

УДК 616.981

А.А. АБДИРАСИЛОВА

Казахский научный центр карантинных и зоонозных инфекций им М. Айкимбаева, г. Алматы

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЯ В КОНТРОЛЕ НАД ПРИРОДНЫМИ ОЧАГАМИ ЧУМЫ

Целью данного исследования явилась аналитическая характеристика первого отечественного набора «ПЦР тест-система *Yersinia pestis caf1*», предназначенного для обнаружения видового капсульного антигена чумного микроба, а также идентификация возбудителя чумы с помощью наборов мультилокусной ПЦР-системы для выявления родо-специфических и видоспецифических участков ДНК чумного микроба.

**Материал и методы.** Использованы ПЦР тест-системы для выявления ДНК чумного микроба. Исследование проводилось на модели штаммов возбудителя чумы и близкородственных микробов, суспензии переносчиков чумной инфекции блох *X. skrjabini* и *X. g. Minax*. Праймеры для создания тест-систем были разработаны специалистами КНЦКЗИ, г. Алматы, Казахстана, Техасского Университета (г. Галвестон, США), ИОГЦ МОН РК, Алматы, Казахстан).

**Результаты.** Впервые в Казахстане разработана ПЦР тест-система праймеров *YopE + caf1 + pla*, обладающая высокой чувствительностью и специфичностью. Тест-система может быть использована для индикации зараженных объектов как инструмент экспресс-диагностики чумы с высоким уровнем информативности, для внутривидовой дифференциации штаммов, циркулирующих в природных очагах чумы. Рекомендуется внедрение в практическую деятельность противочумной службы МЗ РК первые отечественные ПЦР наборы для генетических методов исследования в стационарных и мобильных лабораториях.

**Ключевые слова:** ПЦР тест-система, генотип, праймер, природные очаги чумы.

**В** Казахстане природные очаги чумы располагаются на территории 10 административных областей из 14 имеющихся, общая площадь которых составляет более 1 млн 70 тыс кв. км, что составляет 39% территории республики. Природные очаги чумы Казахстана обладают высоким эпидемическим потенциалом, так в 1960 – 2003 годы из 113 больных чумой, выявленных в Центрально-азиатских республиках, 84 (74,3%) больных выявлены в Казахстане. Ежегодно в 6 – 10 областях РК регистрируются очаги эпизоотии чумы. На эпизоотических территориях выявляется до 3,6 тысячи зараженных носителей и переносчиков. Естественными носителями чумы могут быть 69 видов теплокровных животных, фауна эктопаразитов-переносчиков инфекции представлена большим видовым разнообразием [1].

Эпидемиологический надзор за природными очагами чумы осуществляют 10 противочумных станций МЗ РК с 19 противочумными отделениями при научно-методическом руководстве Казахского научного центра карантинных и зоонозных инфекций им. М. Айкимбаева (КНЦКЗИ). В последнее десятилетие природные очаги чумы подвергаются возрастающему влиянию антропогенных факторов, связанных с сельскохозяйственным и промышленным освоением территории. Наряду с традиционными видами хозяйственной деятельности – животноводством и земледелием увеличился объем работ, связанных с добычей нефти, газа, минералов, прокладкой железных и автомобильных дорог, при этом многие работы проводятся на очаговых территориях, где возможно заражение людей чумой. Штаммы чумного микроба, выделяемые от носителей и переносчиков чумы на территории Казахстана, характеризуются высокой вирулентностью.

При современных международных транспортных сообщениях вспышка особо опасной инфекции может рассматриваться как угроза для любого региона земного шара. В 2007-2012 годы в 16 странах Африки, Азии и Америки зарегистрировано более 12 тысяч случаев заболеваний чумой людей, включая 845 летальных [2]. В Перу в июле 2010 г. зарегистрировано 27 больных, из которых 3 заболевших умерли. В Боливии в августе 2010 года в северных районах, граничащих с Перу, зарегистрировано 8 случаев бубонной чумы, из них 3 – с летальным исходом. В 2004-2011 гг. в Республике Мадагаскар зарегистрировано более 3500 случаев чумы, при 10,5% летальности. В 2012 году больные чумой были выявлены в Уганде, США,

Китае. В США с 1990 по 2012 годы 145 подтвержденных случаев чумы были зарегистрированы в штатах Аризона, Калифорния, Орегон, Колорадо и Нью-Мексико. Из них в 75% чума протекала в бубонной форме (7% смертности), в 21% случаев – в септический (24% смертности) и в 4% – в легочной форме (50% – смертности) [2].

