

*На правах рукописи*

КАРИМОВА ТАТЬЯНА ВИКТОРОВНА

**ЭНТЕРОПАТОГЕННЫЕ ИЕРСИНИИ: МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ  
МОНИТОРИНГ, МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ  
ОСОБЕННОСТИ, АЛГОРИТМ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ**

03.02.03 – микробиология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Иркутск, 2017

Работа выполнена в Федеральном казенном учреждении здравоохранения «Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

**Научный руководитель:**

**Чеснокова Маргарита Валентиновна**, доктор медицинских наук, профессор

**Официальные оппоненты:**

**Дармов Илья Владимирович**, доктор медицинских наук, профессор, Филиал Центрального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации (г. Киров), главный научный сотрудник научно-исследовательского управления

**Куклева Любовь Михайловна**, кандидат биологических наук, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова» Федерального агентства научных организаций

Защита состоится 20 сентября 2017 г. в 13.00 час. на заседании диссертационного совета Д 208.078.02 по защите диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук, на соискание учёной степени доктора наук при ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт Микроб» Роспотребнадзора (410005, г. Саратов, ул. Университетская, д. 46).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте <http://www.microbe.ru/disser/dissert> ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Автореферат разослан 10 июня 2017 г.

Учёный секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук

**Слудский Александр Аркадьевич**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Энтеропатогенные представители рода *Yersinia* – *Yersinia pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* являются объектом пристального внимания и изучения в лабораториях мира (Иерсинии и иерсиниозы, 2006; Сомова Л. М. и др., 2016; Bottone E., 1997; Amphlett A., 2015). Крупные эпидемические осложнения псевдотуберкулеза периодически отмечаются в Японии, Финляндии, Канаде (Inoue M. et al., 1998; Fukushima H., 1987, 2003; Nuorti J. et al., 2004; Jalava K. et al., 2004, 2006). Кишечный иерсиниоз проявляется в виде спорадических случаев в европейских странах с высокоразвитой индустрией пищевой промышленности и занимает третье место после сальмонеллеза и кампилобактериоза, однако описано несколько эпидемических вспышек этой инфекционной болезни в Японии, США, Индии и Норвегии (Kangas S. et al., 2008; Rimhanen-Finne R. et al., 2009).

В России псевдотуберкулез регистрируется практически повсеместно, наиболее высокие показатели заболеваемости (2010–2015 гг.) характерны для СФО (4,75 ‰), СЗФО (2,52 ‰) и ДФО (1,90 ‰). Заболеваемость кишечным иерсиниозом в этих регионах также превышает заболеваемость по стране и составляет соответственно 3,05 ‰; 3,47 ‰ и 2,87 ‰ (Иерсиниозы в Российской Федерации, 2014). Однако фактическая заболеваемость не отражает истинного уровня вследствие сходства клинических симптомов с другими инфекционными болезнями или иногда с соматической патологией. Остается низким процент выделения *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* от людей и из объектов окружающей среды. Используемые классические методы лабораторных исследований (бактериологический, серологический) трудоемки, продолжительны по времени и не отвечают требованиям ранней диагностики. Поэтому важными остаются вопросы оптимизации схемы лабораторных исследований на энтеропатогенные иерсинии с применением современных молекулярно-генетических методов (PCR, MALDI-ToF MS, PFGE, VNTR). В настоящее время для качественной диагностики в Российской Федерации создана Единая национальная система индикации и идентификации возбудителей инфекционных болезней (Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней, 2013). Она предусматривает обязательное регламентирование тактических подходов к проведению анализа в лабораториях территориального, регионального и федерального уровней учреждений Роспотребнадзора, что требует разработки принципов и порядка (алгоритма) диагностических и мониторинговых исследований на *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*.

