

А.А.Зайцев, О.А.Гнусарева, Б.В.Солодовников, Н.С.Царева, В.В.Остапович, А.Н.Куличенко

## АЛГОРИТМ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ НА ТУЛЯРЕМИЮ

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь

Предложен алгоритм лабораторной диагностики при исследовании иксодовых клещей (ИК) на туляремию, включающий проведение первичного скрининга суспензий клещей на наличие видоспецифических фрагментов ДНК и антигена. Лабораторный анализ следует начинать с постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР), учитывая ее высокую чувствительность и диагностическую значимость. Пулы с положительными результатами в ПЦР подлежат исследованию в твердофазном иммуноферментном методе и иммунохроматографических тестах. В случае обнаружения туляремийного антигена такие пулы ИК обязательно исследуют биологическим или бактериологическим методами для выделения возбудителя.

**Ключевые слова:** возбудитель туляремии, лабораторная диагностика, иксодовые клещи, природные очаги туляремии.

A.A.Zaitsev, O.A.Gnusareva, B.V.Solodovnikov, N.S.Tsareva, V.V.Ostapovich, A.N.Kulichenko

## Algorithm of Laboratory Diagnostics Applied for Examination of Ixodic Ticks for Tularemia

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol

Put forward is the algorithm of laboratory diagnostics applied for examination of Ixodic ticks (IT) for tularemia. It involves carrying out primary screening of tick suspensions for the presence of species-specific fragments of DNA and antigen. It is recommended that laboratory analysis starts with PCR, taking into account its high sensitivity and diagnostic value. Pools with positive PCR tests are subjected to verification by means of enzyme-linked immunosorbent assay and immune-chromatographic tests. In case of tularemia antigen detection, these pools of IT are examined with the help of biological or bacteriological techniques to isolate the agent.

**Key words:** tularemia agent, laboratory diagnostics, Ixodic ticks, natural tularemia foci.

При проведении градации территорий природных очагов туляремии по степени активности обязательно учитывают случаи выделения возбудителя и детекции его антигена [5].

Иксодовые клещи (ИК) подлежат исследованию на наличие возбудителя туляремии и его антигена [1, 4, 5]. В действующих инструктивно-методических документах для обнаружения туляремийного микроба в организме беспозвоночных животных рекомендовано применение биологического метода [5]. Не менее эффективен прямой посев содержимого тела ИК на питательную среду [2]. Возможно обнаружение в ИК туляремийных бактерий с помощью метода флуоресцирующих антител (МФА) и его антигена в серологических реакциях [1, 4, 5].

ИК инфицируются, кормясь на больных туляремией животных. От личинки до имаго количество туляремийных бактерий может увеличиться в клеще в 1000–10000 раз и достигнуть  $10^9$  м.к. Но если при исходном инфицирующем кормлении на больном туляремией теплокровном животном в клеща поступило недостаточное количество бактерий (менее 10000), то при переходе из одной фазы развития в другую возможно полное освобождение ИК от инфекции [3].

Очевидно, возбудитель туляремии в ИК может находиться в живом или деструктивном состоянии, в концентрациях от единичных микробных клеток до  $n \cdot 10^9$  м.к. и более. Это делает целесообразным проведение первичного скрининга с целью отбора проб,

перспективных для выделения культуры и изучения методами, выявляющими нежизнеспособные клетки туляремийного микроба.

## Материалы и методы

Исследовано 5855 иксодовых клещей, в том числе 2482 *Dermacentor marginatus* и 2598 *D. reticulatus*. Клещи были сгруппированы в 526 пулов, из которых приготовлены суспензии в 1,2–1,5 мл 0,01 М натрий-фосфатного буфера (рН 7,2–7,4). Пробы, отобранные для постановки серологических реакций, инактивировали при 56 °С в течение 30 мин в присутствии 2 % формалина.

Для проведения первичного скрининга суспензий ИК использовали диагностикум эритроцитарный туляремийный иммуноглобулиновый с чувствительностью  $6,25 \cdot 10^5$  м.к./мл в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) и тест-систему для твердофазного иммуноферментного метода (ТИФМ) чувствительностью  $1,0 \cdot 10^6$  м.к./мл, производства ФКУЗ СтавНИПЧИ Роспотребнадзора. Постановку РНГА осуществляли макрометодом в объеме 0,4 мл, а ТИФА – 0,1 мл. Суспензии ИК титровали в 4 лунках с шагом  $\frac{1}{2}$ .

