

А.М.Сеничкина, Н.А.Осина, А.С.Абдрашитова, В.Г.Германчук

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПЦР С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ «ГЕН *FRANCISELLA TULARENSIS* - РЭФ» И «ГЕН *FRANCISELLA TULARENSIS* - РГФ» ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ОТ ЖИВОТНЫХ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТУЛЯРЕМИЕЙ

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

Цель работы. Оценка диагностической эффективности ПЦР с использованием тест-систем «Ген *Francisella tularensis* - РГФ» и «Ген *Francisella tularensis* - РЭФ» в сравнении с другими методами при исследовании материала, полученного от животных с экспериментальной туляремией. **Материалы и методы.** Проведено исследование проб лимфоузлов, печени, селезенки, легкого и сердца, полученных от животных с экспериментальной туляремией с различной инфекционной нагрузкой, с помощью ПЦР, ИФА, ИХА, МФА, бактериоскопии и бактериологического анализа. **Результаты и выводы.** Установлена высокая диагностическая эффективность метода ПЦР (98 %) с применением тест-систем «Ген *Francisella tularensis* - РЭФ» и «Ген *Francisella tularensis* - РГФ» при выявлении возбудителя туляремии в пробах биологического материала от инфицированных животных. Для других методов данный показатель составил: ИФА – 70,4 %, МФА – 72,1 %, бактериоскопии – 54 % и бактериологического анализа – 64,3 %. Продemonстрирована возможность и информативность исследования пробы легкого на наличие *F. tularensis* на ранних этапах развития заболевания у высоковосприимчивых животных с помощью ПЦР и бактериологического метода.

Ключевые слова: диагностическая эффективность, ПЦР, экспериментальная туляремия.

Корреспондирующий автор: Айслу Махамятовна Сеничкина., e-mail: rusrapi@microbe.ru.

А.М.Senichkina, N.A.Osina, A.S.Abdrashitova, V.G.Germanchuk

Assessment of Diagnostic Efficiency of PCR Kits «Gen *Francisella tularensis* - REF» and «Gen *Francisella tularensis* - RGF» when Analyzing Biological Samples from Animals with Experimental Tularemia

Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russian Federation

Objective of the study is to assess diagnostic efficiency of PCR kits «Gen *Francisella tularensis* - REF» and «Gen *Francisella tularensis* - RGF», when performing analysis of biological samples from animals with experimental tularemia, as compared to other diagnostic methods. **Materials and methods.** Samples of lymphatic node, liver, spleen, lung and heart tissues, taken from animals with experimental tularemia with different infectious load, have been analyzed by PCR, ELISA, immune-chromatography, DFA, microscopy and culture cultivation. **Results and conclusions.** High diagnostic efficiency (98 %) has been determined for PCR kits «Gen *Francisella tularensis* - REF» and «Gen *Francisella tularensis* - RGF», used for detection of tularemia agent in biological samples taken from infected animals. For other diagnostic methods this index is: 70,4 % – for ELISA, 72,1 % – for DFA, 54 % – for microscopy and 64,3 % – for culture cultivation. Demonstrated has been the possibility and informational content of investigating lung samples for the presence of *F. tularensis* at early stages of infection in highly susceptible animals, using PCR and culture cultivation.

Keywords: diagnostic efficiency, PCR, experimental tularemia.

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

Corresponding author: Aislu M. Senichkina, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Senichkina A.M., Osina N.A., Abdrashitova A.S., Germanchuk V.G. Assessment of Diagnostic Efficiency of PCR Kits «Gen *Francisella tularensis* - REF» and «Gen *Francisella tularensis* - RGF» when Analyzing Biological Samples from Animals with Experimental Tularemia. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 4:79–84. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-79-84

В связи с сохраняющейся активностью природных очагов туляремии на территории Российской Федерации и других стран важное значение имеет своевременное выявление туляремийного микроба в пробах от диких мелких млекопитающих или их трупов, собранных в природе, подснежных гнезд грызунов и продуктов их жизнедеятельности, пометок хищных птиц, помета хищных млекопитающих, эктопаразитов и из объектов окружающей среды. Для проведения лабораторных исследований в соответствии с МУ 3.1.2007-05 «Эпидемиологический

