

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 579.881.1:579.251.083.3

Карташов М.Ю.^{1,2,3}, Микрюкова Т.П.^{1,3}, Терновой В.А.^{1,3}, Москвитина Н.С.³, Локтев В.Б.^{1,2,3,4}**ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ДНК РИККЕТСИЙ МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ**¹ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», 630559, Кольцово, Россия;²Новосибирский государственный университет, 630090, г. Новосибирск, Россия; ³Томский государственный университет, 634050, г. Томск, Россия; ⁴Институт цитологии и генетики, 630090, г. Новосибирск, Россия

Статья посвящена разработке высокоэффективного метода выявления генетического материала риккетсий, основанного на полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием оригинальных праймеров к наиболее консервативным участкам гена цитратсинтазы (*gltA*). Аналитическая чувствительность разработанного ПЦР-РВ-теста позволяет выявлять от 80 геном-эквивалентов в анализируемой пробе в течение 3 ч. Высокая специфичность тест-системы экспериментально подтверждена определением нуклеотидных последовательностей амплифицированных фрагментов гена *gltA*. Апробация ПЦР-РВ-теста проведена на коллекции из 310 клещей видов *I. persulcatus*, *I. pavlovskyi*, *D. reticulatus*. Показано, что разработанный вариант праймеров и зонда позволяет с высокой степенью чувствительности и специфичности выявлять ДНК различных видов риккетсий, распространенных на территории России (*R. sibirica*, *R. raoultii*, *R. helvetica*, *R. tarasevichiae*). Предлагаемый ПЦР-РВ-тест может быть также использован для выделения фрагмента гена *gltA* с целью определения нуклеотидной последовательности и последующего генотипирования риккетсий. Использование предложенного метода облегчит задачу мониторинга природных очагов риккетсиозов.

К л ю ч е в ы е с л о в а: риккетсии; риккетсиозы; иксодовые клещи; полимеразная цепная реакция в режиме реального времени.

Для цитирования: Клиническая лабораторная диагностика. 2015; 60(12): 39–43.

Kartashov M.Yu.^{1,2,3}, Mikryukova T.P.^{1,3}, Ternovoi V.A.^{1,3}, Moskvitina N.S.³, Loktev V.B.^{1,2,3,4}

THE HIGHLY EFFECTIVE DETECTION OF DNA RICKETSIA USING TECHNIQUE OF POLYMERASE CHAIN REACTION IN REAL-TIME

¹The state research center of virology and biotechnology "Vektor", 630559 Koltsovo, Russia; ²The Novosibirskii state university, 630090 Novosibirsk, Russia; ³The Tomskii state university, 634050 Tomsk, Russia; ⁴The institute of cytology and genetics, 630090 Novosibirsk, Russia

The article considers development of highly effective technique of detection of genetic material of rickettsia based on polymerase chain reaction in real-time using original primers to the most conservative sites of gene of citrate synthase (*gltA*). The analytical sensitivity of the developed polymerase chain reaction in real-time test permits to detect from 80 genome equivalents in analyzed sample during three hours. The high specificity of test-system is substantiated by detection of nucleotide sequences of amplified fragments of gene *gltA*. The approbation of the polymerase chain reaction in real-time test is carried out on collection of 310 ticks of species *I. persulcatus*, *I. pavlovskyi*, *D. reticulatus*. It is demonstrated that the developed alternate of primers and probe permits with high degree of sensitivity and specificity to detect DNA of different species of rickettsia widespread on territory of Russia (*R. sibirica*, *R. raoultii*, *R. helvetica*, *R. tarasevichiae*). The proposed polymerase chain reaction in real-time test can be applied for isolation of fragment of gene *gltA* with purpose for detecting nucleotide sequence and subsequent genetic typing of rickettsia. The application of the proposed technique can facilitate task of monitoring hot spots of rickettsiosis.

Key words: rickettsia; rickettsiosis; tick; polymerase chain reaction in real-time

Citation: Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika. 2015; 60 (12): 39–43. (in Russ.)