С 1990 по 2003 г. на территории Казахстана было выявлено 23 больных чумой, с 2004 года в республике заболевания людей чумой не регистрируются.

Возрастание числа эпидемических проявлений чумы в мире, наряду с возможностью перемещения авиатранспортом инфицированных *Y. pestis* людей в течение нескольких часов с одного континента на другой, а также возрастающая опасность международного терроризма свидетельствуют об актуальности совершенствования ускоренных и высокочувствительных молекулярно-биологических методов диагностики. Эти методы направлены на генетическую паспортизацию штаммов *Y. pestis* из различных природных очагов, необходимую для выявления источников заражения и проведения адекватных лечебных и санитарно-эпидемиологических мероприятий. Для типирования *Y. pestis* применяют как фенотипические, так и генетические методы. Хотя фенотипические методы и позволяют различать подвиды и биовары *Y. pestis*, с их помощью невозможно проводить дифференциацию на уровне штаммов. К тому же нестабильность проявления фенотипических признаков, их зависимость от условий эксперимента, а также наличие атипичных штаммов существенно затрудняют интерпретацию результатов [3].

К наиболее перспективным методам, позволяющим осуществлять быструю и точную диагностику возбудителей ООИ, относится метод стандартной полимеразной цепной реакции (ПЦР) и его модификации – ПЦР в режиме «реального времени». Основной проблемой, ограничивающей внедрение данных методов в широкую практику противэпидемической службы Казахстана, является отсутствие доступных наборов экспресс-диагностики чумы и других ООИ.

Целью данного исследования – аналитическая характеристика первого отечественного набора «ПЦР тест-система *Yersinia pestis caf1*», предназначенного для обнаружения капсульного антигена чумного микроба, а также идентификация возбудителя чумы с помощью наборов мультилокусной ПЦР-системы для выявления

Таблица 1 – Материалы, использованные для определения аналитических характеристик наборов

Тест-системы для выявления ДНК чумного микроба	Штаммы чумного микроба для определения чувствительности наборов	Микробы для определения специфичности набора
1. ИзоГен (Москва, РФ), ГенПест (Саратов, РосНИПЧИ «Микроб» Экспериментальный ПЦР набор для выявления ДНК чумного микроба, сконструированный в КНЦКЗИ	90 штаммов, выделенных из автономных очагов Среднеазиатского пустынного очага чумы, из Волго-Уральского степного очага, Зауральского степного, Среднеазиатского горного, Таласского природного очага. Вакцинный штамм EB	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Yersinia intermedia</i> , <i>Yersinia frederiksenii</i> , <i>Yersinia kristensenii</i> , <i>Francisella tularensis</i> , <i>Escherichia coli</i>

родоспецифических и видоспецифических участков ДНК чумного микроба.

#### Материал и методы

Для сравнительных характеристик были использованы тест-системы для выявления ДНК чумного микроба производства РФ. Штаммы возбудителя чумы и близкородственных микробов, использованные для определения аналитических характеристик наборов, представлены в таблице 1. Так же были использованы пробы полевого материала: 28 групповых суспензий переносчиков чумной инфекции блох рода *Xenopsylla* – *X. skrjabini* и *X. g. minax*.

Выделение ДНК проводили с использованием наборов производства ИзоГен (Россия), QIAGEN (США) и методом температурного воздействия.

Молекулярно-генетические методы проводились согласно Laboratory Manual of Plague Diagnostic Tests [4].

ПЦР проводили на амплификаторах «Терцик» (ООО «НПО ДНК-технология» для классического варианта, Россия), Rotor Gene 6000 (Corbett Research, Австралия).

Основным принципом отбора штаммов возбудителя чумы была изоляция их из различных автономных очагов чумы на территории РК, типичных для очагов по основным биохимическим признакам, фаголизательности, антигенным свойствам. Чувствительность анализов определяли с использованием бактериальных суспензий штаммов возбудителей инфекций, содержащих  $1 \times 10^1 - 1 \times 10^9$  м.к./мл.

