

УДК 637:616.98:579.869.1

UDC 637:616.98:579.869.1

**КОНТРОЛЬ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСТРЫХ  
КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ НА ОСНОВЕ  
ПЦР-РТ**

**CONTROL OF ACTIVATORS OF SHARP  
INTESTINAL INFECTIONS OVER BASIS PCR-  
RT**

Бровкина Анна Николаевна  
к.в.н., докторант  
*Государственное научное учреждение  
Всероссийский научно-исследовательский  
институт ветеринарной санитарии, гигиены и  
экологии РАСХН, Москва, Россия*

Brovkina Anna Nikolaevna  
Cand. Vet.Sci., competitor for doctor's degree  
*The state scientific institute the All-Russia scientific  
research institute of veterinary sanitary, hygiene and  
ecology, The Russian academy of agricultural  
sciences, Moscow, Russia*

Методика «мультиплексной» ПЦР в сочетании с автоматической экстракцией нуклеиновых кислот позволяет проводить контроль возбудителей острых кишечных инфекций бактериальной и вирусной природы в объектах окружающей среды с высокой скоростью, специфичностью и чувствительностью

The "multiplex" PCR technique in a combination with automatic extraction of nucleonic acids allows to carry out the control of activators of sharp intestinal infections of the bacterial and virus nature over objects of an environment with high speed, specificity and sensitivity

Ключевые слова: ПРОТИВОЭПИДЕМИЧЕСКИЕ МЕРОПРИЯТИЯ, ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА, ТЕСТ-СИСТЕМЫ, МЕТОД ПЦР-РТ

Keywords: ANTI-EPIDEMIC ACTIONS, LABORATORY DIAGNOSTICS, TESTS - SYSTEMS, METHOD PCR-RT

В медицинской практике при поиске возбудителей пищевых токсико-инфекций и определении направлений противоэпидемических мероприятий важным является сочетание быстроты и качества проведения исследований. Условия и факторы, способствующие распространению этих инфекций, многообразны. Ими могут быть как не выявленные источники инфекции, так и множественные пути и факторы передачи инфекции. Одним из самых современных и удобных вариантов лабораторной диагностики является метод ПЦР-РТ с использованием тест-систем в формате «мультиплекс».

В проведенных нами исследованиях для постановки ПЦР-РТ в формате «мультиплекс» использовали набор реагентов для выявления и дифференциации ДНК микроорганизмов рода *Shigella* (*Shigella* spp.) и энтероинвазивных *E. coli* (EIEC), *Salmonella* (*Salmonella* spp.) и *Campylobacter* (*Campylobacter* spp.), аденовирусов F (*Adenovirus* F) и РНК ротавирусов группы А (*Rotavirus* А), норовирусов 2 генотипа (*Norovirus* 2 генотип) и астровирусов (*Astrovirus*) в объектах окружающей среды и

клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс<sup>®</sup>» производства ФГУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора. Выделение ДНК и РНК из исследуемого материала проводили с использованием набора «РИБО-сорб», производства ФГУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора, а также с помощью автоматическую станцию для экстракции нуклеиновых кислот «NucliSENS<sup>®</sup> easyMAG<sup>™</sup>» («BioMerieux», Франция). Для перевода РНК в форму кДНК использовали реакцию обратной транскрипции. Амплификацию проводили на приборе «Rotor Gene 6000» (производства «Corbett Research», Австралия). На амплификаторе запускали программу для тестов «Shig/Salm» и «Camp/Adeno», и для тестов «Noro/ВКО» и «Rota/Astro». Допускается использование универсальной программы амплификации для всех образцов.

Проводили индикацию *Shigella* spp., EIEC, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., Adenovirus F, Rotavirus A, Norovirus 2 генотип, и Astrovirus в объектах окружающей среды (вода открытых водоемов, вода бассейнов, смывы с поверхностей. Всего исследовано 118 проб воды бассейнов с различной системой водоподготовки (хлорированием – с концентрацией остаточного хлора 0,3 мг/л и озонированием) и 120 смывов с поверхностей на наличие вышеперечисленных патогенов в осенне-зимний период.