надзор за туляремией» предусмотрено использование бактериоскопии, люминесцентной микроскопии, иммуносерологических реакций, полимеразной цепной реакции (ПЦР), бактериологического анализа и биологической пробы. Чувствительность ряда из обозначенных приемов при исследовании суспензий органов мелких млекопитающих хорошо известна: для бактериоскопии и люминесцентной микроскопии данный показатель составляет $1 \cdot 10^9$ и $1 \cdot 10^6$ м.к./г (мл) соответственно, а для бактериологического и биологического методов – единичные

клетки патогена [8]. В то же время данных о диагностической эффективности амплификационных технологий крайне мало. Н. Rossow *et al.* [10] при воспроизведении туляреминой инфекции на биопробных животных показали, что уже на третий день с момента подкожного и интраназального заражения в дозе 120 и 1200 м.к. ДНК *F. tularensis holarctica* выявляется в пробах суспензий селезенки и почек, при этом концентрация возбудителя составляет от $1 \cdot 10^3$ до $1 \cdot 10^4$ м.к./г (мл). Через пять дней заболевания авторы детектировали туляреминый микроб дополнительно в пробах фекалий и мочи, а его количество в пробах суспензий селезенки и почек увеличилось до $1 \cdot 10^7 - 1 \cdot 10^9$ м.к./г. Для выявления ДНК *F. tularensis* была использована количественная ПЦР с праймерами на основе гена, кодирующего белок 23 кДа, предложенная Т. Skottman *et al.* [11].

Ранее нами были разработаны и зарегистрированы препараты для обнаружения возбудителя туляремии методом ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени («Ген *Francisella tularensis* - РГФ») и методом электрофореза в агарозном геле («Ген *Francisella tularensis* - РЭФ») [4]. В ходе лабораторных, технических и клинических испытаний подтверждена высокая чувствительность ($1 \cdot 10^3$ м.к./мл) и специфичность (100 %) данных наборов реагентов. Для проведения анализа использовали бактериальные суспензии штаммов микроорганизмов и пробы клинического и биологического материала, искусственно контаминированные туляреминым микробом. Получен положительный опыт по использованию этих тест-систем для выявления ДНК *F. tularensis* в полевом материале при проведении эпизоотологического мониторинга территорий Российской Федерации [7]. Однако данные о чувствительности и специфичности ПЦР с этими препаратами при анализе материала от животных с туляреминой инфекцией отсутствуют.

Целью исследования являлось определение диагностической эффективности ПЦР с применением тест-систем «Ген *Francisella tularensis* - РГФ» и «Ген *Francisella tularensis* - РЭФ» в сравнении с другими методическими приемами при исследовании биологического материала от животных с экспериментальной туляремией.

Материалы и методы

Для моделирования туляреминой инфекции использовали штамм *F. tularensis* подвид *holarctica* КМ-8. Культуру выращивали на FT агаре (pH 7,2) при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 48 ч. Затем готовили бактериальную взвесь штамма в 2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида по отраслевому стандартному образцу мутности – 10 единиц ФГБУ «НЦЭСМП» (ОСО 42-28-85-П (10МЕ)), что соответствует $5 \cdot 10^9$ м.к./мл для *F. tularensis*. Далее осуществляли 10-кратные разведения полученной суспензии в 0,9 % растворе натрия хлорида до конечной концентрации $5 \cdot 10^6 - 5 \cdot 10^1$ м.к./мл.

В качестве биопробных животных использовали беспородных белых мышей, которым подкожно вводили по 0,2 мл суспензии туляреминого микроба, содержащей патоген в концентрации $1 \cdot 10^6 - 1 \cdot 10^1$ м.к.

За биопробными животными было установлено наблюдение в течение 9 дней с момента заражения. По одному не павшему животному вскрывали на 3, 5, 8-е сутки после заражения, а также исследовали всех павших животных.

Для анализа отбирали кусочки паренхиматозных органов, где наиболее вероятно локализуется возбудитель туляремии при инфекционном процессе: печень, селезенка, легкое, а также пробы лимфатических узлов и сердца [3].

