

Штрек С.В.^{1,2}, Блох А.И.^{1,2}, Самойленко И.Е.¹, Санников А.В.^{1,2}, Боброва О.А.¹, Шпынов С.Н.^{1,2}, Рудаков Н.В.^{1,2}

ВАЛИДАЦИЯ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ОЦЕНКИ КОЛИЧЕСТВА РИККЕТСИЙ В ИССЛЕДУЕМОМ БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

¹ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора, 644080, Омск, Россия;

²ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 644099, Омск, Россия

На примере клинического штамма *R. sibirica* «Баево 105/87» оценена возможность количественного определения риккетсий в клинических образцах от больных сибирским клещевым тифом методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Культивирование осуществляли в желточных мешках развивающихся куриных эмбрионов (РКЭ), из которых забирали кусочек желточного мешка или хориона. Исследовано 125 образцов. Для ПЦР-РВ использован набор реагентов «RealBest ДНК *Rickettsia species* (комплект 1)». Полученные значения порогового цикла амплификации (Ct) сравнивали с результатами микроскопии препаратов мазков, окрашенных по методу Здродовского, значения которых разбивали на ранги: I ранг – единичные риккетсии в отдельных полях зрения, II ранг – единичные риккетсии в каждом поле зрения, III ранг – от 10 до 25 риккетсий в каждом поле зрения, IV ранг – от 25 до 50 риккетсий в каждом поле зрения. Медианное значение Ct для I ранга составило 17,6 (16,37; 18,58), для II – 16,0 (15,0; 16,41), для III – 15,0 (14,0; 15,1), для IV – 15,0 (13,7; 14,64). Установлена значимая средней силы корреляционная связь между количеством риккетсий в препарате при микроскопии и значением порогового цикла в ПЦР РВ ($r=-0,4849542$; $p=9.968e-09$). При построении ординальной логической регрессии получена модель с помощью, которой по значениям Ct можно определить количество риккетсий в образце. Представляло интерес обнаружение риккетсий в кровеносных сосудах хориона (РКЭ). В 10-ти образцах для исследования забрали желточный мешок и хорион, и параллельно исследовали методом ПЦР-РВ. Применение современных более чувствительных молекулярно-биологических методов позволяет осуществлять количественный анализ ДНК в хорионе, при этом сохраняя объемы наиболее ценного материала – желточного мешка.

Ключевые слова: клещевые риккетсиозы; риккетсии; полимеразная цепная реакция в режиме реального времени.

Для цитирования: Штрек С.В., Блох А.И., Самойленко И.Е., Санников А.В., Боброва О.А., Шпынов С.Н., Рудаков Н.В.

Валидация ПЦР в режиме реального времени для оценки количества риккетсий в исследуемом биологическом материале.

Клиническая лабораторная диагностика. 2022; 67 (11): 668-671. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-11-668-671>

Для корреспонденции: Штрек Сергей Владимирович, канд. мед. наук, зав. лаб. зоонозных инфекций отдела ПОБЗ «Омский НИИ природно-очаговых инфекций»; e-mail: studi1990@mail.ru

Финансирование. Исследование выполнено в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 29.08.2022

Принята к печати 27.09.2022

Опубликовано 14.11.2022

Shtrek S.V.^{1,2}, Blokh A.I.^{1,2}, Samoylenko I.E.¹, Sannikov A.V.^{1,2}, Bobrova O.A.¹, Shpynov S.N.^{1,2}, Rudakov N.V.^{1,2}

REAL-TIME PCR VALIDATION TO ESTIMATE THE NUMBER OF RICKETTSIAS IN THE BIOLOGICAL MATERIAL UNDER STUDY

¹Omsk Research Institute of Natural Focal Infections, 644080, Omsk, Russia;