Праймеры для создания мультиплекс тест-системы были разработаны специалистами КНЦКЗИ им. М. Айкимбаева и Медицинского отделения Техасского Университета (The University of Texas Medical Branch (UTMB) г. Галвестон, США) с использованием программного обеспечения BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Разработанные праймеры были синтезированы специалистами КНЦКЗИ совместно со специалистами Института общей генетики и цитологии КН МОН РК (ИОГЦ, Алматы, Казахстан). Конструирование ПЦР тест-системы для выявления ДНК чумного микроба описано в ранее опубликованной работе [5].

#### Результаты и обсуждение

Тест-системы для выявления чумного микроба ИзоГен (Москва), ГенПест (РосНИПЧИ «Микроб»), АмплиСенс (Москва), тест-системы производства США (Idaho Technology Inc.) и экспериментальная тест-система для выявления чумного микроба, сконструированная в референс-лаборатории КНЦКЗИ, предназначены для выявления наличия гена *caf1*, детерминирующего синтез специфического для чумного микроба капсульного антигена Fl. Ген *caf1* кодирует антиген фракции 1 – основной компонент капсулы *Y. pestis*, защищающей ее от фагоцитоза макрофагами.

Сравнительные результаты ПЦР-исследований представлены на рисунках 1-3. Чувствительность диагностических препаратов соответствовала показателям, предъявленным производителями: тест-системы выявляли  $10^1 - 10^3$  м.к./мл. Тест-система для детекции

чумного микроба в ПЦР с визуализацией методом гель-электрофореза производства ИзоГен (Москва РФ) давала яркое свечение бэндов (4+) независимо от титра –  $10^1 - 10^9$  м.к./мл (рис. 1).

В случае тест-системы ГенПест для выявления генов *caf1* и *pla* (Саратов, РФ) свечение полос убывало по мере снижения концентрации микробов в исследуемом материале, чувствительность не уступала продукции предыдущего производителя, т.е. тест-система выявляла

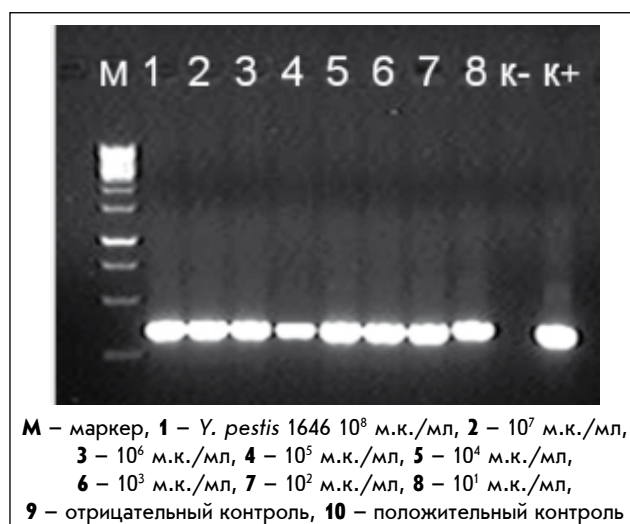


Рисунок 1 – Исследование на определение чувствительности ПЦР тест-системы для выявления гена *caf1* чумного микроба производства ИзоГен

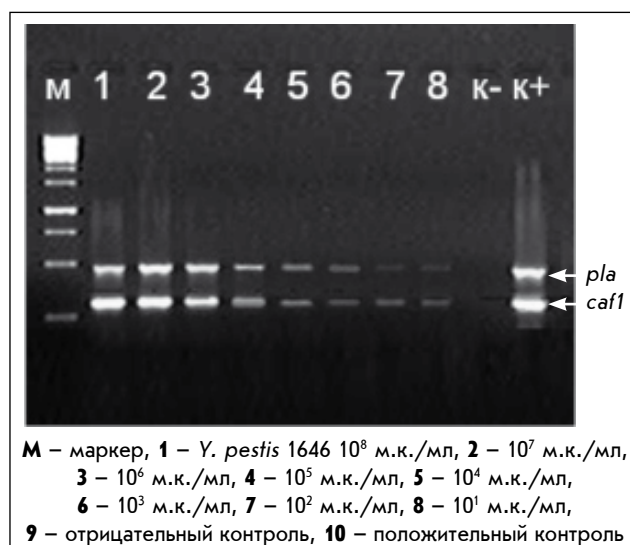


Рисунок 2 – Исследование на определение чувствительности ПЦР тест-системы для выявления гена *caf1* чумного микроба производства ГенПест

единичные бактерии (рис. 2). Визуальная разница в свечении бендов позволяет косвенно судить о концентрации возбудителя в пробе.