Весь биологический материал исследовали бактериологическим (культуральным), бактериоскопическим (мазки, окрашенные по Граму), иммуносерологическими (метод флуоресцирующих антител – МФА, иммунохроматографический анализ – ИХА, иммуноферментный анализ – ИФА) и молекулярно-генетическим (ПЦР) методами.

Проведение люминесцентной микроскопии осуществляли с использованием «Иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих туляреминых» (Медгамал), иммуноферментного анализа – с набором реагентов «ИФА-Тул-СтавНИПЧИ» (ФКУЗ «Став НИПЧИ»), иммунохроматографического анализа – с препаратом «ИХ тест-система *F. tularensis* (ЛПС)» (ФБУН «ГНЦ ПМБ»), ПЦР – с наборами реагентов «Ген *Francisella tularensis* - РГФ» и «Ген *Francisella tularensis* - РЭФ» (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб») в соответствии с инструкциями к препаратам.

Результаты и обсуждение

Известно, что большинство диких и лабораторных животных по отношению к туляреминой инфекции, вызванной *F. tularensis holarctica*, делятся на три группы: I – виды высоковосприимчивые и высокочувствительные к туляремии, II – высоковосприимчивые, но малочувствительные, III – маловосприимчивые и практически нечувствительные к туляремии [3]. Мелкие млекопитающие, которые составляют большую часть материала, собранного при проведении эпизоотологического мониторинга, относятся к I группе, реже – ко II.

У видов животных, относящихся к I группе, заболевание протекает в острой форме и заканчивается гибелью животных, при этом интенсивность обсеменения паренхиматозных органов и крови к концу заболевания достигает $1 \cdot 10^{10} - 1 \cdot 10^{11}$ м.к./г (мл) [3]. В то же время у животных II группы наблюдается умеренное накопление возбудителя – не более $1 \cdot 10^9$ м.к./г (селезенка) и $1 \cdot 10^3$ м.к./мл (кровь). Течение заболевания у животных данного типа в большинстве случаев доброкачественное и заканчивается формированием иммунитета.

Для создания инфекционного процесса у био-

пробных животных (белые мыши, I группа) с разным уровнем обсемененности органов и крови было выбрано 6 заражающих доз: от $1 \cdot 10^6$ до $1 \cdot 10^1$ м.к., при этом высокими концентрациями ($1 \cdot 10^6 - 1 \cdot 10^4$ м.к.) заражали по 3, а низкими ($1 \cdot 10^3 - 1 \cdot 10^1$ м.к.) – по 5 животных. Сроки наблюдения и исследования составили 9 дней. Первый этап исследования проводили через 3 дня, второй – через 5 дней, третий и четвертый (при наличии выживших животных) – на 8 и 9-й день.

При наблюдении за экспериментальными животными на 1–2-е сутки после заражения видимых симптомов заболевания не выявлено. На 3-и сутки у животных, зараженных высокими концентрациями возбудителя ($1 \cdot 10^6 - 1 \cdot 10^5$ м.к.), отмечалось снижение аппетита, активности и веса, на 5-е сутки – все животные пали. Развитие инфекционного процесса при введении меньшего количества микробных клеток возбудителя туляремии ($1 \cdot 10^4 - 1 \cdot 10^1$ м.к.) было более длительным и достигало 8–9 дней. При вскрытии в органах всех павших животных отмечались патологоанатомические изменения, характерные для туляремийной инфекции [2, 3].

Для оценки диагностической эффективности метода ПЦР с применением тест-систем «Ген *Francisella tularensis* - РГФ» и «Ген *Francisella tularensis* - РЭФ» в сравнении с другими методическими приемами осуществляли анализ каждого вида материала от биопробных животных (кусочки печени, селезенки, легкого, сердца, лимфатических узлов) с помощью ПЦР, МФА, ИФА, бактериологического анализа и бактериоскопии.