Введение. Род *Rickettsia* (семейство *Rickettsiaceae*) представлен мелкими полиморфными α-протеобактериями, являющимися облигатными внутриклеточными паразитами эукариотических клеток. Многие виды риккетсий являются возбудителями различных инфекционных заболеваний человека – риккетсиозов, число которых постоянно увеличивается [1, 2]. Передача инфекции осуществляется широким кругом кровососущих членистоногих (клещами, вшами, блохами). Одним из наиболее значимых риккетсиозов является сыпной тиф, вызываемый *R. prowazekii*, переносчиком которой является платяная вошь. Так, сыпной тиф унес жизни более 3 млн человек в России в 1917–1923 гг. [3]. Важное значение в инфекционной патологии человека имеют риккетсии группы клещевой пятнистой лихорадки (ГКПЛ), передающиеся

иксодовыми клещами различных видов [4, 5]. ГКПЛ включает возбудителя пятнистой лихорадки Скалистых гор (*R. rickettsii*), возбудителя марсельской лихорадки (*R. conorii*), возбудителя японской клещевой пятнистой лихорадки (*R. japonica*) и некоторых других риккетсиозов, распространенных практически на всех континентах. Важность изучения патогенности риккетсий также обуславливается возможностью их применения с биотеррористическими целями [6].

На территории Российской Федерации регистрируется заболеваемость североазиатским клещевым риккетсиозом (риккетсиоз Средней Азии, сибирский клещевой тиф), Астраханской пятнистой лихорадкой и дальневосточным клещевым риккетсиозом [7]. Североазиатский клещевой риккетсиоз, возбудителем которого является *R. sibirica*, регистрируется преимущественно на юге Западной и Восточной Сибири, Дальнего Востока, а также в Казахстане, Киргизстане, Монголии и Китае [8, 9]. Так, в 2013 г. на территории России было зафиксировано 1567 случаев этого заболевания, в 2012 г. – 1759 случаев. Эпидемически активные очаги Астраханской пятнистой лихорадки располагаются в Астраханской области и смежных с ней

Для корреспонденции: Карташов Михаил Юрьевич, kartashov_myu@vector.nsc.ru

For correspondence: Kartashov M. Yu, kartashov_myu@vector.nsc.ru

территориях (Калмыкия, Волгоградская область) [10]. Возбудителем данного заболевания является *R. conorii subsp. caspia*. В 2013 г. на территории России было зарегистрировано 397 случаев Астраханской пятнистой лихорадки (официальная регистрация ведется только с 2013 г.). Дальневосточный клещевой риккетсиоз, вызываемый *R. heilongjiangensis*, встречается в Хабаровском крае и Амурской области [11]. Использование молекулярно-биологических методов позволило обнаружить генетический материал и других патогенных для человека видов риккетсий (*R. slovaca*, *R. raoultii*, *R. helvetica*, *R. aeschlimannii*, *R. tarasevichiae*), а также риккетсий с неустановленной патогенностью для человека в клещах, собранных на территории России [8, 12, 13]. Заболевания, вызываемые риккетсиями, могут иметь различные клинические проявления, в основном неспецифические (головная боль, повышение температуры, тошнота, сопровождающаяся рвотой, воспаление регионарных лимфоузлов, сыпь), поэтому риккетсиозы довольно трудно диагностировать [14]. В зависимости от генетических особенностей как возбудителя, так и пациента клиническая картина риккетсиозов может сильно изменяться, что существенно затрудняет диагностику этой группы инфекционных заболеваний. Поэтому в диагностике риккетсиозов особое значение имеют лабораторные методы анализа – микробиологические, серологические и молекулярно-биологические [14–17]. Совершенствование этих методов принципиально важно для более быстрой и надежной диагностики риккетсиозов, в том числе протекающих с атипичной симптоматикой, для идентификации различных видов риккетсий, а также откроет новые возможности для мониторинга природных очагов риккетсиозов и проведения научных исследований.

В лабораторной диагностике инфекционных заболеваний все чаще используется полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ПЦР-РВ), характеризующаяся высокой чувствительностью и специфичностью, а также значительным сокращением времени проведения анализа.

Цель настоящего исследования – разработка и апробация новой экспериментальной тест-системы для выявления ДНК различных видов риккетсий методом ПЦР-РВ в клинических и природных образцах.

