

«Создание набора для ПЦР-диагностики генов *B. ceracia complex* в нативной мокроте пациентов с муковисцидозом»

Отчет по проделанной работе

Старт проекта: март 2016 года

Разработка набора, оптимизация и тестирование на верифицированных штаммах: март 2016 года - октябрь 2016 года

Клиническая апробация (84 пробы мокроты (+контроли), пациенты РФ) декабрь 2016 года – май 2017 года

Компания разработчик: ООО «Тестген» (www.testgen.ru), г.Ульяновск, генеральный директор Андрей Тороповский

Тестовые штаммы: 20 штаммов *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia multivorans*, 20 штаммов *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

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

Техническая реализация на клинических образцах: врач КДЛ Клиник ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» МЗ РФ, к.м.н. Колотьева Наталия Александровна, врач КДЛ Клиник ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» МЗ РФ Нижарадзе Герасим Владимирович

Реализация проекта осуществлялась в 2 этапа

Этап 1

Разработка набора для ПЦР диагностики генов *B. ceracia complex* разработчиком ООО «Тестген»

Процесс разработки набора включал следующие этапы:

- 1.1. Подбор гена-кандидата, обладающего 100% специфичностью для генома *V.serasia* 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;
-
- 2.1. Постановка ПЦР на образцах референтных штаммов *V.serasia*,
 - 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 *V.serasia*, 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 была осуществлена в мае 2016 года.

Этап 2

Клиническая апробация тест-системы на биологических пробах пациентов с муковисцидозом, имеющим и не имеющим высеv *V.serasia complex* из мокроты в анамнезе.

За период с декабря 2016 по май 2017 гг. в лаборатории для исследования были отобраны 84 пробы мокроты от 81 пациента с муковисцидозом РФ. В исследовании приняли участие пациенты из 9 регионов РФ.

Из них:

№	Регион	Количество пациентов (проб)
1	Самарская область	24 (26)
2	Санкт-Петербург	13 (13)
3	Кемеровская область	30 (30)
4	Республика Татарстан	8 (8)
5	Ростовская область	1(1)
6	Республика Адыгея	1(1)
7	Краснодарский край	1 (1)
8	Москва	2 (3)
9	Ульяновская область	1 (1)
Итого		81 пациент (84 пробы)

Распределение пациентов, принявших участие в исследовании по процентному соотношению представлено на диаграмме 1