Термином «сальмонеллезы» обозначают большую группу острых инфекционных заболеваний, возбудителями которых являются многочисленные серовары рода *Salmonella*. Они характеризуются значительным полиморфизмом течения с преимущественным поражением желудочно-кишечного тракта и высокой степенью выраженности симптомов общей интоксикации, и могут встречаться как в виде спорадических случаев, так и групповых заболеваний (5).

Сальмонеллы принадлежат к числу микроорганизмов, широко распространенных во всех странах мира; при этом одни из сероваров являются убиквитарными, тогда как другие скорее можно рассматривать как локальные, свойственные определенным регионам (5).

Род *Salmonella* включен в семейство Enterobacteriaceae. Этот род объединяет более 2200 серовариантов, которые разделены по антигенному родству на 65 серогрупп (представлены в схеме Кауфмана-Уайта). В пределах каждого серовара сальмонеллы подразделяются на биовары, фаговары, кроме того, они различаются по характеру продуцируемого бактериоцина и по устойчивости к действию определенных антибиотиков.

Сальмонеллы являются микроорганизмами, характеризующимися выраженной полипатогенностью. Подавляющее большинство известных ныне серовариантов патогенны как для человека, так и для различных животных и птиц.

Сальмонеллы – мелкие грамтрицательные палочки с закругленными концами от 1 до 4 мкм длиной и 0,3-0,8 мкм шириной. Они, как правило, подвижны благодаря перитрихально расположенным жгутикам. Некоторые серовары всегда неподвижны. В мазках располагаются одиночно, беспорядочно. Спор и капсул не образуют. Сальмонеллы – аэробы и факультативные анаэробы. Границы температурного режима для роста сальмонелл находятся между +7°C и +45°C, при этом оптимальной температурой является +35°C - +37°C (наиболее короткое время генерации). Возможность размножения этих бактерий вне указанных границ не исключается, однако, интенсивность его значительно уменьшается. При температуре ниже +5°C рост их полностью прекращается.

Существенное влияние на рост сальмонелл оказывает рН среды. Они могут расти при значениях рН не ниже 4,1 и не выше 9,0, оптимальной концентрацией водородных ионов является 6,5 – 7,5. Рост сальмонелл

ограничивается или подавляется в присутствии высоких концентраций солей или сахаров.

Динамика заболеваемости дизентерией с 2000 года до настоящего времени характеризуется стабильным снижением количества случаев заболеваний. Дизентерию в последние десятилетия чаще всего вызывают шигеллы Зоне и Флекснера. В этиологической структуре возбудителей на долю шигелл Зонне и Флекснера приходится по 50%. На фоне практически повсеместного снижения заболеваемости дизентерией, остается высокая «вспышечная» заболеваемость как пищевого, так и водного характера, причем при водных вспышках в качестве этиологического агента преобладают шигеллы Флекснера, а при пищевых – шигеллы Зоне. На долю вспышек пищевого характера приходится 73%, водного – 18%, контактно-бытового – 7% от общего их количества. Заболеваемость носит сезонный характер, возрастая в летне-осенний период.

Возбудители дизентерии относятся к семейству Enterobacteriaceae роду *Shigella*. Род *Shigella* включает 4 группы и соответственно вида: *Sh. dysenteriae*, *Sh. flexneri*, *Sh. boydii*, *Sh. sonnei*, различающиеся по биохимическим свойствам и составу антигенов.

Шигеллы – грамотрицательные неподвижные палочки с закругленными концами, факультативные аэробы. Не имеют жгутиков (а следовательно – H-антигена), капсул не образуют. Большинство шигелл имеют фимбрии общего типа, выполняющие функцию адгезии к эпителию слизистой оболочки толстой кишки (5).

Кампилобактериоз – зооантропонозная инфекционная болезнь, характеризующаяся преимущественным поражением желудочно-кишечного тракта, тенденцией к генерализации процесса, развитием септицемии и поражением различных органов и систем. Возбудители – микроаэрофильные грамотрицательные палочки подвижные неспорообразующие бактерии рода *Campylobacter*. Резервуар и источники

инфекции – дикие и сельскохозяйственные животные и птицы. Механизм передачи – фекально-оральный, основной путь передачи – пищевой.