В последние годы для выявления антигенов туляремийного микроба в пробах из объектов окружающей среды и для идентификации выделенных культур патогена нашел применение иммунохроматографический анализ с использованием набора реагентов «ИХ тест-система *F. tularensis* (ЛПС)» [6]. Однако возможность использования этого подхода для обнаружения возбудителя туляремии в пробах биологического материала от животных не изучена. В то же время С.А.Бельковой и С.В.Балахоновым получен положительный опыт выявления антигенов чумного микроба в суспензиях органов мелких мле-

копитающих методом ИХА [1]. Поэтому весь биологический материал, полученный от биопробных животных, мы также исследовали с помощью ИХА.

Методом ПЦР с использованием генодиагностических препаратов «Ген *Francisella tularensis* - РГФ» и «Ген *Francisella tularensis* - РЭФ» ДНК туляремийного микроба выявлена во всех пробах печени, селезенки, легкого, сердца, лимфатических узлов биопробных животных уже на 3-и сутки с момента заражения возбудителем в концентрациях от $1 \cdot 10^6 - 1 \cdot 10^5$ м.к. (табл. 1). У всех животных этой группы к этому моменту наблюдались признаки болезни. Аналогичный результат получен при исследовании материала от животных, инфицированных таким же количеством клеток патогена, на 5-е сутки, когда они все пали.

При снижении заражающей дозы до $1 \cdot 10^4 - 1 \cdot 10^1$ м.к. результаты анализа практически не изменились: ДНК *F. tularensis* выявлена во всех исследованных пробах на 3, 5, 8-е сутки, за исключением суспензий печени от биопроб, инфицированных 100 и 10 м.к. возбудителя туляремии на 3-и и 5-е сутки. Одной из причин получения отрицательных результатов может быть то, что на ранних сроках заболевания, вызванного попаданием в организм восприимчивого животного небольшого количества клеток туляремийного микроба, накопление возбудителя в ткани печени происходит медленно, и его концентрация невелика. К 8-м суткам количество микроорганизмов становится достаточным, чтобы выявить с помощью ПЦР. Данный факт подтверждают результаты исследования этих же проб с помощью других методов лабораторной диагностики туляремии. Возбудитель туляремии в пробах печени обнаружен только с помощью бактериологического анализа на 5-е сутки заболевания животных.

Особый интерес представляют данные о выявлении ДНК туляремийного микроба во всех исследованных пробах суспензий легкого вне зависимости от использованной заражающей дозы и сроков анализа. Это может указывать на то, что в ткани легких животных I группы возбудитель попадает очень быстро и сохраняется там до конца инфекционного

Таблица 1

Результаты исследований проб материала от животных с экспериментальной туляремией методом ПЦР с использованием наборов реагентов «Ген *Francisella tularensis* - РГФ» и «Ген *Francisella tularensis* - РЭФ»

Метод	Выявление туляремийного микроба в суспензиях															Заражающая доза, м.к.
	лимфоузлов			печени			селезенки			легких			сердца			
	Сутки															
	3-и	5-е	8-е	3-и	5-е	8-е	3-и	5-е	8-е	3-и	5-е	8-е	3-и	5-е	8-е	
ПЦР			н/и			н/и			н/и			н/и			н/и	1·10 ⁶
			н/и			н/и			н/и			н/и			н/и	1·10 ⁵
																1·10 ⁴
																1·10 ³
																1·10 ²
																1·10 ¹

Примечание: серым выделены положительные результаты, н/и – не исследуются.

Результаты исследований проб материала от животных с экспериментальной туляремией с помощью иммуносерологических и бактериологических методов

