

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616.98:579.881.111-078

Рудаков Н.В.^{1,2}, Самойленко И.Е.¹, Решетникова Т.А.¹**ПРОБЛЕМЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ РИККЕТСИОЗОВ ГРУППЫ КЛЕЩЕВОЙ ПЯТНИСТОЙ ЛИХОРАДКИ В РОССИИ**¹ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора, 644080, Омск, ²ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия» Минздрава России, 644050, Омск, Россия

Представлен анализ современных методов лабораторной диагностики риккетсиозов группы клещевой пятнистой лихорадки (КПЛ). В связи с резким сокращением номенклатуры выпускаемых препаратов и увеличением спектра выявленных на территории России видов риккетсий необходимы новые подходы к лабораторной верификации диагнозов. Для выявления антител к риккетсиям группы КПЛ могут быть рекомендованы реакция непрямой иммунофлюоресценции и иммуноферментный анализ с антигенами соответствующих видов риккетсий. Для выявления и идентификации риккетсий группы КПЛ наиболее приемлемы ПЦР-рестрикционный анализ и ПЦР-секвенирование, для изучения патогенных видов риккетсий необходимы биологические методы исследования.

Ключевые слова: риккетсии и риккетсиозы; лабораторная диагностика.

Rudakov N.V.^{1,2}, Samoilenko I.E.¹, Reshetnikova T.A.¹

THE PROBLEMS OF LABORATORY DIAGNOSTIC OF RICKETTSIOSIS OF GROUP SPOTTED TICK-BITE FEVER IN RUSSIA¹The Omsk research institute of feral herd infections of Rosпотребнадзор of Russia, 644080 Omsk, Russia; ²The Omsk state medical academy of Minzdrav of Russia, 640050 Omsk, Russia

The article presents analysis of modern techniques of laboratory diagnostic of rickettsiosis of spotted tick-bite fever group. Owing to drastic shortage of list of produced preparations and increasing of specter of detected types of rickettsia in Russia the new approaches to laboratory verification of diagnoses are needed. To detect antibodies to rickettsia of spotted tick-bite fever group can be recommended such techniques as reaction of indirect immune fluorescence and immune enzyme assay with antigens of corresponding types of rickettsia. The most acceptable techniques for detecting and identifying rickettsia of spotted tick-bite fever group are polymerase chain reaction restricting analysis and polymerase chain reaction sequence analysis. The biological methods of analysis are needed to study pathogenic types of rickettsia.

Key words: rickettsia; rickettsiosis; laboratory diagnostic

В России в соответствии с приказом Росстата от 20.12.12 № 645 внесены изменения в формы №1 и 2 “Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях”, с 2013 г. осуществляется регистрация двух риккетсиозов группы клещевой пятнистой лихорадки (КПЛ) – сибирского клещевого тифа (СКТ) и астраханской пятнистой лихорадки, возбудителями которых являются *Rickettsia sibirica subsp. sibirica* и *Rickettsia conorii subsp. caspiensis* соответственно. Из трех подвидов *R.sibirica* в России доказано наличие *R.sibirica subsp.sibirica* и *R.sibirica subsp. BJ-90*. Верифицированные случаи клещевого риккетсиоза или СКТ связаны с *R.sibirica subsp. sibirica* [1]. Получены данные о вероятной патогенности *R.sibirica subsp. BJ-90* [2, 3]. Кроме них, в иксодовых клещах в различных регионах России выявлено еще 5 видов патогенных для человека риккетсий группы КПЛ – *R.heilonjiangensis*, *R.aeschlimannii*, *R.helvetica*, *R.slovaca*, *R.raoultii*, а также относящийся к группе предшественников вид клещевых риккетсий с неясной патогенностью для человека *R.tarasevichiae* [1]. Клинически риккетсиозы группы КПЛ обладают выраженной схожестью проявлений (кроме синдрома TIBOLA, этиологически связанного преимущественно с *R.slovaca*, в меньшей степени с *R.raoultii*), а их видоспецифическая верификация применяемыми в практике лабораторными методами неэффективна.

