Распределение проб и пациентов, принимавших участие в исследовании представлен в таблице 1.

Таблица 1

### **Распределение проб и пациентов, принимавших участие в исследовании**

№ п/п	Регион	Количество пациентов	%	Количество проб	%
1	Санкт-Петербург	18		25	

2	Крым	15		18	
3	Самарская область	7		11	
4	Татарстан	10		10	
5	Ростовская область	8		9	
6	Волгоградская область	7		8	
7	Кемеровская область	7		7	
8	Москва	4		4	
9	Воронежская область	4		4	
10	Кировская область	4		4	
11	Тюменская область (в т.ч. ХМАО)	4		4	
12	Забайкальский край	1		1	
13	Пермский край	1		1	
14	Оренбургская область	1		1	
<b>Итого</b>		<b>91</b>		<b>108</b>	

При этом 78 пациентов обследованы однократно (%), 10 (%)- двукратно и 3 (%) троекратно.

Протокол проведенного исследования:

№	регион	высев в анамнезе	ВС	ВМ	Комментарии
1	КЕМ	н	нет	нет	
2	КЕМ	вс	да	<b>да</b>	выделение ВМ может быть следствием технической ошибки, проба поставлена повторно
3	КЕМ	н	нет	нет	
4	КЕМ	вс	да	нет	
5	КЕМ	вс	да	нет	
6	СПБ	н	нет	нет	
7	СПБ	н	нет	нет	
8	СПБ	н	нет	нет	
9	СПБ	н	нет	нет	
10	СПБ	н	нет	нет	
11	СПБ	н	нет	нет	
12	САМ	вс	да	<b>да</b>	выделение ВМ может быть следствием технической ошибки, проба поставлена повторно
13	СПБ	н	нет	нет	
14	САМ	вс	да	<b>да</b>	выделение ВМ может быть следствием технической ошибки, проба поставлена повторно
15	САМ	вс	да	нет	
16	крым	н	нет	нет	
17	крым	н	нет	нет	
18	крым	н	нет	нет	
19	крым	н	нет	нет	
20	крым	н	нет	нет	

21	крым	н	нет	нет	
22	РОС	н	нет	нет	
23	РОС	н	нет	нет	
24	РОС	н	нет	нет	
25	СПБ	н	нет	нет	
26	СПБ	н	нет	нет	
27	САМ	вс	да	да	выделение VM может быть следствием технической ошибки, проба поставлена повторно
28	СПБ	н	нет	нет	
29	САМ	н	нет	нет	
30	ЗАБКР	н	нет	нет	
31	СПБ	н	нет	нет	
32	МОС	вм	нет	да	отражает специфичность тест-системы
33	МОС	вм	нет	да	отражает специфичность тест-стстемы
34	МОС	вгл	нет	нет	отражает специфичность тест системы
35	СПБ	н	нет	нет	
36	СПБ	н	нет	нет	
37	крым	н	нет	нет	
38	СПБ	н	нет	нет	
39	СПБ	н	нет	нет	
40	ВОЛГ	вс	да	да	выделение VM может быть следствием технической ошибки, проба поставлена повторно
41	ХМАО	н	нет	нет	
42	ТЮМ	н	нет	нет	
43	ХМАО	н	нет	нет	
44	ТЮМ	вс	да	нет	
45	ХМАО	н	нет	нет	
46	СПБ	н	нет	нет	
47	СПБ	н	нет	нет	
48	СПБ	н	нет	нет	
49	СПБ	н	нет	нет	
50	СПБ	н	да	да	материал взят повторно, проба поставлена 2 месяца спустя
51	крым	н	нет	нет	
52	крым	н	нет	нет	
53	крым	н	нет	нет	
54	крым	н	нет	нет	
55	крым	н	нет	нет	
56	крым	н	нет	нет	
57	крым	н	нет	нет	
58	крым	н	нет	нет	
59	крым	н	нет	нет	
60	ПЕРМ	н	нет	нет	
61	ОРЕН	н	нет	нет	
62	крым	н	нет	нет	
63	крым	н	нет	нет	
64	САМ	н	нет	нет	
65	ВОЛГ	н	нет	нет	

66	ВОЛГ	вс	нет	да	выделение ВМ может быть следствием технической ошибки, проба поставлена повторно
67	РОС	н	нет	нет	
68	ВОЛГ	н	нет	нет	
69	РОС	н	нет	нет	
70	РОС	н	нет	нет	
71	ВОЛГ	вс в другой лаб	нет	нет	вероятнее пациент чистый
72	РОС	н	нет	нет	
73	РОС	н	нет	нет	
74	РОС	н	нет	нет	
75	ВОЛГ	н	нет	нет	
76	ВОЛГ	н	нет	нет	
77	ВОЛГ	н	нет	нет	
78	ТАТ	н	нет	нет	
79	ТАТ	н	нет	нет	
80	ТАТ	н	нет	нет	
81	ТАТ	н	нет	нет	
882	ТАТ	н	нет	нет	
83	ТАТ	н	нет	нет	
84	ТАТ	н	нет	нет	
85	ТАТ	н	нет	нет	
86	ТАТ	н	нет	нет	
87	КЕМ	н	нет	нет	
88	ВОР	н	нет	нет	
89	ВОР	н	нет	нет	
90	ВОР	н	нет	нет	
91	ВОР	вс	да	да	выделение ВМ может быть следствием технической ошибки, проба поставлена повторно
92	ТАТ	н	нет	нет	
93	КИР	н	нет	нет	
94	КИР	н	нет	нет	
95	КИР	н	нет	нет	
96	КИР	н	нет	нет	
97	САМ	вс	нет	нет	? Дефект забора материала? Проба была поставлена дважды
98	МОС	н	нет	нет	
99	САМ	вс	да	нет	
100	КЕМ	н	нет	нет	
101	САМ	вс до 2013 года	нет	нет	пациент чистый
102	САМ	вс до 2013 года	нет	нет	пациент чистый
103	САМ	вс до 2013 года	нет	нет	пациент чистый
104	СПБ	н	нет	нет	ранее положительная ПЦР
105	СПБ	н	нет	нет	ранее положительная ПЦР
106	СПБ	вс	да	нет	интермиттирующая инфекция, пациент взят на мониторинг

					флоры
107	СПБ	вс	да	нет	интермиттирующая инфекция, пациент взят на мониторинг флоры
108	СПБ	н	нет	нет	

В результате проведенного исследования 2 пациентам из Санкт Петербурга рекомендовано динамическое наблюдение мокроты в течение года.

Заключение по результатам исследования:

В результате проведенного исследования было установлено, что разработанная ПЦР-тест система является специфичной на *V.sepserasia* и *V.multivorans* и может быть рекомендована в качестве дополнительного метода лабораторного исследования мокроты у пациентов с МВ, особенно в регионах с напряженной эпидемиологической ситуацией и недостаточным уровнем микробиологической диагностики.

Координатор исследования:

Кондратенко Ольга Владимировна, к.м.н.,  
врач-бактериолог Микробиологического  
отдела КДЛ Клиник ФГБОУ ВО Самарский  
государственный медицинский университет  
МЗ РФ