Метод	Выявление туляремийного микроба в суспензиях															Заражающая доза, м.к.
	лимфоузлов			печени			селезенки			легких			сердца			
	Сутки															
	3-и	5-е	8-е	3-и	5-е	8-е	3-и	5-е	8-е	3-и	5-е	8-е	3-и	5-е	8-е	
МФА			н/и			н/и			н/и			н/и			н/и	1·10 ⁶
			н/и			н/и			н/и			н/и			н/и	1·10 ⁵
																1·10 ⁴
																1·10 ³
																1·10 ²
																1·10 ¹
ИФА			н/и			н/и			н/и			н/и			н/и	1·10 ⁶
			н/и			н/и			н/и			н/и			н/и	1·10 ⁵
																1·10 ⁴
																1·10 ³
																1·10 ²
																1·10 ¹
ИХА			н/и			н/и			н/и			н/и			н/и	1·10 ⁶
			н/и			н/и			н/и			н/и			н/и	1·10 ⁵
																1·10 ⁴
																1·10 ³
																1·10 ²
																1·10 ¹
Бактериоскопия			н/и			н/и			н/и			н/и			н/и	1·10 ⁶
			н/и			н/и			н/и			н/и			н/и	1·10 ⁵
																1·10 ⁴
																1·10 ³
																1·10 ²
																1·10 ¹
Бактериология			н/и			н/и			н/и			н/и			н/и	1·10 ⁶
			н/и			н/и			н/и			н/и			н/и	1·10 ⁵
																1·10 ⁴
																1·10 ³
																1·10 ²
																1·10 ¹

Примечание: серым выделены положительные результаты, н/и – не исследуются.

процесса. Подтверждением тому являются данные о развитии к концу заболевания дисметаболических и медиаторных процессов в легочной ткани биопробных животных с экспериментальной туляремией, которые приводят к нарушению гемодинамики, вентиляции и мощному повреждению ткани легких [2].

Детекция ДНК туляремийного микроба в пробах легких на ранних этапах развития заболевания также установлена Р.А.Еmanuel *et al.* [9] при исследовании проб печени, селезенки, легкого и почек от белых мышей, зараженных интраназально штаммом *F. tularensis* подвид *tularensis* SCHU 4 в концентрации $1,04 \cdot 10^4$ КОЕ/мл, через 1, 24, 48, 72, 96 ч. Анализ осуществляли с помощью бактериологического метода и ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов с праймерами на основе генов *forA* и *tul4*. Авторы показали, что ДНК возбудителя туляремии выявлена в суспензиях легкого и почек

биопробных животных уже через 2 дня после инфицирования, а в пробах печени и селезенки – только через 4 дня. Результаты, полученные в ходе нашего эксперимента, в полной мере согласуются с данными Р.А.Еmanuel *et al.* (2003) и подтверждают факт обнаружения ДНК возбудителя туляремии в пробах легкого методом ПЦР на ранних сроках заболевания животного.

Все пробы суспензий органов экспериментальных животных были также исследованы с помощью ИФА, ИХА, МФА, бактериоскопии и бактериологического анализа (табл. 2).

При анализе проб от животных, инфицированных $1 \cdot 10^6$ – $1 \cdot 10^5$ м.к. патогена, диагностическая эффективность методов на 3-и сутки составляла: МФА – 40 %, ИХА – 0 %, ИФА – 60 %, культуральный – 100 %. На 5-е сутки возбудитель туляремии был выявлен во всех образцах с помощью бакте-

риоскопии, МФА и посева на плотные питательные среды (100 %). Чувствительность ИХА и ИФА при исследовании проб от животных этой группы на 5-е сутки зависела от заражающей дозы: при $1 \cdot 10^6$ м.к. она составляла 80 и 100 %, а при $1 \cdot 10^5$ м.к. – 50 и 80 % соответственно.

При снижении заражающей дозы до $1 \cdot 10^4$ м.к. возбудитель туляремии выявлен на 3-и и 5-е сутки в 20 и 60 % проб с помощью бактериоскопии соответственно, в 40 и 60 % – МФА, 0 и 20 % – ИХА, 20 и 80 % – ИФА, 80 и 100 % – при посеве на плотные питательные среды. На 8-й день, когда наблюдался падеж всех биопробных животных этой группы, чувствительность использованных диагностических приемов составляла от 100 % (бактериоскопия, МФА), 80 % (ИХА, ИФА) до 40 % (бактериологический анализ). При посеве материала от павших животных на плотные питательные среды не всегда удавалось получить рост колоний возбудителя туляремии из-за ингибирования посторонней микрофлорой.