Материалы и методы. Нуклеотидные последовательности гена цитратсинтазы: [*R. prowazekii* (CP004888), *R. typhi* (AE017197), *R. sibirica* (JX945526), *R. asiatica* (AB297810), *R. helvetica* (KM288467), *R. raoultii* (EU036985), *R. rickettsii* (DQ150686), *R. slovaca* (U59725), *R. conorii subsp. caspia* (U59728), *R. aeschlimannii* (DQ235776), *R. peacockii* (DQ100162), *R. japonica* (AY743327), *R. heilongjiangensis* (AB473812), *R. tarasevichiae* (DQ168981), *R. canadensis* (U59713)] были выбраны для анализа и конструирования праймеров в международной базе данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Сравнительный анализ и выравнивание нуклеотидных последовательностей были проведены с использованием пакетов программ MEGA 6.06 и DNASTAR Lasergene 7.0. Дизайн олигонуклеотидов выполняли с помощью программы PerlPrimer v1.1.21 и VectorNTI 8.

Иксодовых клещей собирали в биотопах Томской и Новосибирской областей, как описано нами ранее [18]. Суспензии клещей приготавливали путем растирания в ступке с 300 мкл фосфатно-солевой буфера (рН 7,4). Для выделения суммарной нуклеиновой кислоты из суспензий клещей после их индивидуальной гомогенизации использовали коммерческие наборы Литех («Литех», Россия) или «РИБО-Преп» (ЦНИИЭ, Россия) согласно инструкциям производителей.

ПЦР-РВ, а также детекцию флуоресценции (на канале ROX) проводили на приборах как плащечного типа – DT-lite («ДНК-Технология», Россия) и CFX96 Touch («BioRad», США), так и роторного типа – Rotor Gene 6000 («Corbett Research», Австралия). Концентрацию нуклеиновых кислот в контрольных материалах определяли спектрофотометрически с помощью флуориметра «Qubit 2.0» («Invitrogen», США). Оптимизацию ПЦР-РВ проводили с использованием в качестве ДНК-матрицы рекомбинантной плазмиды pCR 2.1 («Invitrogen», США) со вставкой фрагмента гена-мишени *gltA* (в количестве 1000 копий плазмидной ДНК на реакцию).

В качестве ПЦР набора сравнения была использована пара праймеров CS409d (5'-CCTATGGCTATGCTTGC-3') и RP1258n (5'-ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA-3'), предназначенных для выявления фрагмента гена *gltA* длиной 769 н. в ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации. Реакцию амплификации проводили на приборе T100 («BioRad», США). Продукты амплификации разделяли в 2% агарозном геле, их визуализацию проводили путем окрашивания геля бромистым этидием с последующим освещением УФ-спектром.

Для идентификации вида риккетсий определяли нуклеотидную последовательность фрагмента гена цитратсинтазы. Секвенирование осуществляли по методу Сэнгера с помощью набора реагентов BigDy v.3.1 на автоматическом секвенаторе «ABI Prism 3130xl DNA Analyser» («Applied Biosystems», США). Сравнение установленных нуклеотидных последовательностей с представленными в базе данных GenBank проводили с использованием поисковой системы BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Результаты и обсуждение. Для исследования генетического разнообразия риккетсий наиболее часто используются нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК, цитратсинтазы (*gltA*), поверхностного белка А (*ompA*), поверхностного белка В (*ompB*), 17 kDa белка [15, 19]. Нуклеотидные последовательности генов *ompA*, *ompB* и 17 kDa белка достаточно вариабельны, что не позволяет подобрать родоспецифические праймеры для целей диагностики. Последовательности генов 16S рРНК и *gltA* являются достаточно консервативными, при этом последовательность гена 16S рРНК является чрезвычайно консервативной. Таким образом, в качестве гена-мишени для разрабатываемой нами ПЦР-РВ-системы был выбран ген *gltA*, кодирующий один из ферментов цикла трикарбоновых кислот. Анализ известных последовательностей гена *gltA* позволил найти достаточно консервативные участки гена *gltA*, пригодные для дизайна диагностических олигонуклеотидных праймеров и зонда.

При конструировании олигонуклеотидов учитывались следующие требования: отсутствие протяженных участков повторяющихся нуклеотидов, а также комплементарных последовательностей длиной более трех оснований внутри олигонуклеотидов, высокое содержание GC-оснований (не менее 50%). Таким образом, в работе была выбрана пара праймеров длиной 17 и 23 нуклеотида, а также ДНК-зонд длиной 26 нуклеотидов. Структура разработанных праймеров и зонда представлены в табл. 1.

