

Ю.А.Панфёрова<sup>1</sup>, О.А.Фрейлихман<sup>1</sup>, Н.К.Токаревич<sup>1</sup>, С.Ф.Карпенко<sup>2</sup>, Х.М.Галимзянов<sup>2</sup>

**СРАВНЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДОВ ДЕТЕКЦИИ COXIELLA BURNETII В КРОВИ БОЛЬНЫХ ЛИХОРАДКОЙ КУ НА ОСНОВЕ АМПЛИФИКАЦИИ ФРАГМЕНТОВ ГЕНА 16S рРНК (СТАНДАРТНАЯ ПЦР) И ГЕНА groEL (ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ)**

<sup>1</sup> НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург; <sup>2</sup> Астраханский государственный медицинский университет

*Цель.* Сравнение диагностических возможностей двух вариантов ПЦР для выявления персистенции *Coxiella burnetii* в динамике инфекционного процесса у больных лихорадкой Ку. *Материалы и методы.* Было исследовано 110 проб клинического материала, полученного от больных лихорадкой Ку в эндемичном для данной инфекции регионе (Астраханская область). Пробы были исследованы в стандартной ПЦР (маркер — фрагмент гена 16S рРНК) и в ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) (маркер — фрагмент гена groEL). *Результаты.* Было установлено, что оба маркера являются перспективными для обнаружения ДНК *C. burnetii* в клиническом материале, а РВ-ПЦР выявляет положительный результат, в том числе на поздних сроках заболевания (21 — 31 день болезни). *Заключение.* Данная работа является первой российской публикацией о сравнении разных вариантов ПЦР для выявления *C. burnetii* в крови больных Ку-лихорадкой в динамике инфекционного процесса.

Журн. микробиол, 2016, № 3, С. 70—74

Ключевые слова: лихорадка Ку, *Coxiella burnetii*, ПЦР, ПЦР в режиме реального времени, чувствительность, диагностическая эффективность

Yu.A.Panferova<sup>1</sup>, O.A.Freilikhman<sup>1</sup>, N.K.Tokarevich<sup>1</sup>, S.F.Karpenko<sup>2</sup>, Kh.M.Galimzyanov<sup>2</sup>

**COMPARISON OF DIAGNOSTIC EFFECTIVENESS OF METHODS OF DETECTION OF COXIELLA BURNETII IN BLOOD OF PATIENTS WITH Q FEVER BASED ON AMPLIFICATION OF 16S rRNA GENE FRAGMENTS (STANDARD PCR) AND groEL GENE (REAL-TIME PCR)**

<sup>1</sup>Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg; <sup>2</sup>Astrakhan State Medical University, Russia

*Aim.* Comparison of diagnostic capabilities of 2 variants of PCR for detection of *Coxiella burnetii* persistence in dynamics of infectious process in patients with Q fever. *Materials and methods.* 110 samples of clinical material, obtained from patients with Q fever in an endemic region for this infection (Astrakhan region), were studied. The samples were studied in a standard PCR (marker — 16S rRNA gene fragment) and in real-time PCR (RT-PCR) (marker — groEL gene fragment). *Results.* Both markers were established to be perspective for detection of *C. burnetii* DNA in clinical material, and RT-PCR detects positive result including late stages of the disease (illness day 21 — 31). *Conclusion.* This study is the first Russian publication on comparison on different PCR variants for detection of *C. burnetii* in blood of Q fever patients in dynamics of the infectious process.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 3, P. 70—74

Key words: Q fever, *Coxiella burnetii*, PCR, real-time PCR, sensitivity, diagnostic effectiveness

## ВВЕДЕНИЕ

Лихорадка Ку представляет собой распространенное по всему миру зооантропонозное заболевание, вызываемое облигатным внутриклеточным патогеном *S. burnetii*. Острая форма лихорадки Ку часто проявляется в виде гриппоподобного заболевания, атипичной пневмонии, сопровождающейся головной и перiorбитальной болью, и реже гепатитом [4, 12]. В зависимости от состояния пациента и его иммунного статуса, примерно у пяти процентов больных, не получающих рациональную терапию, может развиваться хроническая форма данной инфекции, сопровождающаяся эндокардитом с высокой степенью летальности в 60 — 70% случаев [8, 9].