Многие микробиологические аспекты энтеропатогенных иерсиний в Российской Федерации остаются неизученными или слабо изученными, такие как популяционная структура возбудителей на отдельных территориях, распространенность и частота обнаружения иерсиний среди различных видов животных и птиц. Проведение таких комплексных исследований с определением фенотипических (ферментативная активность, био- и серотипирование) и генетических (плазмидный спектр, исследование генов, кодирующих серологическую идентичность и патогенные свойства) маркеров позволит получить информацию о

свойствах иерсиний, циркулирующих на территории Сибири и Дальнего Востока, что может стать основой унифицированного и системного микробиологического мониторинга этих возбудителей.

**Степень разработанности темы исследования.** В настоящее время для детекции возбудителей и идентификации энтеропатогенных иерсиний перспективным направлением является применение молекулярно-генетического метода исследования – ПЦР (Шурыгина И. А. и др., 2003). Однако этот метод до сих пор имеет ограниченное применение при проведении мониторинговых исследований мелких млекопитающих, диких и домашних птиц, не дана оценка частоты распространения *Y. pseudotuberculosis* и патогенных *Y. enterocolitica* в Сибири и на Дальнем Востоке.

Интенсивное развитие ПЦР дало возможность использовать этот метод для выявления хромосомных и плазмидных генов, определяющих вирулентные свойства *Y. pseudotuberculosis* (адгезивность, инвазивность, наличие суперантигена, острова высокой патогенности – НР1 и др.) (Чеснокова М. В. и др., 2006; Fukushima H. et al., 2001; Thoerner P. et al., 2003). Несмотря на биохимическое однообразие, *Y. pseudotuberculosis* дифференцируется по О-антигену на 15 сероваров и несколько подсероваров, составляя 21 антигенный вариант (Tsubokura M., Aleksic S., 1995). *Y. enterocolitica* и близкородственные виды дифференцируются по полисахаридному комплексу на 76 сероваров (Wauters G. et al., 1991) и по биохимическим признакам на шесть биогрупп, среди которых патогенные варианты представлены биотипами/сероварами 4/O:3, 2/O:5,27, 1B/O:8, 2/O:9 (Bottone E., 1997). У представителей биотипа *Y. enterocolitica* 1B есть остров высокой патогенности НР1, детерминирующий систему ассимиляции железа, однако до сих пор нет однозначного мнения о патогенном потенциале *Y. enterocolitica* 1A. Выявление факторов патогенности среди штаммов *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* позволит систематизировать информацию о фено- и генотипических характеристиках возбудителей, дополнить сведения о ведущих биотипах и сероварах энтеропатогенных иерсиний, определить их доминирующие генотипы, изучить патогенность штаммов *Y. enterocolitica* 1A.

При изучении вариабельности генома возбудителей показано, что наибольшей дискриминирующей способностью обладает метод VNTR-типирования, основанный на анализе числа tandemных повторов (Halkilahti J. et al., 2013), и PFGE, направленный на анализ полиморфизма длин фрагментов рестрикции ДНК методом электрофореза в пульсирующем поле (Lambertz S. et al., 2005). До начала наших исследований данные о популяционной структуре российских штаммов *Y. pseudotuberculosis* получены только при анализе их плазмидного профиля (Климов В. Т. и др., 1989; Шубин Ф. Н., 1993). Штаммы *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* методом PFGE не исследовались, а метод VNTR-типирования в отношении псевдотуберкулезного микроба, разработанный в последние годы, представлен фрагментарными сведениями (Евсеева В. В. и др., 2015).

До проведения настоящего исследования не определена оптимальная тактика лабораторных исследований на энтеропатогенные иерсинии с учетом многоуровневой системы мониторинга возбудителей инфекционных болезней в

Российской Федерации и отсутствовал нормативно-методический документ, регламентирующий порядок организации и проведения таких исследований.

**Цель и основные задачи исследования.** Молекулярно-биологическая характеристика *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*, циркулирующих в Сибири и на Дальнем Востоке, совершенствование микробиологического мониторинга и лабораторной диагностики.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

1. Охарактеризовать уровень лабораторных исследований на иерсинии в Сибири и на Дальнем Востоке и усовершенствовать схему исследования на *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* с использованием ПЦР-скрининга и ускоренной масс-спектрометрии при проведении микробиологического мониторинга.