В качестве флуоресцентной метки на 5'-конце зонд содержал флуорофор ROX (поглощение λ 585 нм; флуоресценция λ 610 нм), на 3'-конце гаситель флуоресценции BHQ2. В качестве положительного контрольного образца в ПЦР-РВ была использована рекомбинантная плазмидная ДНК pCR2.1 содержащая нуклеотидную последовательность фрагмента гена *gltA*.

Амплификацию проводили в 30 мкл реакционной смеси, оптимизированный состав которой приведен в табл. 2.

При выборе оптимальных параметров проведения ПЦР-РВ температуру гибридизации праймеров изменяли в диапа-

Таблица 1

Структура праймеров и зонда

Праймер/ зонд	Нуклеотидная последовательность (5'→3')	Длина ПЦР-продукта, п.н.
PrF_gltA	5'-GGCTTCGGTCATCGTGT-3'	
PrR_gltA	5'-TTGCTATTTGTAAGAGCGGATTG-3'	120
Z(ROX)_gltA	ROX-CCACGTGCCGCGAGTACTTAAAGAAAC-BHQ2'	

Таблица 2

Состав реакционной смеси (с использованием SmartTaq ДНК-полимеразы («Медиген», Россия))

Компонент реакционной смеси	Количество компонента на одну пробу (V=30 мкл), мкл
Исследуемый образец ДНК	5
Taq буфер без Mg2+ (×10)	3
Раствор MgCl2 (100 mM)	1
Раствор dNTP (5 mM)	1
Праймер прямой (2-3 μM; ≈2 о.е.)	1,5
Праймер обратный (2-3 μM; ≈2 о.е.)	1,5
Флуоресцентный зонд (2-3 μM; ≈2 о.е.)	1,5
SmartTaq ДНК-полимеразы (5 ед. акт./мкл)	0,3
Вода для ПЦР (деионизированная)	15,2

Примечание. ед. акт. – единицы активности; о.е. – оптические единицы.

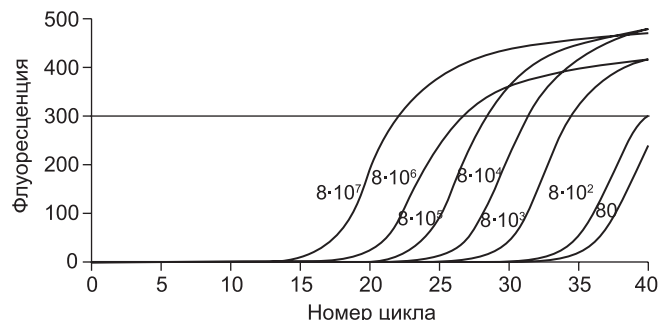
Таблица 3

Оптимальный протокол проведения ПЦР-РВ

Этап ПЦР-РВ	Температура, °C	Время	Количество циклов
Активация HotStart (Smart) ДНК-полимеразы	95	5 мин	1
или			
Активация Taq ДНК-полимеразы	95	40 с	1
Денатурация ДНК	95	15 с	40
Отжиг праймеров (детекция на канале ROX)	60	20 с	
Элонгация	72	20 с	

зоне 54–64°C. Экспериментально были подобраны оптимальные временные промежутки инкубации (временной диапазон для стадий денатурации, отжига праймеров и элонгации варьировал от 10 до 40 с с шагом в 5 с). В ходе исследования был подобран оптимальный протокол проведения ПЦР-РВ, представленный в табл. 3. В соответствии с подобранным протоколом время проведения анализа на большинстве амплификаторов, применяемых для ПЦР-РВ, составляет не более 2 ч. С учетом этапа пробоподготовки (гомогенизации клещей и выделения нуклеиновых кислот) суммарное время анализа составляет примерно 3 ч.

Результаты оценки аналитической чувствительности ПЦР-РВ представлены на рисунке. Значение минимальной аналитической чувствительности составило 80 геном-эквивалентов на реакцию.



Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации рекомбинантной плазмиды в реакции (концентрация выражена в геном-эквивалентах на реакцию). Данные получены на приборе DT-lite («ДНК-Технология», Россия).