Лабораторная диагностика риккетсиозов группы КПЛ осуществлялась в соответствии с утвержденными методиче-

скими документами [4, 5]. Учитывались также Европейские рекомендации по диагностике клещевых бактериальных инфекций (далее “Европейские рекомендации”) [6].

В соответствии с отечественными рекомендациями для диагностики регламентированы преимущественно серологические методы (реакция агглютинации – РА, реакция связывания компонента – РСК, реакция непрямой геммагглютинации – РНГА, реакция непрямой иммунофлюоресценции – РНИФ, иммуноферментный анализ – ИФА), однако к настоящему времени не выпускается ни один коммерческий диагностикум для указанных методов.

В течение многих десятилетий РСК являлась базовым методом серологической диагностики риккетсиозов. Наличие группоспецифического полисахаридного комплекса в составе препарата растворимого антигена для РСК приводит к отсутствию четкой видовой дифференциации внутри групп СТ и КПЛ, хотя титры антител обычно бывают выше к гомологичному антигену. Метод недостаточно чувствителен в ранней фазе заболевания, даже на гиперэндемичных территориях лабораторное подтверждение диагноза СКТ не превышает 26,8% [7]. Кроме того, метод РСК требует нестандартных компонентов (эритроциты барана), существуют проблемы с учетом результатов в связи с антикомплемментарностью сывороток и антигенов.

В соответствии с “Европейскими рекомендациями” для серологической диагностики рекомендуется реакция микрофлюоресценции (или РНИФ). РНИФ считается золотым стандартом серодиагностики риккетсиозов. Метод обладает высокой специфичностью и чувствительностью, позволяет выявлять IgM- и IgG-антитела как вместе, так и раздельно в зависимости от применяемых конъюгатов. При риккетсиозах группы КПЛ диагностически значимые титры IgM-антител

Для корреспонденции:

Самойленко Ирина Евгеньевна, канд. мед. наук
Адрес: 644080, Омск, пр. Мира, 7
E-mail: irinasam59@mail.ru

выявляют в конце 1-й недели, IgG-антител – в конце 2-й недели заболевания. Для ее постановки используют слайд-антигены, получаемые на культурах клеток из эталонных штаммов соответствующих видов риккетсий в специализированных риккетсиологических лабораториях (в России – Омский НИИ природно-очаговых инфекций и НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи).

Кроме того, в последние годы для серологической диагностики риккетсиозов группы КПЛ в Омском НИИ природно-очаговых инфекций предложен ИФА на основе антигена для РСК [8]. Его использование позволяет почти вдвое в сравнении в РСК повысить эффективность верификации диагноза СКТ за счет чувствительности предложенного теста. Применение ИФА с конъюгатами к разным изотипам иммуноглобулинов (IgG и IgM) позволяет дифференцировать антитела по классам иммуноглобулинов. Получен патент на изобретение № 2477860 “Способ лабораторной диагностики клещевого риккетсиоза с использованием иммуноферментного анализа для определения антител к антигену *Rickettsia sibirica*” [9].

Для исследования переносчиков, в том числе снятых с человека, ранее применяли экспресс-методы – метод флюоресцирующих антител, РНГА с иммуноглобулиновым диагностикумом для выявления риккетсий группы КПЛ, однако диагностические препараты для них в последние годы также не выпускают. ДНК риккетсий в переносчиках можно выявлять в ПЦР с последующей идентификацией путем определения нуклеотидных последовательностей ампликона, что в настоящее время возможно лишь в ограниченном числе лабораторий. Эти методы позволяют выявлять преимущественно массовые виды риккетсий – *R. raoultii* в клещах рода *Dermacentor*, *R. tarasevichae* в клещах рода *Ixodes*, не имеющих существенного эпидемиологического значения.