Суспензии ИК с положительными результатами в РНГА и ТИФМ изучали с использованием набора реагентов для иммунохроматографического экспресс-выявления и идентификации возбудителя

Состав олигонуклеотидных праймеров для тест-системы «*Francisella tularensis* multiplex-Eph»

ДНК-мишень	Обозначение праймеров	5'-3' последовательности праймеров	Размер ампликона (п.н.)
<i>ISFtu2</i>	Ft-IS2-F	aagcaattgtagatcagttgtagg	208
	Ft-IS2-R	ataccttgaatatgctgctgatttc	
23 кDa	Ft-23 кDa-F	tgtggatgctgagtcgattc	349
	Ft-23 кDa-R	gcagtaggatcagttctcacatg	
<i>fopA</i>	Ft-fopA-F	gcaaacactaattcagctactacac	500
	Ft-fopA-R	gtaccgcctctgccattag	

туляремии «ИХ тест *F. tularensis*» (ИХ тест) с чувствительностью  $1 \cdot 10^7$  м.к./мл, производства ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» п. Оболенск. Постановку МФА осуществляли с иммуноглобулинами диагностическими флуоресцирующими туляремиными, сухими, производства филиала «Медгамал» ГУ НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи РАМН. Исследование методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) проводили с использованием мультилокусной тест-системы «*Francisella tularensis* multiplex-Eph», разработанной в ФКУЗ СтавНИПЧИ Роспотребнадзора, с праймерами комплиментарными участкам мобильного элемента *ISFtu2* и генов 23 кDa, *fopA* [6]. Чувствительность ПЦР составляла  $1 \cdot 10^2$ – $1 \cdot 10^3$  м.к./мл. Набор олигонуклеотидных праймеров для мультиплексной ПЦР тест-системы с детекцией в электрофоретическом формате представлен в таблице.

Исследование биологическим и бактериологическим методами проводили в соответствии с инструктивно-методическими документами [4, 5]. Для выделения туляремиального микроба использовали Ft-agar [2].

### Результаты и обсуждение

Нами было исследовано 217 пулов иксодовых клещей, собранных на территориях Красновардгейского, Изобильненского и Ипатовского районов Ставропольского края весной 2008 г., 129 пулов ИК – на территориях Шпаковского и Грачевского районов Ставропольского края весной 2010 г. и 180 пулов ИК – на территории Карачаево-Черкесской Республики весной 2010 г.

Суспензии ИК исследованы параллельно в РНГА, ТИФМ и ПЦР. Положительные результаты в РНГА получены при исследовании 49 пулов. В 11 из них зарегистрированы положительные результаты в ТИФМ с величиной оптической плотности в опытных лунках, соответствующей положительному контролю. Им соответствовали видоспецифические фрагменты ДНК, обнаруженные методом ПЦР. Эти 11 пулов ИК с положительными результатами в ТИФМ были изучены с помощью ИХ тестов и МФА с получением положительных результатов в 100 % случаев, а также биологическим и бактериологическим методами с выделением возбудителя туляремии.

Дополнительно в 5 суспензиях ИК (10,2 % от общего количества положительных в РНГА) заре-

гистрированы положительные результаты в ТИФМ, но с величиной оптической плотности в опытных лунках в 1,5–2 раза ниже, чем в положительном контроле. Исследование этих суспензий с помощью ИХ тестов и МФА дало отрицательные результаты, хотя в ПЦР были получены положительные. Из них не выделен туляремиальный микроб.

В оставшихся 33 пробах с положительными результатами в РНГА присутствие туляремиального антигена не подтвердилось в ТИФМ и ИХ тестах, а исследование методом ПЦР дало отрицательные результаты. Возбудитель туляремии не обнаружен в них биологическим и бактериологическим методами. Напротив, методом ПЦР положительные результаты дополнительно зарегистрированы в 6 пулах (1,3 % от общего количества отрицательных в РНГА), где возбудитель туляремии или его антиген не обнаружен при первичном скрининге.

Проведенные исследования показали, что первичный скрининг суспензий ИК можно проводить в РНГА, которую отличает методическая простота постановки и общедоступность диагностикума. Но учитывая недостаточную специфичность РНГА (6,9 % ложноположительные результаты), достоверность обнаружения туляремиального антигена в этой реакции следует подтверждать с помощью ИХ тестов или ТИФМ. Это значительно снижает целесообразность использования РНГА для исследования суспензий ИК.