2. Провести анализ результативности ПЦР при исследовании материала от людей, мелких млекопитающих и объектов окружающей среды на вспышках псевдотуберкулеза, применить VNTR-типирование и электрофорез в пульсирующем поле (PFGE) при исследовании выделенных штаммов.

3. Дать характеристику фенотипических и молекулярно-генетических свойств штаммов *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*, изолированных в Сибири и на Дальнем Востоке.

4. Предложить принципы и разработать алгоритм лабораторных исследований на энтеропатогенные иерсинии на территориальном, региональном и федеральном уровнях.

**Научная новизна и теоретическая значимость работы.** Оптимизирована схема микробиологического мониторинга энтеропатогенных иерсиний с использованием ПЦР и ускоренной идентификации бактерий масс-спектрометрическим методом, что позволило получить новые сведения о частоте и спектре выделения иерсиний в Сибири и на Дальнем Востоке.

Установлено, что птицеводческая продукция может быть фактором передачи энтеропатогенных иерсиний, а дикие перелетные птицы их потенциальным резервуаром.

Впервые показано, что фенотипически гомогенная популяция *Y. pseudotuberculosis* характеризуется генетическим полиморфизмом по плазмидному спектру, O-геновариантам, наличию генов суперантигена *urtA* и острова высокой патогенности (HPI), определено территориальное распространение и доминирующие генетические типы для циркулирующего возбудителя на территории Сибири и Дальнего Востока.

Впервые проведена комплексная характеристика по фенотипическим признакам (биотипы, серовары, фаготипы) и основным генам вирулентности (*ail*, *ystA*, *ystB*, *pYV*) представительной группы штаммов *Y. enterocolitica*, циркулирующих в Сибири и на Дальнем Востоке; обнаружение у штаммов *Y. enterocolitica* 1 А гена *ystB* (81,9 %) термостабильного энтеротоксина свидетельствует о патогенном потенциале этого возбудителя.

Впервые в России от больного человека выделена *Y. pseudotuberculosis* O:1a, имеющая кластер генов HPI при отсутствии генов суперантигена и острова патогенности YAPI.

Использование дифференцирующих тестов фукозы и сорбозы позволило идентифицировать два новых для РФ вида – *Y. mollaretii* и *Y. bercovieri*, что подтверждено их достоверной идентификацией (Score Value >2,3) методом MALDI-ToF MS.

Сформулированы принципы, предложен порядок организации и проведения лабораторных исследований на энтеропатогенные иерсинии в лабораториях различного уровня с учетом менеджмента качества, разграничения объемов и номенклатуры исследования, использования ускоренных диагностических процедур.

**Практическая значимость и внедрение результатов исследования.** На основании результатов исследования подготовлены и используются в практической деятельности учреждений здравоохранения нормативно-методические документы федерального уровня:

– Санитарные правила СП 3.1.7.2615-10 «Профилактика иерсиниозов» (утв. Постановлением руководителя Роспотребнадзора № 37 от 26.04.2010).

– Методические указания МУК 4.2.3019-12 «Организация и проведение лабораторных исследований на иерсиниозы на территориальном, региональном и федеральном уровнях» (утв. руководителем Роспотребнадзора 18.06.2012).

Разработана структура пополняемой базы данных «Штаммы *Yersinia pseudotuberculosis*, изолированные в Сибири и на Дальнем Востоке» (*PSEUDOTUBERCULOSIS*) (Свидетельство о регистрации базы данных № 2012620381 от 25.04.2012).

Штамм *Y. enterocolitica* 1382 депонирован в Государственную коллекцию патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб» в качестве тест-штамма *Y. enterocolitica* 1А, содержащего хромосомный ген *ystB* термостабильного энтеротоксина (справка о депонировании штамма *Y. enterocolitica* КМ 205 от 27.09.2009).