Несмотря на высокую перспективность, особенно для диагностики новых риккетсиозов, методы, основанные на ПЦР, не нашли широкого применения в практике ввиду сложности и трудоемкости, а также в связи с методическими проблемами взятия и исследования клинического материала от больных (более эффективно исследование биоптатов с места присасывания клеща, а не проб крови). ПЦР не позволяет оценить риск заражения при исследовании снятого переносчика и эпидемиологическую опасность очаговой территории при исследовании иксодовых клещей из природных станций, поскольку не обладает видоспецифичностью.

Разработанная нами методика ПЦР-рестрикционного анализа может быть использована для дифференциации основных видов риккетсий, выявляемых в природных очагах. Применение рестрикционного анализа с использованием эндонуклеаз (*RsaI* и *PstI*) позволило четко дифференцировать две группы риккетсий: *R. sibirica* и *R. sibirica* subsp. *BJ-90* от генотипов *R. raoultii* [10].

Для изучения патогенных видов риккетсий наиболее эффективны культуральные методы. Основные риккетсиологические методы включают заражение, чаще интраперитонеальное, чувствительных животных (морские свинки, хомячки, хлопковые и белые крысы, белые мыши), развивающихся куриных эмбрионов (в желточный мешок по Коксу), перевиваемых культур клеток (*Vero*, *Herp-2*, *L929*), клеток членистоногих [1].

Методы выделения и последующей идентификации риккетсий требуют специальной подготовки, соблюдения режимных требований (возбудители III группы патогенности). Их культивирование можно осуществлять в специализированных риккетсиологических лабораториях или лабораториях особо опасных инфекций, что ограничивает возможность использования методов выделения риккетсий в диагностических целях.

Таким образом, нами разработаны новые диагностические подходы для лабораторной диагностики риккетсиозов, основанные на применении преимущественно ИФА- и ПЦР-технологий. Для выявления и идентификации риккетсий группы КПЛ наиболее приемлемы ПЦР-рестрикционный

анализ и ПЦР-секвенирование. Для выявления антител к риккетсиям группы КПЛ в диагностических целях в настоящее время могут быть рекомендованы РНИФ и ИФА с антигенами соответствующих видов риккетсий.

Наличие общих переносчиков различных патогенов, зачастую в единой паразитарной системе, обуславливает широкую распространенность сочетанных природных очагов риккетсиозов группы КПЛ в различных сочетаниях, что следует принимать во внимание при мониторинге очагов, эпидемиологическом надзоре, диагностике и профилактике этих инфекций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рудаков Н.В., Шпынов С.Н., Самойленко И.Е., Ястребов В.К., Оберт А.С., Курепина Н.Ю. *Риккетсии и риккетсиозы группы клещевой пятнистой лихорадки в Сибири*. Омск: Издательский центр «Омский научный вестник»; 2012.
2. Jia N., Jiang J.-F., Huo Q.-B. et al. *Rickettsia sibirica* subspecies BJ-90 as a cause of human disease. *N. Engl. J. Med.* 2014; 369 (12): 1176–8.
3. Пеньевская Н.А., Рудаков Н.В., Абрамова Н.В., Рудакова С.А., Коломенский А.П. *Клинико-эпидемиологический анализ результатов выявления антител к различным видам риккетсий у больных с подозрением на клещевую нейроинфекцию в северных районах Омской области. Национальные приоритеты России. Специальный выпуск «Актуальные проблемы природной очаговости болезней: матер. Всероссийская конференция с международным участием, посвященная 70-летию теории академика Е.Н. Павловского о природной очаговости болезней*. Омск, 2009; 2: 192–7.
4. Методические рекомендации. *Эпидемиологический надзор за клещевым риккетсиозом, иммунодиагностика заболевания и методы выявления возбудителя*. Омск: МЗ СССР, 1992.
5. *Методические указания МУ 3.1.1755-03. Организация эпидемиологического надзора за клещевым риккетсиозом*. Москва: Федеральный центр госсанэпиднадзора России, 2004.
6. Brouqui P., Bacellar F., Baranton G., Birtles R.J., Bjoersdorff A., Blanco J.R. et al. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004; 10: 1108–32.
7. *Анализ деятельности центров Госсанэпиднадзора Российской Федерации по лабораторной диагностике риккетсиозов. Информационный сборник статистических и аналитических материалов*. Москва; 2001.
8. Абрамова Н.В., Рудаков Н.В., Пеньевская Н.А., Седых Н.Н., Кумпан Л.В., Самойленко И.Е. и др. Апробация иммуноферментного анализа для серологической диагностики инфекций, вызываемых риккетсиями группы клещевой пятнистой лихорадки. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2010; 1(50): 17–22.
9. Рудаков Н.В., Абрамова Н.В., Пеньевская Н.А., Самойленко И.Е., Шпынов С.Н., Решетникова Т.А. *Способ лабораторной диагностики клещевого риккетсиоза с использованием иммуноферментного анализа для определения антител к антигену *Rickettsia sibirica**. Патент РФ № 2477860 от 20.03.2013.
10. Рудакова С.А., Коломеец А.Н., Самойленко И.Е., Кузьминов А.М., Рудаков Н.В. Экспресс-индикация трансмиссивных патогенов как основа дифференцированного подхода к профилактике инфекций, передающихся иксодовыми клещами. *Бюллетень СО РАМН*. 2007; 4: 116–9.