²Omsk State Medical University, 644099, Omsk, Russia

Using the example of the clinical strain of *R. sibirica* «Bayevo 105/87», the possibility of quantitative determination of rickettsias in clinical samples from patients with Siberian tick-borne typhus by real-time polymerase chain reaction (PCR-RT) was evaluated. Cultivation was carried out in the yolk sacs of developing chicken embryos, from which a piece of the yolk sac or chorion was taken. A total of 125 samples were examined. A set of reagents “RealBest DNA *Rickettsia species* (kit1)” was used for PCR-RT. The obtained values of the threshold amplification cycle (Ct) were compared with the results of microscopy of smear preparations stained by the Zdrodovsky method, the values of which were divided into ranks: the I rank – single rickettsias in individual fields of vision, the II rank – single rickettsias in each field of vision, the III rank – from 10 to 25 rickettsias in each field of vision, the IV rank – from 25 to 50 rickettsias in each field of view. The median Ct value for rank I was 17.6 (16.37; 18.58), for the II – 16.0 (15.0; 16.41), for the III – 15.0 (14.0; 15.1) and for the IV – 15.0 (13.7; 14.64). A significant average correlation was established between the number of rickettsias in the preparation under microscopy and the value of the threshold cycle in PCR RT ($r=-0,4849542$; $p=9.968e-09$). When determining the correlation between the pathomorphological characteristic and the value of the threshold cycle, its absence was established. The detection of rickettsias in the blood vessels of the chorion of developing chicken embryos was of interest. In 10 samples, the yolk sac and chorion were taken for the study, and in parallel they were examined by PCR-RT. The use of modern, more sensitive molecular biological methods allows for quantitative analysis of DNA in the chorion, while preserving the volumes of the most valuable material – the yolk sac.

Key words: tick-borne rickettsioses; rickettsias; polymerase chain reaction real time.

For citation: Shtrek S.V., Blokh A.I., Samoylenko I.E., Sannikov A.V., Bobrova O.A., Shpynov S.N., Rudakov N.V. Real-time PCR validation to estimate the number of rickettsias in the biological material under study. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (11): 668-671 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-11-668-671>

For correspondence: Shtrek Sergey Vladimirovich, PhD, Head of the Zoonotic Infections Laboratory of the Department POBZ Omsk Research Institute of Natural Focal Infections; e-mail: studi1990@mail.ru.

Information about authors:

Shtrek S.V., <https://orcid.org/0000-0002-4509-1212>;
Blokh A.I., <https://orcid.org/0000-0002-0756-2271>;
Samoylenko I.E., <https://orcid.org/0000-0002-2819-9280>;
Sannikov A.V., <https://orcid.org/0000-0003-3377-5374>;
Bobrova O.A., <https://orcid.org/0000-0003-1880-8908>;
Shpynov S.N., <https://orcid.org/0000-0002-4550-3459>;
Rudakov N.V., <https://orcid.org/0000-0001-9566-9214>.

Acknowledgments. *The study had no sponsor support.*

Conflict of interest. *The authors declare no conflict of interest.*

Received 29.08.2022

Accepted 27.09.2022

Published 00.11.2022

Введение. По уровню заболеваемости клещевые риккетсиозы (КР) входят в тройку наиболее распространённых трансмиссивных клещевых инфекций на территории Российской Федерации [1-5]. Система эпидемиологического надзора за КР включает информационный поток о популяции инфекционного агента. Для изучения его видового и генотипического разнообразия необходимо изолировать штаммы риккетсий, циркулирующих на различных очаговых территориях [4]. Существуют три биологические модели для выделения и культивирования штаммов риккетсий от больных КР и иксодовых клещей: лабораторные животные (преимущественно морские свинки, самцы), линии чувствительных культур клеток, РКЭ [3-7]. В процессе культивирования важную роль играет количественный контроль накопления риккетсий в биологических материалах (подсчёт риккетсий в образце). Общеприняты методы микроскопии препаратов мазков риккетсий, не позволяющие, однако, дифференцировать вид риккетсий [8, 9]. В данных методах присутствует субъективный характер, во многом зависящий от опыта исследователя. Имеются молекулярно-биологические методы, позволяющие определять наличие ДНК риккетсий в исследуемом биологическом материале [5, 10, 11]. Полимеразная цепная реакция с детекцией в электрофоретическом геле – качественная реакция, не позволяющая оценить количество копий ДНК. В РФ зарегистрированы наборы реагентов ПЦР-РВ для молекулярно-биологической диагностики КР: для детекции ДНК *Rickettsia species* – «РеалБест ДНК *Rickettsia species* (комплект 1)» и для детекции ДНК *R. sibirica/ R. heilongjiangensis* – «РеалБест ДНК *Rickettsia sibirica/Rickettsia heilongjiangensis* (комплект 1)» (АО «Вектор-Бест», Новосибирск). Наборы успешно апробированы для лабораторной диагностики КР [12-15]. Имеются отдельные публикации о применении указанных наборов для мониторинга природных очагов КР, которые не содержат анализа эффективности применения данных наборов для количественной оценки риккетсий в исследуемом биологическом материале.