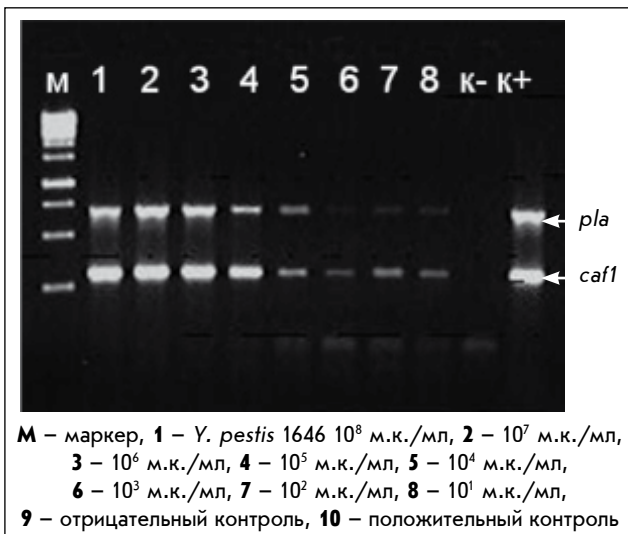


Рисунок 3 – Исследование на определение чувствительности экспериментальной ПЦР тест-системы для выявления гена *caf1* чумного микроба производства КНЦКЗИ

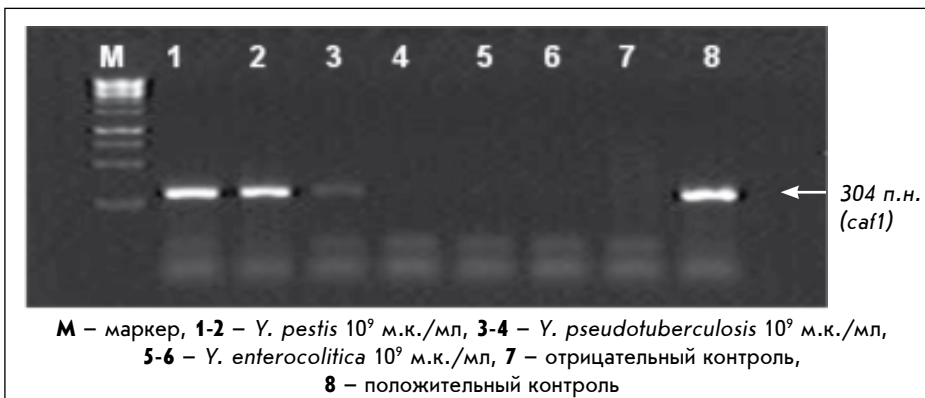


Рисунок 4 – Исследование на определение специфичности экспериментальной ПЦР тест-системы для выявления гена *caf1* чумного микроба производства КНЦКЗИ