Штамм *Yersinia bercovieri* 1639 (штамм № 300, свидетельство от 27.01.2015) и штамм *Yersinia mollaretii* 1472 (штамм № 299, свидетельство от 27.01.2015) депонированы в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов III–IV групп патогенности ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» МЗ России.

Материалы диссертации представлены в издании:

Иерсиниозы в Российской Федерации : информ. бюл. Вып. 1 / под ред. А. Б. Жебуна. – СПб. : ФБУН НИИЭМ им. Пастера, 2014. – 56 с. – ISBN 978-5-904405-29-8.

Научные и практически значимые результаты диссертационного исследования включены в лекционные курсы дополнительного послевузовского образования при ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

**Методология и методы исследования.** Методология данной работы соответствует поставленной цели. Объектом исследования явились штаммы энтеропатогенных иерсиний (*Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*). Предметом исследования было выделение *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* в Сибири и на Дальнем Востоке с целью изучения их территориального распространения, фенотипических и молекулярно-генетических характеристик. Планирование и

проведение исследований, направленных на решение поставленных задач, базировались на использовании классических (бактериологический, серологический), молекулярно-генетических (ПЦР, VNTR, PFGE) и масс-спектрометрического (MALDI-ToF MS) методов.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Применение комплексного подхода, основанного на мультиплексной ПЦР и бактериологическом исследовании с MALDI-ToF масс-спектрометрическим анализом подозрительных колоний на этапе их отбора, позволило увеличить выявляемость энтеропатогенных иерсиний из различных объектов.

2. Фенотипически гомогенная популяция *Y. pseudotuberculosis* характеризуется генетическим полиморфизмом по плазмидным и хромосомным факторам патогенности. Для патогенных *Y. enterocolitica* 2–4 биотипов показано наличие плазмиды pYV и хромосомных генов вирулентности *ail* и *ystA*; *Y. enterocolitica* 1А биотипа, изолированные от больных людей, содержат ген термостабильного токсина *ystB*.

3. Основные принципы и алгоритм организации лабораторных исследований на энтеропатогенные иерсинии в лабораториях территориального, регионального и федерального уровней обеспечивают унифицированный подход к системе диагностических и мониторинговых исследований.

**Степень достоверности результатов исследования и апробация работы.** Для решения поставленных задач использованы высокотехнологичные методы исследования, основанные на анализе генных детерминант патогенности *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*. Заключение и выводы базируются на полученных результатах, достоверность которых обоснована значительным объемом выполненных исследований лабораториями, подтвердившими свою компетентность в национальной и международной системах аккредитации.

Изложенные в работе материалы представлены на IV Научной конференции с международным участием «Идеи Пастера в борьбе с инфекциями» (Санкт-Петербург, 2008); Международной конференции «Развитие научных исследований и надзор за инфекционными заболеваниями» (Санкт-Петербург, 2010); 10<sup>th</sup>, 12<sup>th</sup> International Symposium Yersinia (Brazil, 2010; Tbilisi, 2016); XII Межгосударственной научно-практической конференции «Вклад государств – участников Содружества Независимых Государств в обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения в современных условиях» (Саратов, 2014); научно-практической конференции «Диагностика и профилактика инфекционных болезней на современном этапе» (Новосибирск, 2016); II Национальном конгрессе бактериологов (Санкт-Петербург, 2016); научных конференциях ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора» (2010–2017 гг.).

**Публикации.** Полученные результаты исследования представлены в 18 научных работах, из них семь в журналах, рекомендованных ВАК для публикации результатов на соискание ученой степени кандидата наук, четыре – в зарубежной печати.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, трех глав соб-

ственных исследований, заключения, выводов и списка использованной литературы, включающего 245 источников, в том числе 66 отечественных и 179 зарубежных авторов. Работа изложена на 163 страницах, иллюстрирована 30 рисунками и 27 таблицами.