При исследовании материала от животных, зараженных $1 \cdot 10^3$ – $1 \cdot 10^1$ м.к., туляремиальный микроб выявлен с помощью бактериоскопии в 20 % случаев на 3-и и 5-е сутки заболевания, МФА – 40 %, ИХА – 0 %, ИФА – 20–60 %. С помощью бактериологического анализа в материале от биопробных животных этой группы на 3-и сутки ни в одном случае культуру *F. tularensis* выделить не удалось, тогда как на 5-е сутки чувствительность метода составила 100 % и патоген выявлен во всех видах материала. На 8-е сутки эксперимента после падежа большинства животных диагностическая эффективность методических подходов зависела от использованной заражающей дозы (рисунок).

Исходя из полученных данных, видно, что при низкой заражающей дозе на ранних этапах развития заболевания у животных I группы наиболее информативными для выявления патогена являются МФА и ПЦР, тогда как к концу болезни – ИФА и ПЦР.

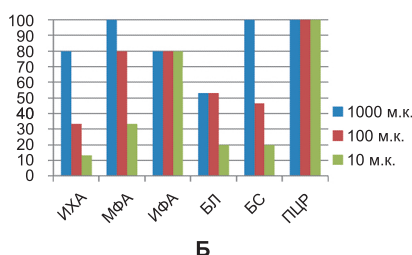
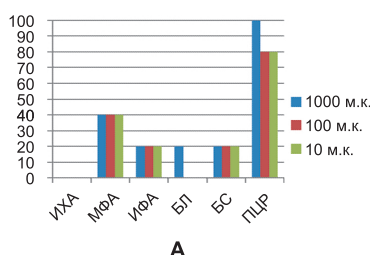
Эффективность использованных методов также отличалась для каждого вида материала. Наибольшая информативность МФА наблюдалась при исследовании мазков-отпечатков лимфоузлов и селезенки вне зависимости от сроков заболевания и количества клеток, использованных для заражения животных. В то же время в мазках-отпечатках печени, легкого и сердца возбудитель туляремии с помощью данного подхода был выявлен только к концу заболевания, когда происходит генерализация процесса и количество патогена в органах увеличивается до $1 \cdot 10^7$ м.к./г (мл) и выше.

Аналогичные результаты получены при использовании световой микроскопии и окраски мазков-отпечатков анилиновыми красителями по Граму. Возбудитель туляремии выявлен во всех исследованных пробах биологического материала в случае инфицирования животных высокими концентрациями туляремиального микроба. При более низкой заражающей дозе патоген детектирован только в образцах от животных на 8–9-е сутки.

Метод ИФА позволил обнаружить *F. tularensis* в суспензиях лимфоузлов, печени и селезенки на 3-и и 5-е сутки при введении животным $1 \cdot 10^6$ – $1 \cdot 10^5$ м.к. туляремиального микроба, и на 5–8-е сутки при дозе $1 \cdot 10^4$ – $1 \cdot 10^1$ м.к. Выявление антигенов возбудителя туляремии данным способом в суспензиях легкого отмечено только к концу заболевания. С помощью ИХА туляремиальный микроб детектирован в пробах суспензий лимфоузлов, печени, селезенки, легкого биопробных животных только на 5–8-е сутки инфекционного процесса, когда в органах животных накапливается достаточное количество клеток патогена.

С использованием бактериологического анализа выделить культуру *F. tularensis* удалось в равной степени из всех исследованных видов биологического материала на 3-и и 5-е сутки при заражении животных высокими концентрациями возбудителя. При снижении заражающей дозы и увеличении сроков наблюдения за животными эффективность данного подхода снижалась. Так, на 5-е сутки патоген выявлен во всех видах биологического материала вне зависимости от количества клеток, использованных для инфицирования животных, а к 8-м суткам – он детектируется преимущественно в суспензиях легкого и сердца. Одной из причин отсутствия роста туляремиального микроба при посеве суспензий печени и селезенки от павших животных может быть их обильная контаминация посторонней микрофлорой. Возможно, исследование проб легкого и сердца позволит повысить информативность бактериологического анализа.