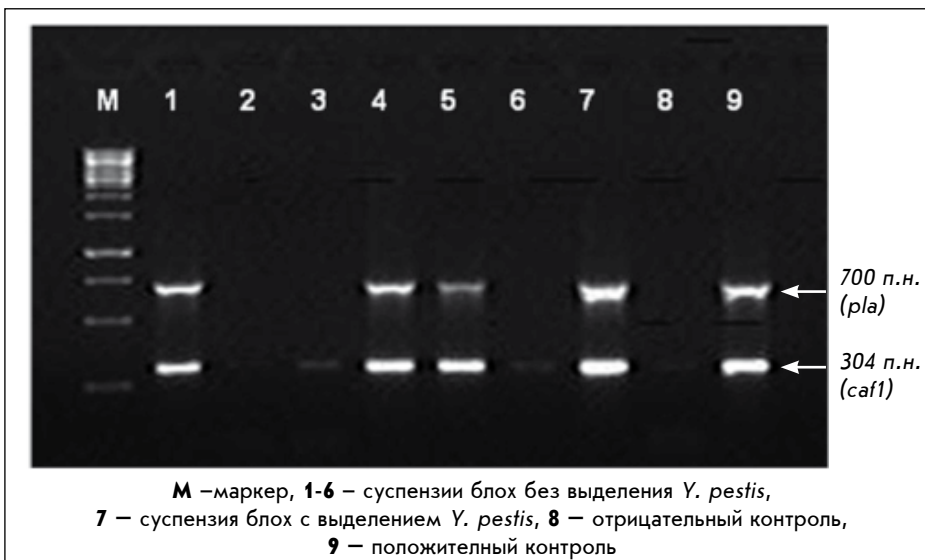


Рисунок 5 – Результаты исследования блох методом ПЦР с использованием экспериментальной тест-системы (КНЦКЗИ)

Результаты изучения экспериментальной тест-системы, созданной на базе референс-лаборатории КНЦКЗИ, были аналогичными чувствительности российской тест-системы ГенПест (рис. 3), выявляла ДНК в суспензии чумного микроба  $10^1$  м.к. в мл.

Для изучения специфичности тест-систем проводилось тестирование с использованием близкородственных чумному микробу штаммов возбудителей псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза, а также штаммов микроорганизмов других родов (сальмонелл, холерного вибриона, туляреминого и бруцеллезного микробов). Специфичность анализов составила 100% (рис. 4, табл. 3).

Далее тест-системы были испытаны на модели проб полевого материала, собранных в ходе эпизоотологического обследования на территории Такумского автономного очага чумы (Жамбылская противочумная станция МЗ РК). Результат изучения аналитических характеристик экспериментальной ПЦР тест-системы (КНЦКЗИ) представлен на рисунке 5. Из 6 суспензий блох с отрицательным бактериологическим результатом 3 пробы дали положительный ПЦР результат. Суспензия блох с положительным бактериологическим результатом была подтверждена в ПЦР с экспериментальным набором КНЦКЗИ. Интенсивность свечения бендов различна, что также дает возможность косвенно судить о степени контаминированности пробы микробом.

Среди коллекционных штаммов были отобраны 28 штаммов чумного микроба, которые по данным серологического изучения считались лишеными капсульного антигена фракции 1 (Ф1). ПЦР-диагностика этих штаммов на наличие гена *caf1*, кодирующего синтез капсульного антигена F1, выявило у 25 штаммов наличие гена капсульного антигена (рис. 6). Отрицательные серологические результаты, скорее всего, связаны с низким содержанием антигена Ф1 в опытных штаммах.

Патогенные иерсинии могут утрачивать некоторые из плазмид. В связи с этим использование представленных на всех трех основных плаزمид *Y. pestis* маркерных генов, позволит повысить точность и специфичность видовой идентификации чумного микроба. В настоящее время ведутся разработки в формате «мультиплекс» ПЦР тест-систем, направленных на выявление родоспецифических и других видоспецифических генов чумного микроба, в частности, генов *yorE*, *pla*, *pst*. Ген *yorE* кодирует эффекторный белок цитотоксического действия Yop E, который, совместно с другими белками группы Yop (*Yersinia outer proteins* – белки внешних мембран иерсиний), вызывает разрушение актинового цитоскелета, блоки-



рование фагоцитоза и ингибирование воспалительного ответа. Ген *yopE*, может служить маркерами принадлежности к патогенным иерсиниям. Ген *pla* кодирует активатор плазминогена (Pla протеазу) – белок внешней мембраны, способный расщеплять плазминоген с образованием пламина. Плазмин, в свою очередь, лизирует фибриновые сгустки, препятствующие диссеминации чумного микроба. Плазмиды pFra (pMT1) и pPCP1 (pPst) свойственны только для чумного микроба и, следовательно, расположенные на них гены, как, например, *caf1* и *pla*, могут быть использованы в качестве маркеров видовой принадлежности.