REFERENCES

1. Rudakov N.V., Shpynov S.N., Samoylenko I.E., Yastrebov V.K., Obert A.S., Kurepina N.Ju. *Rickettsia and spotted fever group rickettsiosis in Siberia*. Омск: Publishing Center “Omsk Scientific Bulletin”; 2012. (in Russian)
2. Jia N., Jiang J.-F., Huo Q.-B. et al. *Rickettsia sibirica* subspecies BJ-90 as a cause of human disease. *N. Engl. J. Med.* 2014; 369 (12): 1176–8.
3. Pen'evskaja N.A., Rudakov N.V., Abramova N.V., Rudakova S.A., Kolomenskij A.P. *Clinico-epidemiological analysis of the detection of antibodies to various types of rickettsiae in patients with suspected tick-borne neuroinfection in the northern districts of the Omsk region*.

- Russian national priorities. Special Issue on "Actual problems of the natural foci of diseases: Materialy Vserossiiskoi konferentsii with international participation marking the 70th anniversary of theory of natural foci of diseases by acad. E.N. Pavlovskii. 2009; 2: 192–7. (in Russian)
4. Methodical recommendations. Epidemiological surveillance of tick-borne rickettsiosis, immunodiagnosis of the disease and methods of detection the pathogen. Omsk: Minzdrav SSSR, 1992. (in Russian)
 5. Guidelines MU 3.1.1755-03. Organization epidemiological surveillance of tick-borne rickettsiosis. Moscow: Russian Federal Centre for Sanitary Inspection, 2004. (in Russian)
 6. Brouqui P., Bacellar F., Baranton G., Birtles R.J., Bjoersdorff A., Blanco J.R. et al. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004; 10: 1108-32.
 7. Analysis of the activities the Sanitary Inspection centers of the Russian Federation for the laboratory diagnosis of rickettsial diseases. *Information Bulletin and statistical analysis.* Moscow; 2001. (in Russian)
 8. Abramova N.V., Rudakov N.V., Pen'evskaja N.A., Sedyh N.N., Kumpan L.V., Samoilenko I.E. et al. The testing of immunoassay for serological diagnosis of infections caused by spotted fever group rickettsiae. *Epidemiologiya i vactsinoprofilaktika.* 2010; 1(50): 17–22. (in Russian)
 9. Rudakov N.V., Abramova N.V., Pen'evskaja N.A., Samoilenko I.E., Shpynov S.N., Reshetnikova T.A. The method of laboratory diagnosis of tick-borne rickettsiosis using an enzyme immunoassay for the detection of antibodies to the antigen of *Rickettsia sibirica*. Patent RF N 2477860; 2013. (in Russian)
 10. Rudakova S.A., Kolomeetz A.N., Samoilenko I.E., Kuz'minov A.M., Rudakov N.V. Express indication of transmissible pathogens as the basis of the differentiated approach to the prevention of infections transmitted by Ixodes ticks. *Bulleten' SO RAMN.* 2007; 4: 116-9. (in Russian)