Цель исследования: оценить возможность количественного определения риккетсий в клинических образцах от больных сибирским клещевым тифом методом ПЦР-РВ, используя в качестве модели биологический материал, полученный из желточных мешков и хориона РКЭ.

Материал и методы. Использован лиофильно высушенный клинически значимый штамм *R. sibirica* «Баево 105/87», выделенный в 1987 г., и используемый для получения диагностических препаратов для выявления

антител к *R. sibirica* у больных сибирским клещевым тифом людей. Культивирование осуществляли в желточных мешках 5-6-ти дневных РКЭ, которые вскрывали на 5-7 день после заражения, забирали кусочек желточного мешка или хориона, содержащего кровеносный сосуд для экстракции ДНК. Исследовано 125 образцов (6-7 пассаж).

Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Использован набор реагентов для выявления ДНК *Rickettsia* spp. «РеалБест ДНК *Rickettsia species* (комплект 1)» (Кат. № D-5391). Результаты ПЦР-РВ представлены в виде значений порогового цикла амплификации (Ct), в образцах, где рост сигнала отсутствовал, пороговое значение цикла приняли за 40.

Для исключения контаминации проверена стерильность образцов. Отсутствие контаминации контролировали путём высева в сахарный бульон, который инкубировали в термостате при 37°С. Проводился ежедневный мониторинг роста с окончательным учётом результатов через 96 часов. Во всех образцах отмечено отсутствие роста посторонней микрофлоры.

Микроскопия препаратов мазков, окрашенных по методу Здродовского. Заражённые РКЭ вскрывали и готовили препарат-мазок из стенки желточного мешка на обезжиренных предметных стёклах. В полях зрения препарата подсчитывали количество риккетсий, значения которых разбивали на ранги, где I ранг соответствовал единичным риккетсиям в отдельных полях зрения (табл. 1).

Описание патоморфологической характеристики желточного мешка РКЭ. При воспроизведении риккетсиозной инфекции на РКЭ, для желточных мешков характерны следующие патоморфологические признаки: средний или небольшой размер, выраженный сосудистый рисунок.

Для описания полученных данных применены стандартные приёмы описательной статистики по схеме Ме (Q1; Q3),

где: Ме – медиана вариационного ряда, Q1 и Q3 – нижний и верхний квартили вариационного ряда соответственно.

Проведена оценка корреляционных связей методом Пирсона. Построена ординальная логическая регрессия, обратная логит-трансформация выполнена по стандартной формуле:

$$P(Y) = \frac{\text{logit}(Y)}{1 - \text{logit}(Y)}.$$

Обработка данных выполнялась в программе R.4.0.3.

Результаты. При определении корреляционной связи между патоморфологической характеристикой и значением порогового цикла, установлено её отсутствие. В 83% желточные мешки имели малый размер. Распределение по характеру рисунка стенки желточного мешка следующее: в 49% – умеренно выраженный сосудистый рисунок, в 28% – слабовыраженный, в 23% – выраженный.

Представлял интерес обнаружение риккетсий в кровеносных сосудах хориона РКЭ. В 10-ти образцах для исследования забрали желточный мешок и хорион, и параллельно исследовали методом ПЦР-РВ. Медиана порогового цикла при исследовании желточного мешка – 16,85 (15,43; 18,48), хориона – 18,50 (17,00; 19,48). В одном из образцов желточного мешка выявлен отрицательный результат (при расчёте медианы не учитывался), при исследовании хориона результат положительный (Ct 18,50). Проблема может быть связана с взятием материала, так как не всегда удаётся точно взять ту часть желточного мешка, в которой находится кровеносный сосуд.

Характеристика распределений всех значений порогового цикла в различных группах отображена в диаграмме размаха (см. рисунок). Медианное значение Ct в первой группе с единичными риккетсиями в отдельных полях

зрения, составило 17,6 (16,37; 18,58). Медианное значение Ct в группе с единичными риккетсиями в каждом поле зрения, составило 16,0 (15,0; 16,41). Медианное значение Ct в группе, где в каждом поле зрения от 10-ти до 25-ти риккетсий, составило 15,0 (14,0; 15,1). Медианное значение Ct в группе, где в каждом поле зрения от 25-ти до 50-ти риккетсий, составило 15,0 (13,7; 14,64).