Исследование пулов ИК с помощью ИХ тестов показало их высокую специфичность. Положительные результаты в ИХ тестах в 100 % случаев совпали с положительными результатами в РНГА, ТИФМ, ПЦР и выделением культур возбудителя, что позволяет рекомендовать применение ИХ тестов на практике.

Исследование твердофазным иммуноферментным методом позволило дифференцировать пробы на две группы. В первую вошли пулы ИК, в которых величина оптической плотности положительного результата иммуноферментной реакции соответствовала значению положительного контроля. Положительные результаты этого метода совпали с положительными результатами в РНГА, ИХ тестах, ПЦР и выделением культур возбудителя. Вторую группу составили пробы с положительными результатами в ТИФМ, но величиной оптической плотности в опытных лунках в 1,5–2 раза ниже, чем в положительном контроле. Из этих проб не выделен возбудитель туляремии. Согласно полученным данным,

наиболее вероятным в таких случаях может быть совпадение результатов в ТИФМ с ПЦР, на основании чего можно будет утверждать о присутствии туляремийного антигена и ДНК в исследуемом пуле ИК.

Применение ПЦР позволило подтвердить достоверность результатов ИХ тестов и ТИФМ и дополнительно обнаружить видоспецифические фрагменты ДНК еще в 6 пулах. Этот метод оказался наиболее информативным. Особую группу составили пулы ИК с отрицательными результатами в ТИФМ и других серологических реакциях, но содержащие видоспецифические фрагменты ДНК туляремийного микроба. По нашему мнению, такие результаты указывают на участки потенциально опасных территорий природного очага туляремии.

Таким образом, учитывая высокую чувствительность и диагностическую значимость ПЦР, эту реакцию следует использовать при проведении первичного скрининга суспензий ИК. Пулы с положительными результатами в ПЦР подлежат исследованию в ТИФМ и ИХ тестах для обнаружения в них туляремийного антигена. В случае обнаружения антигена такие пулы ИК обязательно подлежат изучению биологическим или бактериологическим методами для выделения туляремийного микроба с высокой степенью вероятности. Наличие одновременно положительных результатов в ТИФМ, ИХ тесте, МФА и ПЦР предполагает присутствие возбудителя туляремии в пробе.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Безсмертный В.Е., Попов В.П., Жуков В.И., Иванова С.М. Обзор эпизоотической ситуации по туляремии на территории

Российской Федерации во втором полугодии 2008 г. и прогноз на первое полугодие 2009 г. Пробл. особо опасных инф. 2009; 2(100):11–3.

2. Морозова Т.П., Домотенко Л.В., Храмов М.В. Оценка диагностических свойств прозрачной питательной среды для культивирования и выделения туляремийного микроба (Ft-agar). Пробл. особо опасных инф. 2010; 3(105):50–3.

3. Олсуфьев Н.Г., Дунаева Т.Н. Эпизоотология (природная очаговость) туляремии. В кн.: Туляремия. М.; 1960. С. 136–206.

4. Туляремия. В кн.: Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. М.: Медицина; 2009. С. 142–69.

5. Эпидемиологический надзор за туляремией. МУ 3.1.2007-05. М.; 2005. 24 с.

6. Versage J.L., Severin D.D.M., Chu M.C., Petersen J.M. Development of a Multitarget Real-Time TagMan PCR Assay for Enhanced Detection of *Francisella tularensis* in Complex Specimens. J. Clin. Microbiol. 2003; 41(12):5492–9.

#### References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Bezsmertny V.E., Popov V.P., Zhukov V.I., Ivanova S.M. [Review of tularemia epizootic situation in the Russian Federation territory in the second half of 2008 and prognosis for the first half of 2009]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2009; (100):11–3.

2. Morozova T.P., Domotenko L.V., Khranov M.V. [Evaluation of the diagnostic properties of transparent nutrient medium for cultivation and isolation of tularemia agent (Ft-agar)]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2010; (105):50–3.

3. Olsuf'ev N.G., Dunaeva T.N. [Epizootiology (natural focality) of tularemia]. In: [Tularemia]. M.; 1960. P. 136–206.

4. [Tularemia]. In: [Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases]. M.; 2009. P. 142–69.

5. [Tularemia epidemiological control]. MR 3.1.2007-05. M.; 2005. 24 p.

#### Authors:

Zaitsev A.A., Gnusareva O.A., Solodovnikov B.V., Tsareva N.S., Ostapovich V.V., Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russia. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

#### Об авторах:

Зайцев А.А., Гнусарева О.А., Солодовников Б.В., Царева Н.С., Остапович В.В., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Поступила 17.08.11.