Поступила 10.06.14
Received 10.06.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 579.842.11:579.252].083.1

Иванова Е.И.¹, Попкова С.М.¹, Джиоев Ю.П.^{1,2}, Ракова Е.Б.¹, Долгих В.В.¹, Савелькаева М.В.¹, Немченко У.М.¹, Бухарова Е.В.¹, Сердюк Л.В.¹

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ СПОСОБНОСТЬ К ФОРМИРОВАНИЮ СВЯЗЫВАНИЯ ПИЛЕЙ У АУТОШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI*

¹ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН, 664003, Иркутск; ²ГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет», 664003, Иркутск

E.coli – комменсал кишечника позвоночных. Обмен генетическим материалом разных типов бактерий между собой и с другими представителями семейства Enterobacteriaceae в кишечной экосистеме ведет к появлению вариантов нормальной кишечной палочки с генетическими признаками патогенности, что может служить теоретическим обоснованием для отнесения таких штаммов к патобионтам. Энтеропатогенная кишечная палочка (ЕПЕС) продолжает оставаться важной причиной диарей у детей в развивающихся странах. Ген, отвечающий за формирование связывания пилей, является необходимым условием для вирулентности ЕПЕС. С помощью ПЦР исследовали 316 штаммов разных типов *E.coli* (нормальная, со слабой ферментативной активностью, гемолитической активностью), выделенных у здоровых детей и детей с функциональными нарушениями желудочно-кишечного тракта, на наличие генов, кодирующих способность к формированию связывания пилей (*bfp*). Присутствие гена *bfp* в разных биохимических вариантах *E.coli* позволяет констатировать факт формирования резервуара патогенности в индигенной микробиоте кишечника биоценоза.

Ключевые слова: микробиоценоз; адгезия; *Escherichia coli*; ген, отвечающий за формирование связывания пилей (*bfp*).

Ivanova E.I.¹, Popkova S.M.¹, Djiioev Yu.P.^{1,2}, Rakova E.B.¹, Dolgikh V.V.¹, Savelkaeva M.V.¹, Nemtchenko U.M.¹, Bukharova E.V.¹, Serdiuk L.V.¹

THE DETECTION OF OCCURRENCE RATE OF GENES CODING CAPABILITY TO FORM PILI BINDING IN AUTO-STRAINS OF *ESCHERICHIA COLI*

¹The research center of problems of family health and human reproduction, 664003 Irkutsk, Russia; ²The Irkutsk state medical university, 664003 Irkutsk, Russia

E.coli is a commensal of intestine of the vertebrata. The exchange of genetic material of different types of bacteria between themselves and with other representatives of family of Enterobacteriaceae in intestinal ecosystem results in development of types of normal colibacillus with genetic characteristics of pathogenicity that can serve as a theoretical substantiation to attribute such strains to pathobionts. The entero-pathogenic colibacillus continues be an important cause of diarrhea in children in developing countries. The gene responsible for formation of pili binding is a necessary condition for virulence of entero-pathogenic colibacillus. The polymerase chain reaction was applied to examine 316 strains of different types of *E.coli* (normal, with weak enzyme activity and hemolytic activity) isolated from healthy children and children with functional disorders of gastro-intestinal tract for presence of genes coding capability to form pili binding. The presence of this gene in different biochemical types of *E.coli* permits to establish the fact of formation of reservoir of pathogenicity in indigent microbiota of intestinal biocenosis.

Key words: microbiocenosis; adhesion; *Escherichia coli*; gene coding capability to form pili binding

Для корреспонденции:

Иванова Елена Иннокентьевна, мл. науч. сотр.
Адрес: 664003, Иркутск, ул. Тимирязева, 16
E-mail: ivanova.iem@gmail.com