Первые испытания мультиплекс *yopE*, *pla*, *caf1* – набора выявили 5 штаммов чумного микроба, выделенных в ходе эпизоотологического обследования очаговой территории в Кызылординской области, которые не имели гена *pla*, кодирующего активатор плазминогена, одного из факторов патогенности *Y. pestis* (рис. 7).

Вызывая неконтролируемый протеолиз тканей хозяина, Pla способствует распространению в них бактерий, обеспечивая генерализацию инфекции и повышение вирулентности возбудителя [6].

#### Выводы

Имеющиеся на данный момент на рынке зарубежные тест-системы отличаются высокой стоимостью и длительными сроками поставки. К тому же ни один из имеющихся зарубежных наборов тест-систем не прошел регистрацию в Республике Казахстан. Очевидно, что наиболее адекватным решением данной проблемы может стать производство отечественных тест-систем с учетом потребностей внутреннего рынка Казахстана, а также стран Центральноазиатского региона.

Использованные в данном исследовании коммерческие ПЦР тест-системы: ИзоГен, ГенПест и экспериментальный ПЦР-набор КНЦКЗИ показали высокую чувствительность и специфичность при тестировании на модели штаммов и проб полевого материала. Из 28 коллекционных штаммов чумного микроба, которые согласно серологическим исследованиям являлись бесфракционными, у 25 штаммов в ПЦР обнаружен ген *caf1*, что свидетельствует о высокой чувствительности ПЦР тест-системы производства КНЦКЗИ.

Диагностическое преимущество ПЦР было также показано на модели суспензии блох. Из 7 групповых суспензий блох *X. skrjabini* (ЛЭР «Кромка песков», Таукумский автономный очаг чумы, Жамбылская ПЧС) в четырех суспензиях блох обнаружен ген *caf1*. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости усовершенствования и внедрения методов молекулярной эпидемиологии в систему эпидемиологического контроля природных очагов чумы Казахстана.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1 Бекенов Ж.Е. Современные представления о природных факторах эпидемического потенциала

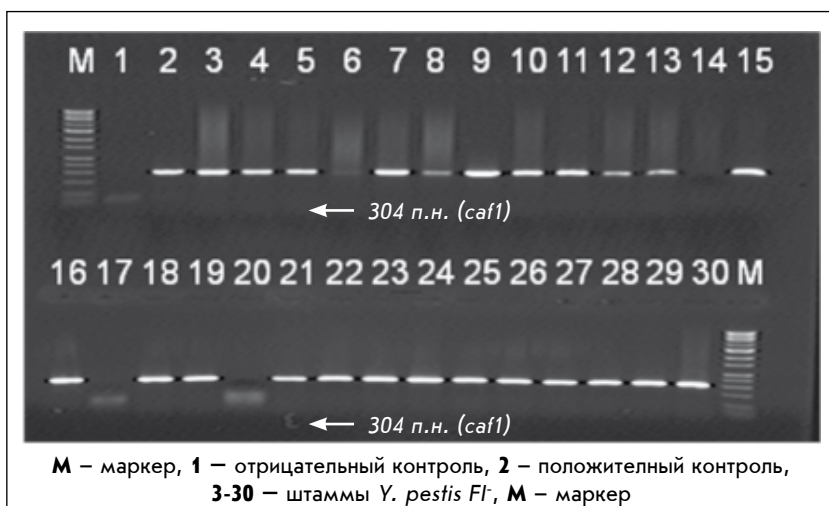


Рисунок 6 – Результаты исследования афракционных штаммов *Y. pestis* методом ПЦР с использованием экспериментальной тест-системы (КНЦКЗИ)