Установлена значимая средней силы корреляционная связь между количеством риккетсий в препарате при микроскопии и значением порогового цикла в ПЦР РВ ($r=-0,4849542$; $p=9.968e-09$).

При построении ординальной логической регрессии получена следующая модель:

$$\begin{cases} \text{logit}(P(Y \leq 1)) = -10.3202 + 0.4963Ct; \\ \text{logit}(P(Y \leq 2)) = -7.5193 + 0.4963Ct; \\ \text{logit}(P(Y \leq 3)) = -5.1413 + 0.4963Ct. \end{cases}$$

Фактические результаты сопоставлены с результатами, полученными при использовании полученной модели (табл. 2). Из 125 образцов, совпало 65: в I ранге совпало 4 образца, во II – 38 образцов, в III – 23 образца, в IV ранге нет совпадений, что обусловлено малыми различиями по Ct между III и IV рангами. Точность полученной модели составляет 52,0%. Аналогичным образом рассчитаны верхние и нижние значения Ct для предполагаемых рангов.

Выводы:

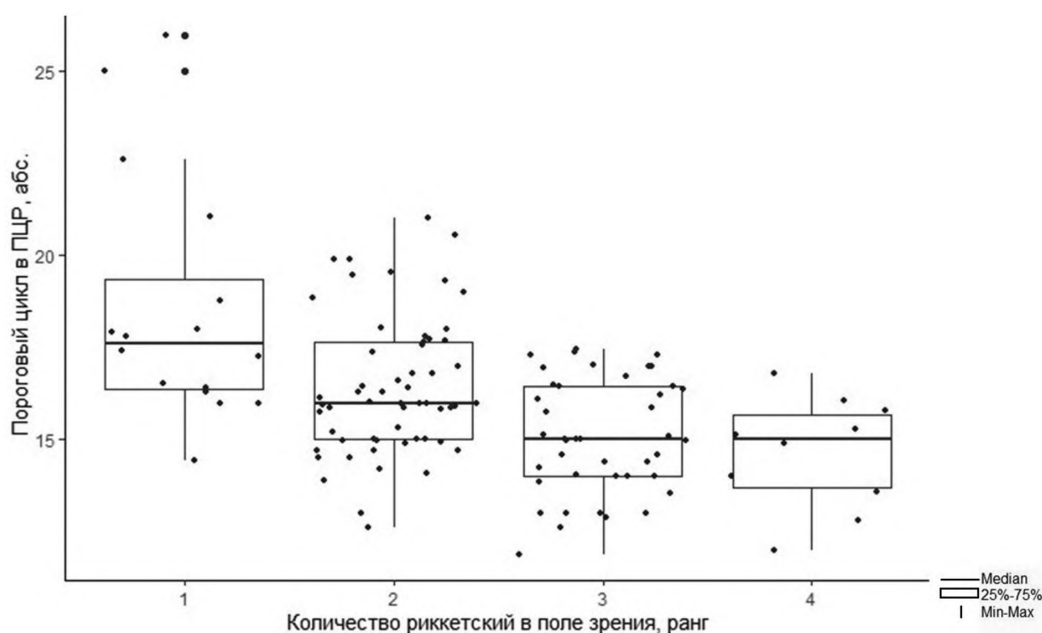
1. Отсутствует корреляционная связь между патоморфологической характеристикой заражённого желточного мешка и значением порогового цикла. Концентрация риккетсий в образце не влияют на размер и сосудистый рисунок желточного мешка.

2. Применение современных более чувствительных молекулярно-биологических методов позволяет осуществлять количественный анализ ДНК в хорионе, при этом сохраняя объёмы наиболее ценного материала – желточного мешка. Уменьшение количества манипуляций с материалом снижает риск контаминации.

Таблица 1

Распределение по рангам в зависимости от количества риккетсий в препаратах мазках окрашенных по Здродовскому

Ранг	Количество риккетсий в препарате	Количество исследованных желточных мешков
I	Единичные риккетсии в отдельных полях зрения	16
II	Единичные риккетсии в каждом поле зрения	57
III	От 10 до 25 риккетсий в каждом поле зрения	42
IV	От 25 до 50 риккетсий в каждом поле зрения	10



Распределение значений порогового цикла в группах, содержащих различное количество риккетсий по данным микроскопии.