Отсутствие патогномических симптомов у больных лихорадкой Ку не позволяет диагностировать эту инфекцию без применения лабораторных методов. Лабораторная диагностика лихорадки Ку, как правило, проводится с помощью серологических методов, таких как реакция непрямой иммунофлюоресценции и иммуноферментный анализ, направленный на выявление антител [7, 9]. Однако данные методы имеют ограниченное применение на ранних сроках заболевания, поскольку процесс образования антител, выявляемых в этих реакциях, может достигать двух недель. Столь позднее обнаружение антител связано с существенной гиподиагностикой лихорадки Ку, в ряде случаев — с нерациональным лечением больных, что может привести к хронизации инфекции. Для прямого определения ДНК *S. burnetii* в клинических образцах за рубежом успешно применяют методы детекции, основанные на амплификации нуклеиновых кислот, в том числе стандартную ПЦР, гнездовую ПЦР, ПЦР в режиме реального времени и изотермическую реакцию с формированием петель (LAMP) [5, 10, 11]. Для надежного определения ДНК патогена в клиническом материале требуются высокочувствительные модификации ПЦР [8], в частности, ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ), основанная на накоплении флюоресцентного сигнала в процессе анализа. Хотя для выявления ДНК *S. burnetii* у экспериментально и естественно зараженных животных успешно применялись различные модификации ПЦР [3, 5, 6], диагностика лихорадки Ку у людей методами детекции, основанными на амплификации нуклеиновых кислот, нашла применение преимущественно за рубежом [11]. Кроме того, остается не ясным, в какие сроки целесообразно применять молекулярные методы детекции и как долго можно обнаруживать ДНК патогена в крови больных, получающих антибиотики.

Астраханская область является эндемичным регионом по заболеваемости лихорадкой Ку [1, 2]. Ранее нами была разработана методика детекции ДНК коксиелл на основе амплификации фрагмента высококонсервативного гена *groEL* в стандартной ПЦР, успешно применяющаяся нами для работы с биологическим материалом (органы мелких диких млекопитающих и иксодовые клещи) [3]. Эти данные побудили нас разработать набор для выявления *S. burnetii* методом ПЦР-РВ с данным генетическим маркером. Целью настоящего исследования являлось сравнение диагностических возможностей двух вариантов ПЦР для выявления персистенции *S. burnetii* в динамике инфекционного процесса у больных лихорадкой Ку.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования были 110 образцов цельной венозной крови пациентов, больных Ку-лихорадкой, на разных сроках болезни и реконвалесценции. Пробы были получены от 97 пациентов со среднетяжелым течением Ку-лихорадки (77 мужчин, средний возраст 30,94 лет; 20 женщин, средний возраст 48,2 лет; средний возраст всех больных 35,25 лет). Все больные находились на лечении в Областной инфекционной клинической больнице им. А.М.Ничоги (ОИКБ) в городе Астрахань. Диагноз ставился на основании клинических данных, эпиде-

миологического анамнеза и результатов лабораторных исследований. Все больные получали антибиотики (доксциклин, амоксиклав, цефтриаксон либо ципрофлоксацин) по стандартной схеме.

У части больных был проведен анализ крови методом ПЦР на ранних сроках заболевания (преимущественно 4 — 10 день болезни, на высоте лихорадки) в лаборатории ОИКБ с коммерческой тест-системой «Амплисенс *Coxiella burnetii*-FL» (ЦНИИЭ, Россия) согласно инструкции. При отрицательном результате ПЦР и в случаях, когда ПЦР не проводилась, диагноз был подтвержден серологическими методами, IgM и IgG к коксиеллам определяли с использованием тест-систем для ИФА, фаза II «*Coxiella burnetii* ELISA kits IgM, IgG» (Vircell, Испания) согласно рекомендациям производителя.