Эксперимент по оценке аналитической чувствительности разрабатываемой тест-системы был выполнен также с использованием ДНК-полимераз различных фирм-производителей. Показано, что для надежного обнаружения ДНК риккетсий возможно применение как Smart, так и Taq ДНК-полимераз (табл. 4).

Специфичность разрабатываемой ПЦР-РВ определялась в два этапа. На первом этапе специфичность праймеров и ДНК-зонда была проанализирована с использованием поисковой системы BLAST в режиме online. Нуклеотидные последовательности праймеров/зонда проверяли на наличие гомологии со всеми известными нуклеотидными последовательностями в международной базе данных GenBank. Выбранные праймеры и ДНК-зонд не имели гомологии с человеческой ДНК. На втором этапе аналитическая специфичность была оценена нами экспериментально. Для этого использовали панель, содержащую геномную ДНК человека, мыши, клещей различных видов (*Ixodes persulcatus*, *Ixodes pavlovskiy*, *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus*, *Hyalomma anatolicum*), возбудителей других инфекций, передающихся клещами (*Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia muris*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, *Babesia divergens*, *Babesia microti*, кДНК вируса клещевого энцефалита штаммов 205 и Коларово-2008). Отрицательные результаты ПЦР-РВ анализа с каждым из вышеперечисленных образцов позволяют оценить специфичность набора по использованной выборке образцов как 100%.

Для оценки возможности применения разработанной тест-системы для анализа полевых проб была сформирована коллекция из 310 образцов гомогенатов клещей, которую разделили на 4 выборки. В качестве метода сравнения использован метод ПЦР с электрофоретической детекцией образца и известная пара праймеров CS409d/RP1258n [13]. Положительные образцы, выявленные с использованием праймеров CS409d/RP1258n, были генотипированы путем

Таблица 4

Зависимость значений Ct от концентрации рекомбинантной плазмиды при ее выявлении с использованием различных видов ДНК-полимераз и детекцией результатов на различных приборах

Используемый термоциклер (производитель)	Используемая ДНК-полимераза (производитель)	Количество ДНК-матрицы (копий гена-мишени на реакцию)						
		8·10 ⁷	8·10 ⁶	8·10 ⁵	8·10 ⁴	8·10 ³	8·10 ²	8·10 ¹
DT-lite («ДНК-Технология», Россия)	SmartTaq («Медиген», Россия)	15,5	19,1	22,5	25,9	29,1	34,1	35,7
	Taq («Медиген», Россия)	15,6	18,9	23,9	26,1	30,8	33,7	35,9
	Taq («СибЭнзим», Россия)	15,6	19,4	22,7	26,7	29,7	33,8	36,1
CFX-96 («Bio-Rad», США)	SmartTaq («Медиген», Россия)	14,9	18,7	22,2	26,1	28,8	34,1	36,5
Rotor-Cene 3000 («Corbett Research», Австралия)	SmartTaq («Медиген», Россия)	14,5	18,3	21,1	25,5	28,6	34,1	36,0

Характеристика исследуемых выборок и результаты сравнительного анализа

Выборка	Объем выборки	Вид клещей	Место сбора клещей	Вид патогена (подтвержден секвенированием фрагмента гена <i>gltA</i>)	Количество инфицированных образцов		Сходимость результатов, %
					ПЦР (CS409d/RP1258n)	ПЦР-РВ	
1	10	<i>D. reticulatus</i>	Новосибирская область	<i>R. sibirica</i>	5	5	100
2	50	<i>D. reticulatus</i>	То же	<i>R. raoultii</i>	20	20	100
3	50	<i>I. persulcatus</i>	" "	<i>R. helvetica</i>	20	20	100
4	200	<i>I. persulcatus</i> , <i>I. pavlovskyi</i>	Томская область	<i>R. tarasevichiae</i>	50	52	99

секвенирования. Для решения вопроса о влиянии этапа пробоподготовки на ход ПЦР-РВ, апробация проведена с образцами ДНК, выделенными как методом фенол-хлороформной экстракции (выборки 1–3), так и сорбционным методом (выборка 4). При параллельном анализе результаты выявления ДНК *R. sibirica*, *R. helvetica* и *R. raoultii* совпали в 100% случаев, а по определению ДНК *R. tarasevichiae* – в 99% случаев (табл. 5). Полученное расхождение может быть объяснено более высокой чувствительностью метода ПЦР-РВ по сравнению с таковой ПЦР с электрофоретической детекцией. Показано, что различные методы выделения нуклеиновых кислот пригодны для применения разработанной тест-системы.