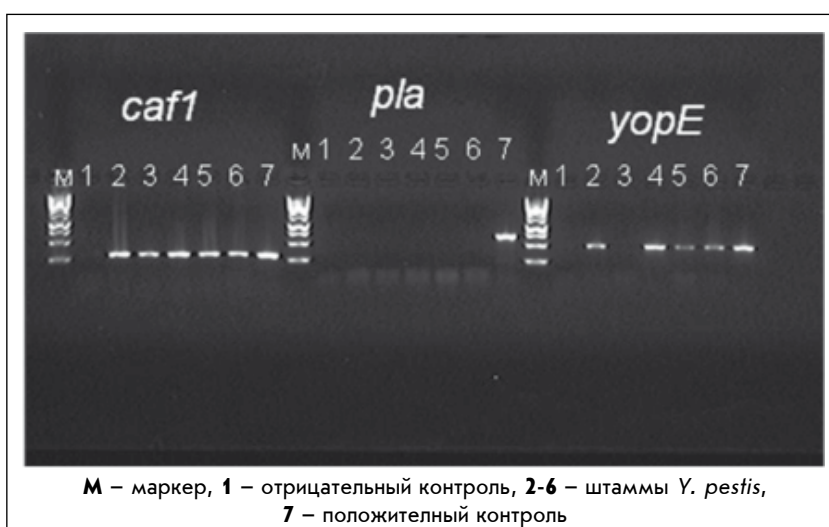


Рисунок 7 – Результаты исследования пяти штаммов *Y. pestis* (Кызылординская область) методом ПЦР с использованием экспериментальных праймеров *yopE*, *pla*, *caf1* (КНЦКЗИ)

чумы // Вестник КазНМУ. – Алматы, 2009 – № 1. – С. 9-15

2 Ежемесячная информация о карантинных заболеваниях за рубежом. – Москва, 2011 – 2012 гг.

3 Кутырев В.В. Актуальные проблемы особо опасных инфекционных болезней и санитарная охрана территорий в современных условиях // Журн. микробиол. – 2008. – № 1. – С. 17-23

4 May C. Chu. Laboratory Manual of Plague Diagnostic tests. -WHO, Geneva, 2000: – 179 p.

5 Абдирасилова А.А. Конструирование тест-системы мультиплексной ПЦР для определения чумного микроба // Гигиена, эпидемиология и иммунобиология. – Алматы, 2012. – № 3 (53). – С. 25-29

6 Куклев В. Е., Куличенко А. Н. Разработка мультилокусной ПЦР для детекции фрагментов хромосомы возбудителя чумы // Мат. VI Межгосуд. научно-практ. конф. государств-участников СНГ «Санитарная охрана территорий государств-участников Содружества Независимых Государств, проблемы биологической безопасности и противодействия биотерроризму в современных условиях» (13 – 14 сентября 2005 г.) – Волгоград, 2005. – С. 252-253

## Т Ұ Ж Ы Р Ы М

А.А. АБДИРАСИЛОВА

*М.Айкимбаев атындағы Карантин және зоонозды инфекциялардың Қазақ ғылыми орталығы, Алматы қ.*  
**ОБАНЫҢ ТАБИҒИ КӨЗДЕРІН БАҚЫЛАУДАҒЫ МОЛЕКУЛЯРЛЫ ЭПИДЕМИОЛОГИЯ**

КНЦКЗИ өндірудің экспериментальды ПЦР жиынтығы дала материалы штаммдары мен сынамалары моделіндегі тестілеу кезіндегі жоғары сезімталдық және ерекшелікті көрсетті. Бұрын серологиялық зерттеулерге сәйкес фракционсыз деп есептелген оба микробозының коллекциялық штаммдары жиынтығынан КНЦКЗИ, ПЦР әдісімен 89% штаммдарда *cafI* гені анықталған. ПЦР диагностикалық артықшылығы биттер суспензиясы моделінде көрсетілген болатын. Алынған нәтижелер молекулярлы эпидемиология әдістерін жетілдіру және Қазақстанның обаның табиғи көздерін эпидемиологиялық бақылау жүйесіне енгізу қажеттілігі туралы куәландырады.

## SUMMARY

A.A. ABDIRASILOVA

*The Kazakh scientific center of quarantine and zoonous infections named after M. Aikimbayev, Almaty c.*

**MOLECULAR EPIDEMIOLOGY IN CONTROL OVER NATURAL PLAGUE FOCI**

The experimental PCR kit produced by the Kazakh scientific center of quarantine and zoonous infections (KSCQZI) showed high sensitivity and specificity at testing for field data strain models and samples. Out of the KSCQZI collection strains of plague microbes, which were considered fractionless according to the serologic examinations, 89% of strains showed the presence of *cafI* genes by PCR method. The diagnostic advantage of PCR was also demonstrated on the flea suspension model. The obtained results indicate the necessity of improvement and introduction of molecular epidemiology methods into the system of epidemiological supervision of natural plague foci in Kazakhstan.