Отбор больных и образцов крови проводился сотрудниками Астраханского государственного медицинского университета. Анализируемые образцы крови однократно замораживали при  $-20^{\circ}\text{C}$  для хранения и пересылки. Выделение ДНК из 200 мкл оттаявшей цельной крови проводили методом лизиса гуанидинизотиоционатом с последующей сорбцией на носителе с помощью набора «Diatom DNA Prep200» (Изоген лаборатория, Россия) согласно инструкции.

Стандартная ПЦР, ПЦР-РВ и секвенирование фрагмента гена 16S рРНК проводилось в НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера. Стандартную ПЦР проводили с праймерами *gibo-F TTCTCAAGGGTAATATCCTTG* и *gibo-R CGCTACTAAGAAGTGAACCTC*, фланкирующими фрагмент гена 16S рРНК размером 403 п.н., в термоциклере «Veriti thermal cycler» (Life Technologies, США). Амплификация проводилась с использованием готовой пятикратной смеси для ПЦР «PCR ScreenMix» (Евроген, Россия) и включала следующие параметры: денатурация  $95^{\circ}\text{C}$  3 мин., 40 циклов денатурация  $95^{\circ}\text{C}$  15 сек, отжиг  $57^{\circ}\text{C}$  30 сек, элонгация  $72^{\circ}\text{C}$  40 сек. Результаты ПЦР определяли после электрофоретического разделения продукта в 1,5% агарозном геле.

ПЦР в режиме реального времени проводили с оригинальными праймерами *groEL-F STTCTACTGTATGACGCCTTCTTTGC* и *groEL-R CGCAAGTAGG CACCATTCTGTC*, фланкирующими фрагмент гена шаперонина GroEL, и зондом *groEL-Probe FAM-CACCTTTCTCCATCGCTTCCGCAATAATA-BHQ1* (патент РФ № 2525059) в термоциклере «Stratagene MX3005P» (Agilent, США) с детекцией флуоресцентной метки по каналу FAM. Для амплификации применялась пятикратная смесь «qPCR Mix HotStart» (Евроген, Россия). Программа амплификации включала следующие параметры: денатурация  $95^{\circ}\text{C}$  5 мин., 40 циклов денатурация  $95^{\circ}\text{C}$  15 сек, отжиг  $60^{\circ}\text{C}$  30 сек с детекцией флуоресцентного сигнала по конечной точке, элонгация  $72^{\circ}\text{C}$  30 сек.

Часть положительных проб, несущих фрагмент гена 16S рРНК, была секвенирована с использованием генетического анализатора «MegaBase 1000» и набора «BigDye Terminator kit» (Life Technologies, США) согласно рекомендациям производителя. Полученные нуклеотидные последовательности сравнивали с последовательностями гена 16S рРНК *S. burnetii*, депонированными в базе данных NCBI GeneBank, с помощью программы NCBI BLAST.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что применение тест-системы «Амплисенс *Coxiella burnetii*-FL» на первых днях болезни позволило выявить ДНК *S. burnetii* у большей части больных. Так, на 4 — 5 сутки болезни количество положительных проб составило 82,4%, а на 6 — 10 сутки — 75,6% соответственно. Среди проб, проанализированных на более поздних сроках, процент выявляемости ДНК коксиелл в пробах был значительно ниже (50% на 10 — 15 день и ни одной пробы на 21 — 25 день болезни).

С помощью стандартной ПЦР с фрагментом гена 16S рРНК были получены

следующие результаты: на 6 — 10 день болезни было получено 87,5% положительных образцов, на 11 — 15 — 75%, на 16 — 20 — 100%, на 21 — 25 день — 46,2%, на 26 — 31 день — 20%. Отрицательные результаты, полученные с помощью тест-системы «Амплиценс *Coxiella burnetii*-FL» и стандартной ПЦР на поздних сроках инфекции, вероятно, обусловлены недостаточной чувствительностью, не позволяющей с помощью этих методик выявлять небольшое количество коксиелл, циркулирующих в крови пациентов, получающих антибиотики. Средний процент положительных результатов ПЦР с данным маркером составил 76,4% (84 пробы из 110). Проведенный анализ методом секвенирования полученных ампликонов гена 16S рРНК выявил высокую степень гомологии (99%) амплифицированных фрагментов с опубликованными в базах данных GeneBank последовательностями данного гена *C. burnetii* и подтвердил специфическую амплификацию фрагмента гена 16S рРНК в исследованных нами в режиме стандартной ПЦР пробах.