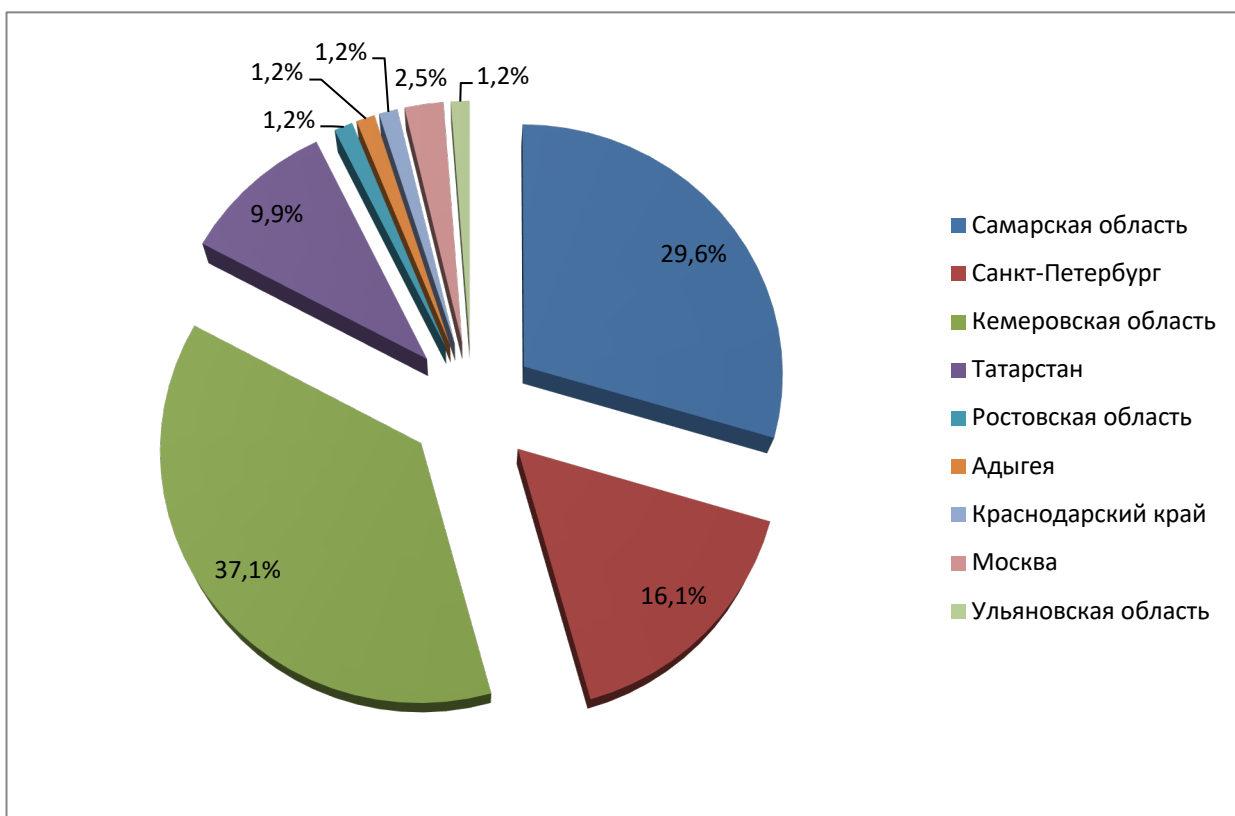


Диаграмма 1. Процентное соотношение пациентов из регионов РФ, принявших участие в проекте

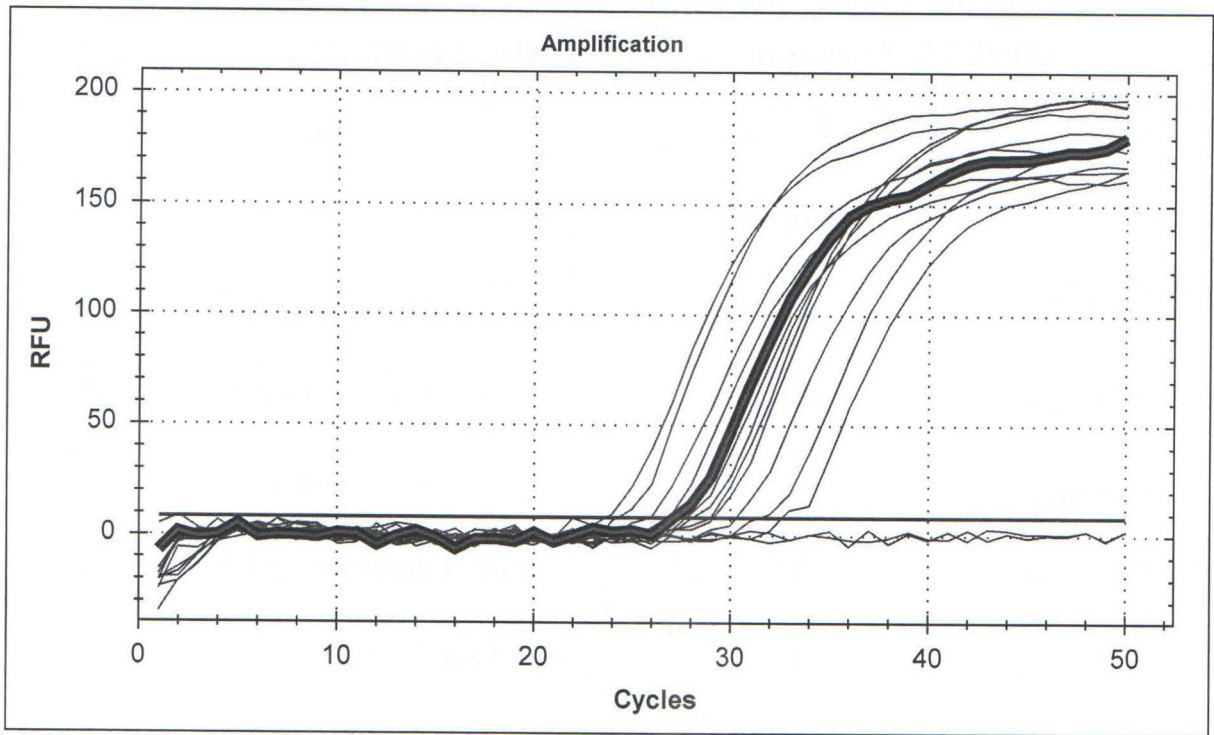
Собранные пробы были заморожены в пробирках Эппендорфа.