С использованием разработанного набора праймеров генетический материал *Rickettsia* spp. может быть определен в клинических образцах, наиболее подходящих для диагностики риккетсиозов методом ПЦР (цельная кровь, сгустки крови, биоптаты кожи, а также секционный материал).

Заключение. Разработан лабораторный вариант экспериментальной тест-системы с использованием методологии ПЦР в реальном времени для выявления генетического материала различных представителей рода *Rickettsia*. Для конструирования ПЦР-РВ-теста использовались оригинальные праймеры, комплементарные к наиболее консервативным участкам гена цитратсинтазы риккетсий. Выбранные праймеры и ДНК-зонд не имеют гомологии с человеческой ДНК и не взаимодействуют с геномной ДНК человека, мыши, клещей различных видов (*I. persulcatus*, *I. pavlovskyi*, *I. ricinus*, *D. reticulatus*, *H. anatolicum*), генетическим материалом возбудителей клещевых инфекций (*A. phagocytophilum*, *E. muris*, *E. canis*, *B. burgdorferi*, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. divergens*, *B. microti*, кДНК вируса клещевого энцефалита), обеспечивая 100% специфичность ПЦР-РВ. Показано, что тест-система ПЦР-РВ обладает высокой чувствительностью, что позволяет надежно выявлять ДНК риккетсий в концентрации от 80 геном-эквивалентов и более в исследуемом образце. Общее время проведения анализа составляет 3 ч. Специфичность выявления генетического материала риккетсий подтверждена определением нуклеотидных последовательностей амплифицированных фрагментов гена *gltA* риккетсий.

Данная тест-система была апробирована на 310 образцах клещей видов *I. persulcatus*, *I. pavlovskyi*, *D. reticulatus*. Результаты анализа по выявлению ДНК риккетсий в клещах различных видов, полученные с помощью тест-системы ПЦР-РВ и ПЦР-теста с электрофоретической регистрацией результатов совпали на 99–100%. Разработанная тест-система позволяет надежно выявлять ДНК *R. sibirica*, *R. raoultii*, *R. helvetica* и *R. tarasevichiae*, распространенных на территории России и сопредельных государств. Модификация предложенного метода может быть также использована для амплификации фрагмента гена цитратсинтазы с целью последующего секвенирования и генотипирования *Rickettsia* spp.

Исследование выполнено при поддержке ГК №6.657.2014/К и 1411740142, а также гранта РФФИ № 15-34-50113.