Для ПЦР в режиме реального времени с фрагментом гена *groEL* была отмечена высокая чувствительность практически на всех сроках заболевания. Частота обнаружения ДНК коксиелл составила на 6 — 10 день болезни 97,5%, на 11 — 15 день — 100%, на 16 — 20 — 91,7%, на 21 — 25 и 25 — 31 дни болезни — по 100%. Средний процент положительных результатов ПЦР с данным генетическим маркером составил 98,2% (108 проб из 110).

Таким образом, наибольшая чувствительность среди использованных нами двух оригинальных диагностических систем отмечена для ПЦР-РВ с фрагментом гена *groEL*, в том числе на поздних сроках заболевания (21 — 31 день болезни), что позволяет проводить диагностику методом ПЦР в режиме реального времени даже в период реконвалесценции и при интенсивной антибиотикотерапии.

В ходе работы было установлено, что амплификация целевых фрагментов ДНК *C. burnetii* происходит с неодинаковой частотой для различных вариантов ПЦР. Так, стандартная ПЦР 16S рРНК была положительной в 76,4%, а ПЦР-РВ *groEL* — в 98,2% от общего числа проб.

Установлено, что амплификация таких генетических мишеней, как 16S рРНК и фрагмент гена *groEL*, является высокоэффективным методом детекции коксиелл в крови больных лихорадкой Ку на разных сроках заболевания, в том числе в ходе проведения антибиотикотерапии, когда происходит элиминация патогена из циркулирующей крови. Показана высокая чувствительность ПЦР-РВ с фрагментом гена *groEL* на разных сроках инфекционного процесса, что позволяет не только диагностировать Ку-лихорадку на ранних сроках болезни, когда применение серологических методов, как правило, неэффективно, но и проводить ретроспективный анализ с использованием этого генетического маркера для выявления коксиеллезной этиологии. Данная работа является первой российской публикацией о сравнении разных вариантов ПЦР для выявления *C. burnetii* в крови больных Ку-лихорадкой в динамике инфекционного процесса и позволяет судить об эффективности ПЦР-РВ для выявления ДНК коксиелл на разных сроках заболевания.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бармин А.Н., Колчин Е.А., Шуваев Н.С., Дмитриева М.В. Анализ проявления природно-очаговых заболеваний на территории Астраханской обл. *Естес. науки.* 2012, 3 (40): 44-50.
2. Садретдинов Р.А., Галимзянов Х.М. Гемодинамические типы микроциркуляции у больных инфекционными лихорадками. *Фундамент. исслед.* 2010, 7: 63-66.
3. Фрейлихман О.А., Панфёрова Ю.А., Токаревич Н.К. Совершенствование метода детекции *Coxiella burnetii* в биологическом материале на основе амплификации гена *groEL*. *Журн. микробиол.* 2010, 4: 71-74.
4. Arricau-Bouvery N., Hauck Y., Bejaoui A. et al. Molecular characterisation of *Coxiella burnetii* isolates by infrequent restriction site-PCR and MLVA typing. *BMC Microbiology.* 2006, 6 (38). doi: 10.1186/1471-2180-6-38.