**Место выполнения работы и личный вклад автора.** Работа выполнялась в заочной аспирантуре в рамках двух плановых научных тем: «Молекулярная эпидемиология иерсиниозов в Сибири и на Дальнем Востоке» (2006–2009 гг.) № ГР 0120.0511202, «Совершенствование эпидемиологического мониторинга псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза на основе оптимизации молекулярно-генетических методов исследования» (2010–2014 гг.) № ГР 01201051521. Автор участвовала в обсуждении актуальности и цели исследования, планировании наиболее эффективных путей для решения поставленных задач, анализе литературы, выполнении бактериологических, серологических, молекулярно-генетических (ПЦР) методов, выборке штаммов для изучения и их расширенной идентификации, сборе информационного материала, его систематизации, статистической обработке полученных данных и обосновании научных и практических рекомендаций. Штаммы, использованные в работе, выделены от людей, мелких млекопитающих, диких мигрирующих и домашних птиц на вспышках и при проведении мониторинговых исследований на различных территориях Сибири и Дальнего Востока, в том числе штаммы в Новосибирской области изолированы лично автором.

VNTR-анализ и пульсэлектрофорез проведены в отделе эпидемиологии Иркутского противочумного института совместно с канд. биол. наук М. В. Афанасьевым, MALDI-ToF MS – при участии канд. мед. наук В. Т. Климова; фаготипирование *Y. enterocolitica* – в Референс-лаборатории Института Пастера (Франция, руководитель лаборатории E. Carniel).

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Материалы и методы исследования.** Информационным материалом для оценки уровня лабораторных исследований на иерсинии послужила отчетная документация центров гигиены и эпидемиологии в субъектах изучаемого региона (ф. 2 «Сведения о деятельности лабораторий санитарно-гигиенического, микробиологического и паразитарного профиля “Центр гигиены и эпидемиологии”») за 5-летний период (2010–2014 гг.).

В период с 2010 по 2015 г. на десяти территориях Сибири и Дальнего Востока на наличие энтеропатогенных иерсиний (*Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*) исследован материал от людей (1756), мелких млекопитающих (2350), диких мигрирующих птиц (55), смывов с плодоовощной продукции, объектов окружающей среды (9558) и с тушек кур розничной торговли (99). Анализ результативности ПЦР в сравнении с бактериологическим методом выполнен на одиннадцати вспышках, объем выборки составил 1233 пробы. Изучены биологические и молекулярно-генетические свойства 225 штаммов *Y. pseudotuberculosis* и 345 штаммов *Y. enterocolitica*.



Выделение, идентификацию и дифференциацию иерсиний осуществляли общепринятыми методами в соответствии с МУ 3.1.1.2438-09 «Эпидемиологический надзор и профилактика псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза». Для ускоренной идентификации подозрительных колоний и идентификации выделенных культур проводили MALDI-ToF MS на масс-анализаторе Microflex LT (Bruker Daltonics, Германия) по стандартной методике, прилагаемой к прибору, анализ спектров осуществляли с применением системы MALDI Biotyper (Bruker Daltonics).

Серотипирование *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* проводили в реакции агглютинации на стекле набором коммерческих моновалентных сывороток (производство НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, г. Санкт-Петербург). Часть штаммов *Y. enterocolitica* (48) фаготипированы по методу Грация типовым международным набором фагов (производство Референс-лаборатории Института Пастера, Франция).

Подготовка материала для молекулярно-генетических исследований проводилась в соответствии с МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности». Применяли следующие тест-системы: 1) «АмплиСенс *Yersinia pseudotuberculosis-Eph*» и «АмплиСенс *Yersinia enterocolitica-Eph*» (производство ООО «ИнтерЛабСервис», г. Москва) электрофоретический вариант. ПЦР проводили на программированном амплификаторе «Терцик» (производство ЗАО «НПФ ДНК-Технология», Россия) с последующей электрофоретической детекцией продукта амплификации в 1 % агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием; 2) «АмплиСенс *Yersinia enterocolitica/Yersinia pseudotuberculosis-FL*» (производство ЦНИИЭ, г. Москва) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (FRT) на амплификаторе «Rotor-Gene» 6000 (CorbettResearch, Австралия). Исследования осуществляли согласно инструкциям к тест-системам. При наличии положительной ПЦР и отрицательного бактериологического высева исследуемой пробы проводили второй (на 2–3-е сутки холодного обогащения), а в некоторых случаях третий высев (на 5–7-е сутки холодного обогащения). В случае двукратного ПЦР-отрицательного анализа дальнейшее бактериологическое исследование материала прекращали (Шурыгина И. А., 2003).