Процесс выделения ДНК осуществлялся с помощью набора РеалБест экстракция 100 Вектор-Бест С -8896 (не входившего в комплект поставки набора!)

Процесс ПЦР-исследования осуществлялся в несколько партий, в зависимости от количества накопленных образцов:

№ партии	Дата постановки	Количество проб	Комментарии
1	26.12.2016	12	Все пробы прошли успешно
2	22.03.2017	27	1 проба с отсутствием высева в анамнезе прошла сомнительно, 1 проба с высевом <i>V.multivorans</i> прошла отрицательно
3	31.03.2017	4	Переставлена сомнительная проба (результат отрицательный), 2 пробы с высевом <i>V.multivorans</i> прошли отрицательно
4	04.2017	7	По техническим причинам тест-система не сработала, результаты сомнительны
5	06.06.2017	34	Все пробы прошли успешно

Протокол амплификации 1 партии проб представлен ниже:



	B	C	D	E	F	H	I	J
	Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev
1				Unkn	1	25,89	25,89	0,000
2	C03	FAM		Unkn	2	27,11	27,11	0,000
3	C04	FAM		Unkn	3	32,61	32,61	0,000
4	C05	FAM		Unkn	4	23,66	23,66	0,000
5	C06	FAM		Unkn	5	28,99	28,99	0,000
6	C07	FAM		Unkn	6	29,13	29,13	0,000
7	C08	FAM		Unkn	7	30,29	30,29	0,000
8	C09	FAM		Unkn	8	28,06	28,06	0,000
9	C10	FAM		Unkn	9	27,74	27,74	0,000
10	D03	FAM		Unkn	10	26,79	26,79	0,000
11	D04	FAM		Unkn	11	31,40	31,40	0,000
12	D05	FAM		Unkn	18		0,00	0,000
13	D06	FAM		Unkn			0,00	0,000
14	D07	FAM		Neg Ctrl				0,000
15	D08	FAM		Pos Ctrl		24,25	24,25	0,000

В результате исследования были получены следующие данные:

№	регион	высев в анамнезе	результат	Комментарии
1	Самарская область	положительный	положительный	
2	Самарская область	положительный	положительный	
3	Самарская область	положительный	положительный	
4	Самарская область	положительный	положительный	
5	Самарская область	положительный	положительный	
6	Самарская область	положительный	положительный	

7	Самарская область	положительный	положительный	
8	Самарская область	положительный	положительный	
9	Самарская область	положительный	положительный	
10	Самарская область	положительный	положительный	
11	Самарская область	положительный	положительный	
12	Самарская область	отрицательный	отрицательный	
13	Самарская область	отрицательный	отрицательный	
14	Самарская область	отрицательный	отрицательный	
15	Самарская область	отрицательный	положительный	переставлен повторно
16	Татарстан	отрицательный	отрицательный	
17	Татарстан	отрицательный	отрицательный	
18	Татарстан	отрицательный	отрицательный	
19	Татарстан	отрицательный	отрицательный	
20	Татарстан	отрицательный	отрицательный	
21	Татарстан	отрицательный	отрицательный	
22	Татарстан	отрицательный	отрицательный	
23	Татарстан	отрицательный	отрицательный	
24	Самарская область	отрицательный	отрицательный	
25	Санкт-Петербург	отрицательный	отрицательный	
26	Санкт-Петербург	отрицательный	отрицательный	
27	Санкт-Петербург	отрицательный	отрицательный	
28	Москва	положительный	отрицательный	<i>B.multivorans</i>
29	Самарская область	отрицательный	отрицательный	
30	Самарская область	отрицательный	отрицательный	
31	Москва	отрицательный	отрицательный	
32	Самарская область	отрицательный	отрицательный	
33	Самарская область	отрицательный	отрицательный	
34	Краснодарский край	отрицательный	отрицательный	
35	Ростовская область	отрицательный	отрицательный	
36	Самарская область	отрицательный	отрицательный	
37	Адыгея	отрицательный	отрицательный	
38	Санкт-Петербург	отрицательный	отрицательный	
39	Санкт-Петербург	отрицательный	отрицательный	
40	Самарская область	отрицательный	отрицательный	
41	Самарская область	отрицательный	отрицательный	
42	Ульяновская область	положительный	отрицательный	чистая культура Ульяновская область <i>B.multivorans</i>
43	Москва	положительный	отрицательный	чистая культура Москва <i>B.multivorans</i>
44	Самарская область	отрицательный	не прошла проба	нет высева более 3 лет
45	Санкт-Петербург	положительный	не прошла проба	
46	Санкт-Петербург	положительный	не прошла проба	
47	Санкт-Петербург	отрицательный	не прошла проба	
48	Санкт-Петербург	отрицательный	не прошла	