Полученные нами результаты в полной мере подтвердили диагностическую эффективность МФА, ИФА, бактериоскопии и бактериологического анализа для выявления туляремиального микроба в биологическом материале от животных в соответствии с действующими нормативно-методическими документами [6, 8]. Более того, несмотря на то, что к концу заболевания концентрация возбудителя туляремии в органах одинакова вне зависимости от заражающей дозы, на ранних стадиях болезни его количество в разных видах материала отличается. На основании



Диагностическая эффективность (%) различных методов при исследовании проб от животных с экспериментальной туляремией в зависимости от заражающей дозы (1000, 100 и 10 м.к.) и сроков исследования:

А – на 3-и сутки заболевания животных; Б – на 8-е сутки заболевания животных

анализа диагностической эффективности различных методов при исследовании суспензий легкого от животных, инфицированных различными концентрациями возбудителя туляремии, видно, что попадание патогена в ткани легких начинается сразу после заражения, однако его количество не превышает $1 \cdot 10^4$ – $1 \cdot 10^5$ м.к./г (мл). Значительная микробная обсемененность данного органа достигается только к концу заболевания. Так, при заражении животных высокими концентрациями патогена (110^6 – $1 \cdot 10^5$ м.к.), уже на 3-и сутки заболевания, при исследовании суспензий легкого, выявлена ДНК *F. tularensis* и выделена культура патогена на плотной питательной среде, тогда как с помощью иммуносерологических методов обнаружить антигены возбудителя туляремии в этом же виде материала стало возможным только на 5-е сутки инфекционного процесса, когда животные пали. При инфицировании животных низкими концентрациями ($1 \cdot 10^4$ – $1 \cdot 10^1$ м.к.) в пробах легкого ДНК патогена была детектирована на 3-и сутки заболевания, культура туляремийного микроба на плотной питательной среде выделена на 5-е сутки инфекционного процесса, а антигены возбудителя в иммуносерологических реакциях – только на 8-е сутки болезни. Полученные результаты указывают на возможность повышения информативности не только бактериологического анализа при исследовании суспензий легкого от больных животных, но и ПЦР.

Таким образом, нами установлена высокая диагностическая эффективность ПЦР с использованием наборов реагентов «Ген *Francisella tularensis* - РГФ» и «Ген *Francisella tularensis* - РЭФ» при выявлении туляремийного микроба в пробах биологического материала от животных с экспериментальной туляремией – не менее 98 %. Для других способов лабораторной диагностики туляремии данный показатель составил: ИФА – 70,4 %, МФА – 72,1 %, бактериоскопия – 54 %, бактериологический анализ – 64,3 %. Продemonстрирована возможность выявления антигенов туляремийного микроба в материале от животных методом ИХА на поздних сроках заболевания (в том числе после гибели). Показана возможность повышения информативности ПЦР и культурального метода путем дополнительного исследования суспензий легкого наряду с регламентированными для каждого метода видами биологического материала. Установлена перспективность использования ПЦР с зарегистрированными генодиагностическими препаратами в сочетании с другими методическими подходами для детекции возбудителя туляремии в материале от животных на ранних стадиях развития заболевания.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРА

1. Белькова С.А., Балахонов С.В. Индикация капсульного антигена чумного микроба в суспензиях органов мелких млекопитающих с применением иммунохроматографической тест-системы. *Дальневосточный журн. инф. патол.* 2014; 25:96–8.