Аденовирусная инфекция – острая вирусная инфекция, характеризующаяся поражением слизистых оболочек верхних дыхательных путей, кишечника, лимфоидной ткани и протекающая с умеренно выраженной интоксикацией. Возбудители – ДНК-геномные (линейная двунитиевая ДНК) безоболочечные вирусы семейства *Adenoviridae* с икосаэдрической симметрией капсида. В данное семейство входят аденовирусы человека, животных и птиц. Большинство из вызываемых ими инфекций ассоциировано с респираторными заболеваниями, часть – с кишечными и глазными инфекциями.

Ротавирусная инфекция - острая вирусная инфекционная болезнь, характеризующаяся преимущественным поражением пищеварительного тракта, общей интоксикацией, дегидратацией. Возбудители ротавирусной инфекции РНК-геномные (геном представлен сегментированной двунитиевой РНК) вирусы семейства *Reoviridae*, не имеют липидной оболочки. Первоначально вирусы семейства *Reoviridae* были классифицированы как ЕСНО-вирусы 10 типа. Название представляет собой аббревиатуру английского «respiratory enteric orphans» (респираторно-кишечные «сиротские» вирусы. Резервуар и источник инфекции – человек; хотя вирус патогенен для многих видов животных (2).

Ранее считалось, что патогенные для животных ротавирусы не имеют эпидемиологического значения, однако, выявлены вспышки ротавирусной инфекции, вызванные реассоциантами ротавирусов людей и свиней, описаны случаи заражения ротавирусом собак.

Ротавирусы и аденовирусы длительно сохраняются во внешней среде, довольно устойчивы к воздействию физических и химических факторов. Возможна реализация пищевого и контактно-бытового путей передачи возбудителя.

Астровирусная инфекция - вирусная инфекционная болезнь с фекально-оральным механизмом передачи возбудителя, характеризующаяся нарушением функций пищеварительной системы. Распространена повсеместно. Отмечена зимне-весенняя сезонность в странах с умеренным климатом.

Наиболее часто реализуется водный путь передачи возбудителя, но зарегистрированы и случаи пищевой передачи инфекции, при этом, фактором передачи возбудителя являлись морепродукты.

Возбудитель – РНК-содержащий вирус семейства *Astroviridae* (геном представлен одноцепочечной РНК позитивной полярности,  $6,4 - 7,4 \times 10^3$  н.о.).

Вирионы астровирусов (*Astrovirus*) имеют сферическую форму, лишены оболочки. Поверхность нуклеокапсида на электронно-микроскопических фотографиях имеет звездчатую форму. Нуклеокапсид имеет икосаэдрическую симметрию (1).

Ассоциированные с *Astrovirus* спорадические диарейные заболевания и эпидемические вспышки небактериальной природы, по различным источникам, составляет от 2 до 8%.

Норовирусные инфекции занимают значительное место среди острых кишечных инфекций вирусной этиологии. По всему миру регистрируются как спорадические вспышки норовирусной инфекции, так и массовые вспышки и очаги в закрытых коллективах (1).

Механизм передачи вируса фекально-оральный, также реализуются водный, пищевой и контактно-бытовой пути передачи возбудителя. Описаны вспышки при употреблении в пищу устриц, в которых вирус сохраняется до нескольких недель и сохраняет способность к размножению. Доказана возможность норовируса персистировать в воде бассейнов и источниках питьевой воды, накапливаться в ягодах, овощах,

птице и мясных продуктах (2). Норовирусы вызывают более 85% небактериальных гастроэнтеритов у проживающих в Европе (4).

Прослеживается осенне-зимняя сезонность подъема заболеваемости. Норовирусы обладают достаточно высокой устойчивостью к воздействию факторов окружающей среды: замораживанию, нагреванию до 60°C, хлорированию в концентрации от 0,5 до 1,0 мг/л, рН 2,7 и обработке эфиром, этанолом или детергентами (3).