Таблица 2

Сопоставление фактического ранга образцов с предсказанным рангом, рассчитанным при использовании полученной модели, интервалы значений Ct для каждого ранга

	Предсказанный ранг				
	1	2	3	4	
Фактический ранг	1	4*	11	1	0
	2	2	38*	17	0
	3	0	19	23*	0
	4	0	5	5	0
Интервалы значений Ct	>20.54	15.00-20.53	10.78-14.99	<10.77	

Примечание. * – Количество результатов, совпавших при фактическом исследовании и рассчитанные при использовании полученной модели.

3. Доказана значимая средней силы корреляционная связь между значением порогового цикла амплификации в ПЦР-РВ и количеством риккетсий в препаратах-мазках, окрашенных по методу Здродовского. С использованием полученной модели для подсчёта бактерий в образце по значениям Ct, определены границы рангов.

4. Разработанный подход позволяет проводить количественную оценку риккетсий в клинических образцах от больных сибирским клещевым тифом с использованием тест-системы «РеалБест ДНК Rickettsia species». Использование комплекса методов, основанных на молекулярной индикации и микроскопии перспективно для совершенствования методики изоляции от больных КР и иксодовых клещей и культивирования штаммов риккетсий на различных биологических моделях.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 6, 7, 9, 10, 14 см. REFERENCES)

1. Рудаков Н.В., Пенъевская Н.А., Кумпан Л.В., Блох А.И., Шпынов С.Н., Транквилевский Д.В., Штрек С.В. Эпидемиологическая ситуация по риккетсиозам группы клещевой пятнистой лихорадки в Российской Федерации в 2012-2021 гг. и прогноз на 2022-2026 гг. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 1: 54-63.
2. Рудаков Н.В., Шпынов С.Н., Пенъевская Н.А., Блох А.И., Решетникова Т.А., Самойленко И.Е. и др. Особенности эпидемиологической ситуации по клещевым риккетсиозам в Российской Федерации в 2010-2020 гг. и прогноз на 2021 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 1: 73-80.
3. Рудаков Н.В., Ястребов В.К., Рудакова С.А. Трансмиссивные клещевые инфекции в Российской Федерации. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. 2015; 27: 6-9.
4. Рудаков Н.В. Риккетсии и риккетсиозы: руководство для врачей. Омск: Омский научный вестник; 2016.
5. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: Учебник для студентов медицинских вузов. 3-е изд., исправленное. Воробьев А.А., Быков А.С., Бойченко М.Н., ред. М.: Медицинское информационное агентство; 2022. ISBN 978-5-9986-0478-2.
6. Еремеева М.Е., Шпынов С.Н., Токаревич Н.К. Современные подходы к лабораторной диагностике риккетсиозов. *Инфекция и иммунитет*. 2014; 4(2): 113-34.
7. Бесхлебцова О.В., Гранитов В.М., Дедков В.Г. Лабораторная диагностика клещевых инфекций с природной очаговостью (клещевой риккетсиоз, иксодовый клещевой боррелиоз). *Бюллетень медицинской науки*. 2017; 8 (4): 50-5.
8. Гафарова М.Т., Бондаренко Е.И., Малий К.Д., Алиева Э.Э., Евстафьев И.Л., Товпинец Н.Н., Малая Н.К., Кубышкин А.В. Распространённость возбудителей трансмиссивных клещевых риккетсиозов на Крымском полуострове. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67(3): 170-6.

13. Щучинова Л.Д., Бондаренко Е.И., Ечешева А.В., Швалов А.Н., Злобин В.И. Клещевой риккетсиоз, вызываемый *Rickettsia heilongjiangensis*, и его лабораторная диагностика в Республике Алтай. *Современные проблемы науки и образования*. 2020; 4: 143.
15. Сильченко Е.В., Ошорова Л.М., Балжинимаева И.Ц., Бондаренко Е.И., Дашеева Н.А., Балданов Б.В., Сымбелова Т.А. Выявление возбудителей клещевых инфекций с помощью ПЦР-анализа, проводимого в рамках клинических исследований на базе «Республиканской клинической инфекционной больницы», г. Улан-Удэ. *Acta Biomedica Scientifica (East Siberian Biomedical Journal)*. 2018; 4 (3): 138-42.