ЛИТЕРАТУРА

- Oteo J., Portillo A. Tick-borne rickettsioses in Europe. *Ticks Tick Borne Dis.* 2012; 3(5-6): 271–8.
- Parola P., Paddock C.D., Socolovschi C., Labruna M.B., Medianikov O., Kernif T. et al. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clin. Microbiol. Rev.* 2013; 26(4): 657–702.
- Perlman S.J., Hunter M.S., Zchori-Fein E. The emerging diversity of *Rickettsia*. *Proc. Biol. Sci.* 2006; 273 (1598): 2097–106.
- Walker D.H. Rickettsioses of the spotted fever group around the world. *J. Dermatol.* 1989; 16(3): 169–77.
- Brouqui P., Parola P., Fournier P.E., Raoult D. Spotted fever rickettsioses in southern and eastern Europe. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2007; 49(1): 2–12.
- Azad A.F., Beard C.B. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. *Emerg. Infect. Dis.* 1998; 4(2): 179–86.
- Тарасевич И.В. Современные представления о риккетсиях. *Клиническая микробиология и антимикробная терапия.* 2005; 7(2): 119–29.
- Шпынов С.Н. Эколого-эпидемиологические и молекулярно-генетические аспекты изучения природных очагов риккетсиозов и эрлихиозов в России: Дис. ... докт. мед. наук. Омск; 2004.
- Рудаков Н.В., Шпынов С.Н., Ястребов В.К., Самойленко И.Е., Кумпан Л.В., Решетникова Т.А. и др. Основные итоги разработки проблемы риккетсиозов, передающихся иксодовыми клещами в России. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2012; 66(5): 29–33.
- Tarasevich I.V., Makarova V.A., Fetisova N.F., Stepanov A.V., Miskarova E.D., Balayeva N. et al. Astrakhan fever, a spotted-fever rickettsiosis. *Lancet.* 1991; 337(8734): 172–3.
- Mediannikov O.Y., Sidelnikov Y., Ivanov L., Mokretsova E., Fournier P.E., Tarasevich I. et al. Acute tick-borne rickettsiosis caused by *Rickettsia heilongjiangensis* in Russian Far East. *Emerg. Infect. Dis.* 2004; 10(5): 810–7.
- Rydkina E., Roux V., Fetisova N., Rudakov N., Gafarova M., Tarasevich I. et al. New *Rickettsia* in ticks collected in territories of the former soviet union. *Emerg. Infect. Dis.* 1999; 5(6): 811–4.
- Shpynov S.N., Fournier P.E., Rudakov N.V., Samoilenko I.E., Reshetnikova T.A., Yastrebov V.K. et al. Molecular identification of a collection of spotted fever group rickettsiae obtained from patients and ticks from Russia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2006; 74(3): 440–3.
- Еремеева М.Е., Шпынов С.Н., Токаревич Н.К. Современные подходы к лабораторной диагностике риккетсиозов. *Инфекция и иммунитет.* 2014; 4(2): 113–34.
- Scola B., Raoult D. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35(11): 2715–27.
- Малеев В.В. Обзор Европейских рекомендаций по диагностике клещевых бактериальных инфекций. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2005; 7(2): 130–53.
- Рудаков Н.В., Самойленко И.Е., Решетникова Т.А. Проблемы лабораторной диагностики риккетсиозов группы клещевой пятнистой лихорадки в России. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2015; 60(1): 50–2.
- Чаусов Е.В., Терновой В.А., Протопопова Е.В., Коновалова С.Н., Кононова Ю.В., Першикова Н.Л. и др. Генетическое разнообразие

инфекционных агентов, переносимых иксодовыми клещами в г. Томске и его пригородах. *Паразитология*. 2009; 43(5): 374–88.

19. Roux V., Rydkina E., Ereemeeva M., Raoult D. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1997; 47(2): 252–61.