Норовирус (Norovirus) (первоначальное название Norwalk virus), — это РНК-содержащий вирус семейства Caliciviridae. Вирион норовирусов (27 -40 нм) лишен оболочки. Капсид имеет икосаэдрическую симметрию и состоит из 32 субъединиц с чашеобразной формой внешней поверхности и осью симметрии 5-го порядка; более мелкие субъединицы имеют ось симметрии 3-го порядка. Основным Структурным компонентом капсида является капсидный белок СР (capsid protein). Геном норовируса представляет собой одноцепочечную РНК позитивной полярности размером приблизительно 7,3 -8,3 тыс. нуклеотидов.

Для индикации вышеперечисленных возбудителей разработан комплекс лабораторных методов, однако, наиболее эффективным и удобным, в том числе по количеству затраченного на анализ времени, в настоящее время является метод ПЦР-РТ.

Все исследуемые образцы тестировали, используя как метод выделения нуклеиновых кислот с использованием набора «РИБО-сорб», так и автоматическую экстракцию.

Перед выделением нуклеиновых кислот из возбудителей проводили процесс концентрирования проб воды. В случае значительного загрязнения исследуемых проб их предварительно фильтровали через бумажные фильтры. Затем, 1 – 2 мл проб воды концентрировали высокоскоростным центрифугированием (10 мин, 12000g). Смывы с поверхностей брали с помощью комплекта для отбора проб «Portagerm». Затем, сваб отжимали о

стенки пробирки, содержащей 2 мл стерильного физиологического раствора и концентрировали высокоскоростным центрифугированием (10 мин, 12000g). Для выделения нуклеиновых кислот с помощью набора «РИБО-сорб» использовали 100 мкл осадка. Для экстракции НК на автоматической станции «NucliSENS® easyMAG™» использовали 150 мкл осадка.

Лизис при автоматической экстракции проводили вне прибора в течение 30 минут с внесением внутреннего контроля вместе с сорбентом. Далее экстракцию проводили в автоматическом режиме.

Для детекции РНК-содержащих вирусных агентов: Rotavirus A, Norovirus 2 генотип, и Astrovirus непосредственно после этапа экстракции РНК проводили реакцию обратной транскрипции в соответствии с инструкцией к тест-системе «АмплиСенс ОКИ скрин-FL», производства ФГУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора. Готовый препарат кДНК использовали для постановки реакции амплификации.

На рис. 1 показаны кривые мультиплексной реакции амплификации микроорганизмов рода *Shigella* (*Shigella* spp.) и энтероинвазивных *E. coli* (EIEC), *Salmonella* (*Salmonella* spp.) и *Campylobacter* (*Campylobacter* spp.), аденовирусов F (*Adenovirus* F) и РНК ротавирусов группы А (*Rotavirus* A), норовирусов 2 генотипа (*Norovirus* 2 генотип) и астровирусов (*Astrovirus*)

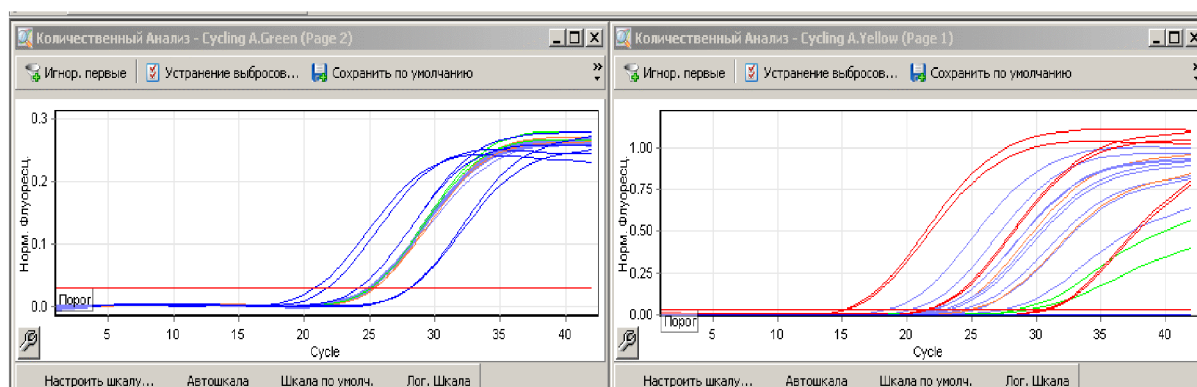


Рис.1. Кривые мультиплексной реакции амплификации возбудителей острых кишечных инфекций.