			проба	
49	Санкт-Петербург	положительный	не прошла проба	чистая культура, геномвар неизвестен
50	Санкт-Петербург	положительный	не прошла проба	чистая культура, геномвар неизвестен
51	Самарская область	отрицательный	отрицательно	диагноз МВ снят Красовским в 2016
52	Кемеровская область	положительный	положительный	первый высев
53	Кемеровская область	отрицательный	отрицательный	
54	Кемеровская область	положительный	положительный	первый высев
55	Кемеровская область	положительный	положительный	первый высев
56	Кемеровская область	отрицательный	отрицательный	
57	Кемеровская область	положительный	положительный	первый высев
58	Кемеровская область	отрицательный	отрицательный	
59	Кемеровская область	положительный	положительный	первый высев
60	Кемеровская область	отрицательный	отрицательный	
61	Кемеровская область	положительный	положительный	первый высев
62	Кемеровская область	отрицательный	отрицательный	
63	Кемеровская область	положительный	положительный	первый высев
64	Кемеровская область	отрицательный	отрицательный	
65	Кемеровская область	отрицательный	отрицательный	
66	Кемеровская область	положительный	положительный	первый высев
67	Кемеровская область	отрицательный	отрицательный	
68	Кемеровская область	отрицательный	отрицательный	
69	Кемеровская область	отрицательный	отрицательный	
70	Кемеровская область	отрицательный	отрицательный	
71	Кемеровская область	отрицательный	отрицательный	
72	Кемеровская область	положительный	положительный	первый высев
73	Кемеровская область	отрицательный	отрицательный	
74	Кемеровская область	отрицательный	отрицательный	

75	Кемеровская область	отрицательный	отрицательный	
76	Кемеровская область	отрицательный	отрицательный	
77	Кемеровская область	положительный	положительный	первый высев
78	Кемеровская область	отрицательный	отрицательный	
79	Кемеровская область	отрицательный	отрицательный	
80	Кемеровская область	отрицательный	отрицательный	
81	Кемеровская область	отрицательный	отрицательный	
82	Самарская область	отрицательный	отрицательный	назальный смыв
83	Санкт-Петербург	отрицательный	отрицательный	
84	Санкт-Петербург	отрицательный	отрицательный	

Выводы:

1. Разработанная тест-система является высокоспецифичной для обнаружения ДНК *V.sepосeracia* и может быть рекомендована для практического применения в регионах как с высоким уровнем микробиологической диагностики, в качестве дополнительного теста, так и в регионах с более низким уровнем микробиологической диагностики в качестве альтернативного скринингового теста с целью микробиологического и эпидемиологического мониторинга.
2. Разработанная тест система показала низкий уровень специфичности для обнаружения ДНК *B.multivorans* и, возможно, других геномоваров (пробы пациентов из Санкт-Петербурга с неустановленным геномоваром), и, на данном этапе, не может быть рекомендована для использования, с целью выявления иных геномоваров, ввиду необходимости ее корректировки производителем с учетом особенностей указанных бактерий.
3. Для оптимизации работы тест системы нами рекомендовано: корректировка тест-системы производителем с учетом полученных нами данных и последующим дополнительным клиническим исследованием проб мокроты от пациентов с муковисцидозом с использованием доработанной версии продукта.

Координатор _____ проекта: врач-бактериолог
Микробиологического отдела КДЛ Клиник ФГБОУ ВО
«Самарский государственный медицинский университет» МЗ
РФ, к.м.н. Кондратенко Ольга Владимировна