5. Bielawska-Drozd A., Cieslik P., Mirski T. et al. Q fever — selected issues. *Ann. Agric. Environmental Med.* 2013, 20 (2): 222-232.
6. Freylikhman O., Tokarevich N., Suvorov A. et al. persistence in three generation of mice after application of live attenuated human M-44 vaccine against Q fever. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2003, 990: 496-499.
7. Jatou K., Peter O., Raoult D. et al. Development of a high throughput PCR to detect *Coxiella burnetii* and its application in a diagnostic laboratory over a 7-year period. *New Microbes New Infect.* 2013, 1 (1): 6-12. doi: 10/1002/2052-2975.8.
8. Marrie T., Raoult D. Q fever—a review and issues for the next century. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 1997, 8 (3): 145-161. doi: 10.1016/S0924-8579(96)00369-X.
9. Maurin M., Raoult D. Q fever. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999, 12 (4): 518-553.
10. Raele D., Garofolo G., Galante D. et al. Molecular detection of *Coxiella burnetii* using an alternative loop-mediated isothermal amplification assay. *Veterinaria Italiana.* 2015, 51 (1): 73-78. doi: 10.12834/VetIt.3041168.4.
11. Tilburg J., Melchers W., Pettersson A. et al. Interlaboratory evaluation of different extraction and real-time PCR methods for detection of *Coxiella burnetii* in serum. *J. Clin. Microbiol.* 2010, 48 (11): 3924-3927. doi: 10.1128/JCM.01006-10.
12. van Schaik E., Chen C., Mertens K. et al. Molecular pathogenesis of obligate intracellular bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.* 2013, 11 (8): 561-573. doi: 10.1038/nrmicro3049.

*Поступила 04.11.15*

Контактная информация: Панфёрова Юлия Александровна,  
197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14, р.т. (812)232-21-36

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*А.Ю.Попова<sup>1,2</sup>, А.Н.Куличенко<sup>3</sup>, О.В.Малецкая<sup>3</sup>,  
В.М.Дубянский<sup>3</sup>, А.Г.Рязанова<sup>3</sup>, Д.А.Прислегина<sup>3</sup>,  
Л.И.Шапошникова<sup>3</sup>, Е.А.Манин<sup>3</sup>, Ю.В.Юничева<sup>4</sup>,  
Л.Е.Василенко<sup>4</sup>, Д.С.Агапитов<sup>3</sup>, В.Н.Савельев<sup>3</sup>, Д.Ю.Дегтярев<sup>3</sup>,  
Е.В.Герасименко<sup>3</sup>, Е.В.Лазаренко<sup>3</sup>, А.Ю.Жильцова<sup>3</sup>, А.С.Волынкина<sup>3</sup>,  
Е.С.Котенев<sup>3</sup>, И.В.Савельева<sup>3</sup>, А.А.Хачатурова<sup>3</sup>, И.В.Кузнецова<sup>3</sup>,  
И.В.Жарникова<sup>3</sup>, Ю.М.Евченко<sup>3</sup>, А.А.Зайцев<sup>3</sup>, А.Д.Антоненко<sup>5</sup>, В.Г.Оробей<sup>5</sup>*

## ОБЕСПЕЧЕНИЕ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО БЛАГОПОЛУЧИЯ В РЕГИОНЕ Г.-К. СОЧИ ПО ОПАСНЫМ И ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫМ ИНФЕКЦИОННЫМ БОЛЕЗНЯМ В 2015 ГОДУ

<sup>1</sup>Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва; <sup>2</sup>Российская медицинская академия последипломного образования, Москва; <sup>3</sup>Ставропольский противочумный институт; <sup>4</sup>Сочинское отделение Причерноморской противочумной станции, Сочи; <sup>5</sup>Ставропольский государственный медицинский университет

*Цель.* Анализ результатов эпидемиологического мониторинга особо опасных, природно-очаговых и других инфекционных болезней, а также эпизоотологической активности природных очагов инфекций на территории г.-к. Сочи. *Материалы и методы.* Проведены лабораторные исследования ПЦР, иммуно- и бактериологическими методами 820 проб, из них 344 — клинического материала, 12 — воды открытых водоемов и 321 — полевого материала. Выполнена молекулярно-генетическая идентификация 143 штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных из открытых водоемов г.-к. Сочи. *Результаты.* Установлена циркуляция возбудителей Ку-лихорадки, туляремии и геморрагической лихорадки с почечным синдромом генотипа Добrava-Адлер, а также риккетсий группы клещевых пятнистых лихорадок. При исследовании проб клинического материала в этиологической структуре спорадически возникающих острых кишечных инфекций выявлено преобладание ротавирусов (70,9%). Поддержанию контаминации *V. cholerae* воды р. Агура способствовали относительно высокие значения температуры речной