2. Бугоркова С.А., Филимонова Д.Г. Оценка тяжести течения экспериментальной туляремийной инфекции по ряду морфометрических характеристик. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 2:9–53.
3. Олсуфьев Н.Г., Дунаева Т.Н. Природная очаговость. Эпидемиология и профилактика туляремии. М.; 1970. 272 с.
4. Осина Н.А., Сеничкина А.М., Бугоркова Т.В., Щербакосова С.А. Разработка амплификационных тест-систем для выявления возбудителя туляремии. *Пробл. особо опасных инф.* 2015; 2:54–7.
5. Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности: МУ 1.3.2569 – 09.
6. Порядок организации и проведения лабораторной диагностики туляремии для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней: МУ 4.2.2939-11.
7. Сеничкина А.М., Осина Н.А., Зайцев А.А., Усольцева Н.М., Усманова С.М. Апробация новых генодиагностических препаратов при эпизоотологическом мониторинге территорий Российской Федерации на наличие возбудителя туляремии. *Здоровье населения и среда обитания.* 2015; 6(267):43–6.
8. Эпидемиологический надзор за туляремией: МУ 3.1.2007-05.
9. Emanuel P.A., Bell R., Dang J.L., McClanahan R., David J.C., Burgess R.J., Thompson J., Collins L., Hadfield T. Detection of *Francisella tularensis* within Infected Mouse Tissues by Using a Hand-Held PCR Thermocycler. *J. Clin. microbiol.* 2003; 41(2): 689–93. DOI: 10.1128/JCM.41.2.689-693.20013
10. Rossow H., Forbes K.M., Tarkka E., Kinnunen P.M., Hemmila H., Huitu O., Nikkari S., Henttonen H., Kipar A., Vapalahti O. Experimental Infection of Voles with *Francisella tularensis* Indicates Their Amplification Role in Tularemia Outbreaks. *PLoS One.* 2014; 9(10):1–9. DOI: 10.1371/journal.pone.0108864.
11. Skottman T., Piiparinen H., Hyytiäinen H., Myllys V., Skurnik M., Nikkari S. Simultaneous real-time PCR detection of *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* and *Yersinia pestis*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2007; 26(2):207–11.

References

1. Bel'kova S.A., Balakhonov S.V. [Indication of plague microbe capsular antigen in suspensions of organ tissues from small mammals, using immune-chromatographic test-system]. *Dal'nevost. Zh. Infek. Patol.* 2014; 24:96–8.
2. Bugorkova S.A., Filimonova D.G. [Estimation of the severity of experimental tularemia against a number of morphometric characteristics]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 2:49–53.
3. Olsuf'ev N.G., Dunaeva T.N. [Natural Focality. Epidemiology and Prophylaxis of Tularemia]. М.; 1970. 272 p.
4. Osina N.A., Senichkina A.M., Bugorkova T.V., Shcherbakova S.A. [Development of amplification test-systems for tularemia agent detection]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2015; 2:54–7.
5. [Management of work in laboratories applying methods of amplification of nucleic acids when working with samples, containing microorganisms of the I–IV groups of pathogenicity]. Methodological regulations 1.3.2569-09.
6. [Procedure for organization and conducting laboratory diagnostics of tularemia for territorial, regional, and federal laboratory facilities]. Methodological regulations 4.2.2939-11.
7. Senichkina A.M., Osina N.A., Zaitsev A.A., Usol'tseva N.M., Usmanova S.M. [Approbation of new diagnostic preparations in the process of epizootological survey of the territories of the Russian Federation for the presence of tularemia agent]. *Zdor. Naselen. Sreda Obit.* 2015; 6(267):43–6.
8. [Epidemiological surveillance over tularemia]. Methodological regulations 3.1.2007-05.
9. Emanuel P.A., Bell R., Dang J.L., McClanahan R., David J.C., Burgess R.J., Thompson J., Collins L., Hadfield T. Detection of *Francisella tularensis* within Infected Mouse Tissues by Using a Hand-Held PCR Thermocycler. *J. Clin. microbiol.* 2003; 41(2): 689–93. DOI: 10.1128/JCM.41.2.689-693.20013
10. Rossow H., Forbes K.M., Tarkka E., Kinnunen P.M., Hemmila H., Huitu O., Nikkari S., Henttonen H., Kipar A., Vapalahti O. Experimental Infection of Voles with *Francisella tularensis* Indicates Their Amplification Role in Tularemia Outbreaks. *PLoS One.* 2014; 9(10):1–9. DOI: 10.1371/journal.pone.0108864.
11. Skottman T., Piiparinen H., Hyytiäinen H., Myllys V., Skurnik M., Nikkari S. Simultaneous real-time PCR detection of *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* and *Yersinia pestis*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2007; 26(2):207–11.

Authors:

Senichkina A.M., Osina N.A., Abdrashitova A.S., Germanchuk V.G. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Сеничкина А.М., Осина Н.А., Абдрашитова А.С., Германчук В.Г. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Поступила 27.10.16.