

родстве этих штаммов и являться генотипической особенностью (маркером) этой группы штаммов.

3. Сравнительный анализ геномов возбудителей чумы и псевдотуберкулеза с точки зрения единичных нуклеотидных замен показал, что у псевдотуберкулеза выявлены единичные отличия нуклеотидов, как в местах их “традиционного” расположения у чумы, так и в новых фрагментах, исследованных генов. Вместе с тем, в тех же генах, отмечено сравнимое число коротких делеций, отсутствующих в ДНК штаммов возбудителя чумы.

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ДНК *Y. PESTIS*

Федорова М.В.¹, Карань Л.С.¹, Колясникова Н.М.¹, Куклев В.Е.², Осина Н.А.²

¹ ФГУН «Центральный НИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора РФ, Москва, Россия;

² Российский Научно-исследовательский противочумный институт «МИКРОБ», Саратов, Россия.

Введение. Чума, одна из самых опасных природно-очаговых инфекций в прошлом, остается эпидемиологически значимой и в наше время. Природные очаги чумы существуют в Азии, Африке, Восточной Европе, Южной и Северной Америках. В России они занимают обширные площади в степных, пустынных и высокогорных районах на юге Европейской части, Сибири и Дальнего Востока. После длительного периода эпидемического благополучия, вспышки чумы наблюдались в Индии (1994, 2002), Индонезии (2007), а начиная с 2005 г в 14 странах, включая граничащие с РФ Монголию и КНДР (Китай), регистрируют более 2000 случаев заболеваний ежегодно (WHO, 2009). По мнению экспертов ВОЗ, чуму можно отнести к категории возвращающихся инфекций. Развитие туризма, высокая миграционная активность населения, а также возможность использования возбудителя *Y. pestis* в качестве агента биотерроризма, создают риск международного распространения чумы и возникновения эпидемии (Inglesby et al., 2000).

Несмотря на доступность средств специфической терапии, смертность от бубонной чумы до сих пор достигает 10% и превышает 40% при заболевании легочной формой. Одна из основных причин высокой смертности, а также быстрого распространения болезни, заключает-

ся в поздней постановке диагноза. Наиболее перспективными путем совершенствования методов диагностики является использование диагностических тест-систем на основе ПЦР в режиме реального времени в связи с их возможностью обеспечить высокую чувствительность, специфичность и оперативность исследований, а также универсальность этапов анализа для любого типа исследуемого материала (объекты окружающей среды, животные-носители, переносчики и люди).

В России использование методов амплификации нуклеиновых кислот для детекции и идентификации *Y.pestis* регламентировано МУ 3.1.3.2355-08 "Организация и проведение эпидемиологического надзора в природных очагах чумы на территории Российской Федерации". В связи с этим, **целью работы** было создание метода выявления ДНК *Y.pestis*, основанного на ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

Материалы и методы. В работе использовали вакцинный штамм *Y.pestis* Ev и 17 штаммов *Y.pestis*, находящихся в Государственной коллекции патогенных бактерий (ФГУЗ РосНИПЧИ "Микроб", Саратов). Из них 5 штаммов относились к основному подвиду и 12 штаммов - к неосновным подвидам: кавказскому (2 штамма), алтайскому (4 штамма), гиссарскому (3 штамма), улегейскому (3 штамма). Штаммы были выделены на территории РФ.

В исследование были включены микроорганизмы: *Y. enterocolitica* (326 штаммов), *Y. pseudotuberculosis* (145 штаммов) (из собрания ФГУН ЦНИИ эпидемиологии), биологический материал - суспензии внутренних органов грызунов (30 проб) из Липецкой области, клещей *Dermacentor reticulatus* (40 проб) из Курганской области, блох ***Ctenocephalus felis*** (11 пулов по 25 особей) из лабораторной культуры ВНИИДиС и клинический материал: кровь (30), моча (30), от больных с заболеваниями, исключаящими чуму; мазки из респираторного тракта (42 пробы) от больных ОРВИ, патологический материал (печень, селезенка, легкие) от людей, не болевших чумой.

Экстракцию ДНК из образцов полевого, клинического материала и штаммов микроорганизмов проводили с помощью набора "Рибо-преп" (производство ЦНИИ эпидемиологии).

В качестве мишени амплификации использовали специфический участок ДНК *Y.pestis* (Chain et al., 2004), к которому были подобраны олигонуклеотидные праймеры и зонд, меченные флуоресцентной меткой JOE. Дополнительно были использованы праймеры и зонд, меченные флуоресцентной меткой FAM, комплементарные ДНК универсального внутреннего контроля (ВКО STI 87), разработанного в ЦНИИ эпидемиологии и предназначенного для оценки эффективности этапа экстракции нуклеиновых кислот.

Результаты. При оценке специфичности разработанной ПЦР установлено, что флуоресценция по каналу JOE регистрируется только при исследовании бактериальных суспензий 17 исследованных штаммов *Y.pestis* и вакцинного штамма *Y.pestis Ev*. При тестировании гетерологичных микроорганизмов во всех случаях нарастания флуоресценции не происходило. Исследование образцов клинического материала не дало положительных результатов в ПЦР. При анализе блох и полевого материала (суспензий внутренних органов грызунов и клещей) ДНК *Y.pestis* также не была обнаружена.

Для определения аналитической чувствительности данного теста был создан положительный контрольный образец ДНК *Y.pestis* (ПКО) путем клонирования фрагментов ДНК вакцинного штамма *Y.pestis Ev*, ограниченных выбранными праймерами, в pGMT векторе. Аналитическая чувствительность разработанной ПЦР тест-системы при экстракции ДНК из всех перечисленных видов клинического и полевого материала, составила 5×10^2 копий/мл.

Заключение. Разработана методика для выявления фрагмента генома *Y.pestis* и ДНК внутреннего контрольного образца методом ПЦР с детекцией флуоресценции в режиме реального времени. Предварительные результаты апробации методики свидетельствуют об ее высокой аналитической чувствительности и специфичности.

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ O1 ПО ОСНОВНЫМ ГЕНАМ ПАТОГЕННОСТИ

Хайтович А.Б.^{1,2}, Ильичев Ю.А.¹, Пидченко Н.Н.¹, Хайтович А.Г.², Шварсалон Н.А.¹

¹ Государственное учреждение «Украинская противочумная станция» Министерства здравоохранения Украины, Симферополь, Украина;

² Государственное учреждение «Крымский государственный медицинский университет имени С.И. Георгиевского», Симферополь, Украина

Введение. *V.cholerae* O1 серогруппы обладают большим количеством факторов патогенности – Zot (zonula occludens toxin), Ace (accessory cholera enterotoxin), цитотоксическим комплексом RTX (repeat in toxin), цитотоксическим фактором Cef (CHO-elongation factor), термостабильным токсином ST, NTC токсином (new cholera toxin), NMDCT токсином (non-membrane-damaging cytotoxin), шиго-