ПЦР-скрининг плазмидных и хромосомных факторов патогенности культур *Y. pseudotuberculosis* проводили по набору следующих детерминант: ген *yers*, локализованный на родоспецифической плазмиде вирулентности pYV 42-47 MDa; ген *dot O*, локализованный на плазмиде pVM 82 MDa; ген *ypmA/C* токсина суперантигена YPM; ген *irp2* острова высокой патогенности HPI; ген *pil PQ* острова патогенности YAPI, детерминирующий пили адгезии IV типа, необходимые для колонизации слизистой тонкого кишечника макроорганизма и ген инвазивности *inv*, кодирующий белок инвазин (103 KDa), который служит первичным фактором, иницирующим прямое проникновение бактерий через M-клетки. Все культуры *Y. enterocolitica* изучены на наличие: гена *ail*, экспрессирующего белок (17 KDa) с функцией адгезии-инвазии и резистентность к бактерицидному действию сыворотки хозяина; генов *ystA* и *ystB*, детерминирую-

щих термостабильные энтеротоксины, вызывающие диарейный симптом при инфицировании человека. Для определения указанных генов использовали праймеры, предложенные авторами (Кокорина Г. И., 2012; Skurnik M., 1989; Nakajima H. et al., 1992; Fukushima H. et al., 2001; Wannet W. et al., 2001; Thoenner P. et al., 2003; Collyn F., 2005), которые были синтезированы в ЗАО «Синтол» (г. Москва). Амплификацию проводили в программируемом термостате «Терцик» МС-2 производства ЗАО «НПФ ДНК-Технология». Регистрацию продуктов амплификации ДНК проводили с помощью гель-видеосистемы с программным обеспечением «Gel Imager 3,0» («ДНК-Технология», Москва).

Для серотипирования были отобраны праймеры Ypf и Ypr, гибридирующие фрагменты генов *wbyL*, *wbyH*, *gmd-fcl*, *ddhC-prt*, *man B*, *ddhA-B*, праймеры Abe1 и Abe2, гибридирующие фрагмент гена *abe* сероваров *Y. pseudotuberculosis* (Wannet W. al., 2001). Структура праймеров, размеры амплифицируемых фрагментов представлены в работе Т. М. Bogdanovich et al. (2003), алгоритм серотипирования описан В. Т. Климовым и др. (2007).

Спектр плазмид определяли методом гель-электрофореза (Kieser T., 1984). VNTR-анализ 25 штаммов *Y. pseudotuberculosis* выполняли по методу, предложенному Le Fleche et al. (2001). Анализ данных и построение филогенетического древа осуществляли с помощью программного комплекса Bio Numerics v 6.01 (Applies Maths, Бельгия). Методика исследования 8 штаммов *Y. pseudotuberculosis* с использованием PFGE-анализа основывалась на стандартном протоколе Центра по контролю заболеваний (США), разработанном для анализа *Y. pestis* (Lucier T., 1992), и выполнялась в соответствии с методическими рекомендациями (Афанасьев М. В. и др., 2015). Статистическая обработка данных производилась с помощью пакета программ MS Excel, SPSS (версия 13.0) в соответствии с правилами медицинской статистики (Зайцев В. М., 2003; Савилов Е. Д., 2004).