Как видно из данных, представленных на рисунке 1, положительные контроли и внутренние контроли имеют характерные кривые, отрицательные контроли лежат ниже базовой линии, что свидетельствует об отсутствии ингибиторов и нормальном прохождении реакции с возможностью интерпретации результатов. При этом, использование автоматического экстрактора нуклеиновых кислот сокращает время анализа в 3 раза.

Результаты мониторинговых исследований индикации возбудителей пищевых токсико-инфекций в пробах воды и смывах с поверхностями представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Результаты исследований проб воды и смывов с поверхностями на наличие возбудителей пищевых токсико-инфекций

Объект исследования	Анализируемые патогены			
	«Shig/Salm»	«Camp/Adeno»	«Noro/BKO»	«Rota/Astro»
Образцы воды открытых водоемов	Shigella spp.- н/о; Salmonella spp. – 1	Campylobacter spp.- н/о; Adenovirus F – 7	Norovirus 2 генотип – 1	Rotavirus A – н/о; Astrovirus – н/о
Образцы воды из бассейнов после водоподготовки хлорированием	Shigella spp.- н/о; Salmonella spp. – н/о	Campylobacter spp.- н/о; Adenovirus F – н/о	Norovirus 2 генотип- 3	Rotavirus A – н/о; Astrovirus – 6
Образцы воды из бассейнов после водоподготовки озонированием	Shigella spp.- н/о; Salmonella spp. – н/о	Campylobacter spp.- н/о; Adenovirus F – н/о	Norovirus 2 генотип – н/о	Rotavirus A – н/о; Astrovirus – н/о
Смывы с поверхностей	Shigella spp.- н/о; Salmonella spp. – 1	Campylobacter spp.- н/о; Adenovirus F – н/о	Norovirus 2 генотип – 4	Rotavirus A – 1 Astrovirus – 2

- Число проанализированных проб воды – 118;
- Число проанализированных смывов с поверхностей – 120.

Показана возможность использования прибора «NucliSENS® easyMAG™» («BioMerieux», Франция) в комплексе с коммерческими тест-

системами «АмплиСенс» для автоматизации ПЦР-исследований, что позволяет повысить количество проводимых исследований и значительно сократить время проведения анализа, а также в значительной мере позволит исключить ошибки оператора при «ручном» выделении, и устранить связанную с этим возможность получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

Показано, что применение методологии «мультиплексной» ПЦР в сочетании с автоматической экстракцией способно значительно повысить информативность анализа при сокращении времени его проведения, а также проводить качественную дифференциальную диагностику возбудителей вирусных инфекций. Кроме того, применение данной технологии позволяет многократно повысить результативность диагностических исследований.

Список использованной литературы:

1. Кальцивирусная инфекция: клиника, диагностика, лечение: Методические рекомендации. – М., 2006.-19с.
2. Hansman G. S., Sano D., Ueki Y. et al. Sapovirus in water, Japan // *Emerg. Infect. Dis.* – 2006/ - Vol.131/ - p.133-135.
3. Hansman G. S., Oka T., Okamoto R. et al. Human sapovirus in Clams, Japan // *Emerg. Infect. Dis.* – 2007/ - Vol.132/ - p.620-622.
4. Lapman B. A. Adak G. K. Reacher M. H. et al. Two epidemiologic patterns of norovirus outbreaks: surveillance in England and wales, 1992-2000 // *Emerg. Infect. Dis.* – 2003/ - Vol.9/ - p.71-77.
5. Рут Ф. Гастроэнтерология. – М.: Медицина, 1985. – С. 350 – 351.