Поступила 01.08.15

REFERENCES

- Oteo J., Portillo A. Tick-borne rickettsioses in Europe. *Ticks Tick Borne Dis.* 2012; 3(5-6): 271–8.
- Parola P., Paddock C.D., Socolovschi C., Labruna M.B., Mediannikov O., Kernif T. et al. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clin. Microbiol. Rev.* 2013; 26(4): 657–702.
- Perlman S.J., Hunter M.S., Zchori-Fein E. The emerging diversity of Rickettsia. *Proc. Biol. Sci.* 2006; 273 (1598): 2097–106.
- Walker D.H. Rickettsioses of the spotted fever group around the world. *J. Dermatol.* 1989; 16(3): 169–77.
- Brouqui P., Parola P., Fournier P.E., Raoult D. Spotted fever rickettsioses in southern and eastern Europe. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2007; 49(1): 2–12.
- Azad A.F., Beard C.B. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. *Emerg. Infect. Dis.* 1998; 4(2): 179–86.
- Tarasevich I.V. Modern views on the Rickettsiae. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya terapiya*. 2005; 7(2): 119–29. (in Russian)
- Shpynov S.N. *Ecological, Epidemiological and Molecular-genetic Aspects of the Study of Natural Foci of Rickettsioses and Ehrlichiosis in Russia*: Diss. Omsk; 2004. (in Russian)
- Rudakov N.V., Shpynov S.N., Yastrebov V.K., Samoilenko I.E., Kumpan L.V., Reshetnikova T.A. et al. The main results of the development problems of rickettsioses transmitted by Ixodes tick in Russia. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2012; 66(5): 29–33. (in Russian)
- Tarasevich I.V., Makarova V.A., Fetisova N.F., Stepanov A.V., Miskarova E.D., Balayeva N. et al. Astrakhan fever, a spotted-fever rickettsiosis. *Lancet*. 1991; 337(8734): 172–3.
- Mediannikov O.Y., Sidelnikov Y., Ivanov L., Mokretsova E., Fournier P.E., Tarasevich I. et al. Acute tick-borne rickettsiosis caused by Rickettsia heilongjiangensis in Russian Far East. *Emerg. Infect. Dis.* 2004; 10(5): 810–7.
- Rydkina E., Roux V., Fetisova N., Rudakov N., Gafarova M., Tarasevich I. et al. New Rickettsiae in ticks collected in territories of the former soviet union. *Emerg. Infect. Dis.* 1999; 5(6): 811–4.
- Shpynov S.N., Fournier P.E., Rudakov N.V., Samoilenko I.E., Reshetnikova T.A., Yastrebov V.K. et al. Molecular identification of a collection of spotted fever group rickettsiae obtained from patients and ticks from Russia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2006; 74(3): 440–3.
- Ereemeeva M.E., Shpynov S.N., Tokarevich N.K. Modern approaches to laboratory diagnosis of rickettsioses. *Infektsiya i immunitet*. 2014; 4(2): 113–4. (in Russian)
- Scola B., Raoult D. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35(11): 2715–27.
- Maleev V.V. Review of European recommendations for the diagnosis of tick-borne bacterial infections. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2005; 7(2): 130–53. (in Russian)
- Rudakov N.V., Samoilenko I.E., Reshetnikova T.A. Problems of laboratory diagnostics of tick-borne spotted fever rickettsioses in Russia. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2015; 60(1): 50–2. (in Russian)
- Chausov E.V., Ternovoy V.A., Protopopova E.V., Kononova S.N., Kononova Yu.V., Pershikova N.L. et al. Genetic diversity of infectious agents transmitted by Ixodes tick in Tomsk and its suburbs. *Parazitologiya*. 2009; 43(5): 374–88. (in Russian)
- Roux V., Rydkina E., Ereemeeva M., Raoult D. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1997; 47(2): 252–61.

Received 01.08.15

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 579.871.1.083.18

Харсеева Г. Г.¹, Воронина Н. А.¹, Миронов А. Ю.², Алутина Э. Л.¹

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ИДЕНТИФИКАЦИИ *CORYNEBACTERIUM NON DIPHTHERIAE*

¹ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет», 344022, г. Ростов-на-Дону; ²ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора, 125212, г. Москва

Проведен сравнительный анализ эффективности трех методов идентификации *Corynebacterium non diphtheriae*: бактериологического, молекулярно-генетического (секвенирование по 16S рРНК), масс-спектрометрического (MALDI-ToF MS). Исследовано 49 штаммов *Corynebacterium non diphtheriae* (*C. pseudodiphtheriticum*, *C. amycolatum*, *C. aurimucosum*, *C. propinquum*, *C. falsenii*) и 2 штамма *Corynebacterium diphtheriae*, выделенных при различной патологии из урогенитального тракта и верхних дыхательных путей. Коринебактерии идентифицировали бактериологическим методом, секвенированием по 16S рРНК и масс-спектрометрическим методом (MALDI ToF). Полное совпадение результатов видовой идентификации отмечено у 26 (51%) штаммов *C. non diphtheriae* при использовании трех методов исследования, у 43 (84,3%) – при сравнении бактериологического метода и секвенирования по 16S рРНК, у 29 (57%) – при масс-спектрометрическом исследовании и секвенировании по 16S рРНК. Бактериологический метод эффективен для идентификации *C. Diphtheriae*. Для точного установления видовой принадлежности коринебактерий с переменными биохимическими свойствами необходимо использовать молекулярно-генетический метод исследования. Масс-спектрометрический метод (MALDI-ToF MS) требует дальнейшего пополнения баз данных для определения более широкого спектра представителей рода *Corynebacterium*.

Ключевые слова: *Corynebacterium non diphtheriae*; бактериологический метод; молекулярно-генетический метод; масс-спектрометрический метод.

Для цитирования: *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60(12): 43–46.

Для корреспонденции: Харсеева Галина Георгиевна, galinagh@bk.ru
For correspondence: Kharseeva G.G., galinagh@bk.ru