REFERENCES

1. Rudakov N.V., Penyevskaya N.A., Kumpan L.V., Blokh A.I., Shpynov S.N., Trankvilevsky D.V., Shtrek S.V. Epidemiological Situation on Tick-Borne Spotted Fever Group Rickettsioses in the Russian Federation in 2012-2021, Prognosis for 2022-2026. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2022; 1: 54-63. (in Russian)
2. Rudakov N.V., Shpynov S.N., Pen'evskaya N.A., Blokh A.I., Reshetnikova T.A., Samoylenko I.E. et al. Features of the epidemiological situation on tick-borne rickettsioses in the Russian Federation in 2010-2020 and prognosis for 2021. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2021; 1: 73-80. (in Russian)
3. Rudakov N.V., Yastrebov V.K., Rudakova S.A. Transmissible tick-borne infections in Russian Federation. *Dal'nevostochnyi zhurnal infektsionnoy patologii*. 2015; 27: 6-9. (in Russian)
4. Rudakov N.V. Rickettsias and rickettsioses: a guide for doctors. Omsk: Omskiy nauchnyi vestnik; 2016. (in Russian)
5. Medical microbiology, virology and immunology: Textbook for students of medical universities. A. A. Vorobyov, A. S. Bykov, M. N. Boychenko, eds. 3rd ed. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo; 2022. ISBN 978-5-9986-0478-2. (in Russian)
6. Segura F., Pons I., Sanfeliu L., Nogueras M. Shell-vial culture, coupled with real-time PCR, applied to *Rickettsia conorii* and *Rickettsia massiliae*-Bar29 detection, improving the diagnosis of the Mediterranean spotted fever. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2016.
7. Ammerman N.C., Beier-Sexton M., Azad A.F. Laboratory Maintenance of *Rickettsia rickettsii*. *Current protocols microbiology*. 2008; Chapter 3; Unit 3A.5.
8. Eremeeva M.E., Shpynov S.N., Tokarevich N.K. Modern approaches to laboratory diagnosis of rickettsiosis. *Infektsiya i immunitet*. 2014; 4(2): 113-34. (in Russian)
9. Brouqui P., Bacellar F., Baranton G., Birtles R. J., Bjoer'sdorff A., Blanco J. R. et al. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*. 2004; 10(12):1108-32.
10. Kissenkötter J., Hansen S., Böhlken-Fascher S., Ademowo O.G., Oyinloye O.E., Bakarey A.S. et al. Development of a pan-rickettsial molecular diagnostic test based on recombinase polymerase amplification assay. *Analytical Biochemistry*. 2018; 544: 29-33.
11. Beskhlebцова О.В., Гранитов В.М., Дедков В.Г. Лабораторная диагностика клещевых инфекций с природной очаговостью (клещевой риккетсиоз, иксодовый клещевой боррелиоз). *Бюллетень медицинской науки*. 2017; 8 (4): 50-5. (in Russian)
12. Gafarova M.T., Bondarenko E.I., Maliy K.D., Alieva E.E., Evstafiev I.L., Tovpinets N.N., Malaya N.K., Kubyshekin A.V. Prevalence of causative agents of transmissible tick-borne rickettsioses in the Crimean Peninsula. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2022; 67(3):170-6. (in Russian)
13. Shchuchinova L.D., Bondarenko E.I., Echesheva A.V., Shvalov A.N., Zlobin V.I. Tick-borne rickettsiosis caused by *Rickettsia heilongjiangensis*, and its laboratory diagnostics in the Altai Republic. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2020; 4: 143. (in Russian)
14. Alieva E.E., Bondarenko E.I., Maliy K.D., Gafarova M.T., Shvalov A.N., Verbenets E.A. The role of Rhipicephalus sanguineus ticks parasitizing dogs in the spread of tick-borne rickettsial pathogens in the city of Sevastopol. *New microbes and new infections*. 2020; 36: 100704.
15. Sil'chenko E.V., Oshorova L.M., Balzhinimaeva I.Ts., Bondarenko E.I., Dasheeva N.A., Baldanov B.V., Symbelova T.A. Detection of causative agents of tick-borne infections by polymerase chain reaction assay carried out as a part of clinical studies in the "Republican clinical infectious diseases hospital" of Ulan-Ude. *Acta biomedica scientifica*. 2018; 3(4): 138-42. (in Russian)