УДК 616.34-008.314.4-002

Г.Ж. САРТАЕВА

*Медицинский центр «Medical Assistance Group», г. Астана*

**ИНФЕКЦИОННАЯ ДИАРЕЯ В ПРАКТИКЕ ВРАЧА-ТЕРАПЕВТА**

*Диарея инфекционной природы принадлежит в настоящее время к числу наиболее распространенных заболеваний и занимает по своей частоте второе место после острых воспалительных заболеваний верхних дыхательных путей.*

**Ключевые слова:** *инфекционная диарея, иммунологические методы диагностики, антибактериальные препараты, антибиотикотерапия.*

**В**озбудителями инфекционной диареи могут быть различные агенты, способные определять своеобразие клинической картины заболевания, особенностями диагностики и лечения [1, 2].

В структуре этиологических факторов бактериальной диареи в настоящее время произошли существенные изменения. Уменьшилась частота инфекционной диареи, вызванной привычными возбудителями (шигеллами, сальмонеллами), и возросло число случаев заболеваний, обусловленных энтеропатогенными штаммами кишечной палочки и кампилобактерной инфекцией [3].

Патофизиологические механизмы бактериальной диареи включают в себя выработку энтеротоксина, повышающего активность аденилатциклазы и стимулирующего таким образом секрецию воды и электролитов энтероцитами (например, при инфекции, вызванной холерным вибрионом, клостридиями, энтеротоксигенными штаммами кишечной палочки), или же непосредственную инвазию бактерий в эпителиальные клетки слизистой оболочки кишечника с их последующим повреждением и развитием воспалительной реакции (при шигеллезной инфекции, инфекции, вызванной энтероинвазивными штаммами кишечной палочки, иерсиниозе, сальмонеллезе).

Диагностика бактериальной диареи предполагает проведение клинического анализа крови (выявляется лейкоцитоз со сдвигом формулы влево) и ректороманоскопии (картина острого проктосигмоидита при шигеллезной инфекции), а также поиск этиологического фактора, послужившего причиной ее развития. Посев кала с его последующим микробиологическим исследованием дает положительный результат примерно у 40-60% больных с острой диареей, протекающей с лихорадкой и появлением лейкоцитов в кале [4]. При отрицательных результатах посевов используют иммунологические методы диагностики. Так, применение

иммуноферментных методов позволяет обнаружить антитела к кампилобактеру и сальмонеллам. Энтеротоксины патогенных штаммов кишечной палочки можно выявить с помощью полимеразной цепной реакции и латексной агглютинации. При шигеллезах уже в первые дни болезни при использовании метода гемагглютинации можно определить антитела к антигену 0.

Антибактериальные препараты, прежде широко применявшиеся при лечении бактериальной диареи, в настоящее время назначаются дифференцированно, с учетом вида возбудителя и тяжести течения заболевания. Следует иметь в виду, что многие формы инфекционной диареи заканчиваются самоизлечением в течение 5 дней на фоне регидратационной терапии [5].

Антибиотикотерапия, проводимая у больных с шигеллезом, способствует уменьшению длительности лихорадки и укорочению периода носительства микроорганизмов. Препаратом выбора является ко-тримоксазол, назначаемый в дозе 960 мг 2 раза в день в течение 5 дней. С учетом возможной устойчивости к данному препарату вместо него можно применять также налидиксовую кислоту (по 1 г 4 раза в день), норфлоксацин (по 400 мг 2 раза в день) или ципрофлоксацин (по 500 мг 2 раза в день). Ампициллин и доксициклин используются лишь при подтверждении чувствительности к ним высеянных штаммов бактерий. В качестве резервного метода лечения рассматривается применение цефтриаксона (по 1 г в день внутривенно в течение 5 дней).

При лечении неосложненного кампилобактериоза антибиотики обычно не играют существенной роли, поскольку клинические проявления этого заболевания часто полностью стихают в таких случаях еще до выявления возбудителя. Антибактериальные средства применяются обычно при тяжелом течении заболевания, выраженной интоксикации, наличии крови в кале. Основным препаратом для лечения кампилобактериоза служит эритромицин,