**Совершенствование микробиологического мониторинга *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* на основе применения молекулярно-генетических методов исследования.** За период наблюдения с 2010 по 2014 г. учреждениями Роспотребнадзора Сибири и Дальнего Востока на энтеропатогенные иерсинии (*Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*) ежегодно выполняется в среднем более 70 тыс. исследований бактериологическим, серологическим и молекулярно-генетическим (ПЦР) методами. Преобладающий объем (более 75 %) приходится на восемь территорий региона: Алтайский и Приморский края, Республику Саха (Якутия) и Республику Бурятия, Иркутскую, Тюменскую и Новосибирскую области, Ханты-Мансийский АО. На остальных 15 территориях региона проводится не более 4000 исследований в год. В структуре исследований преобладают смывы с объектов окружающей среды и готовые блюда из сырых овощей (овощные салаты) – 76,6 %, материал от людей и мелких млекопитающих составляет 12,6 % и 7,4 % соответственно. Продукты животного происхождения занимают невысокий удельный вес (2,8 %), на прочие объекты (почва, вода, членистоногие) приходится 0,6 %.

Установлено, что среднемноголетний показатель высеваемости *Y. pseudotuberculosis* от людей и объектов окружающей среды составляет  $1,4 \pm 0,03$  % и  $0,03 \pm 0,003$  %, *Y. enterocolitica* –  $0,9 \pm 0,1$  % и  $0,6 \pm 0,1$  % соответственно. Нами предложена унифицированная схема лабораторного исследования с применением классической ПЦР. Учитывая результаты ПЦР как сигнального теста, целенаправленно проводится дальнейшее бактериологическое исследование материала на наличие *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*, что позволяет сократить сроки обнаружения возбудителя до 5–8 дней. Однако ПЦР занимает в структуре микробиологических исследований центров гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора Сибири и Дальнего Востока не более 2,1 % (около 4 тыс. исследований ежегодно). Несмотря на ограниченность применения ПЦР, показана ее результативность, превышающая бактериологический метод. Так, специфические фрагменты ДНК *Y. pseudotuberculosis* обнаруживались в биоматериале от людей в  $4,7 \pm 0,6$  % ( $t = 5,4$ ,  $p < 0,05$ ), от грызунов в  $0,3 \pm 0,1$  % ( $t = 0,2$ ,  $p > 0,05$ ), из смывов с объектов окружающей среды и овощной продукции  $0,8 \pm 0,1$  % ( $t = 5,6$ ,  $p < 0,05$ ). Более высокий процент положительных результатов отмечался и при выявлении ДНК *Y. enterocolitica* в указанных объектах в  $1,5 \pm 0,2$  % ( $t = 5,0$ ,  $p < 0,01$ ),  $15,3 \pm 0,6$  % ( $t = 20,1$ ,  $p < 0,01$ ) и  $25,5 \pm 0,7$  % ( $t = 35,0$ ,  $p < 0,01$ ) соответственно.

Дальнейшее совершенствование этого подхода связано с выявлением в пробе одновременно двух возбудителей (*Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*) и определение детерминант патогенности *Y. enterocolitica*. Это может быть реализовано через применение комплекса методов лабораторного исследования к одному образцу, а именно использование мультиплексной ПЦР и бактериологического анализа с ускоренной идентификацией подозрительных на энтеропатогенные иерсинии колоний методом MALDI-ToF масс-спектрометрии (рис. 1). Для детекции *Y. pseudotuberculosis* использовали праймеры на ген инвазивности *inv*, для обнаружения ДНК *Y. enterocolitica* – мультиплексную ПЦР с двумя парами праймеров на гены *16S rRNA* и *ail* (Wannet W. et al., 2001). Праймеры на *16S rRNA* позволяли определять видовую принадлежность к *Y. enterocolitica*, а праймеры на фрагмент *ail* гена обнаруживали ДНК патогенных *Y. enterocolitica*. В выделенных культурах кишечных иерсиний определяли ген термостабильного токсина *ystA*, характерный для биотипов 1В, 2–4, и ген *ystB*, выявляемый у 1А биотипа. Предложенный алгоритм позволял обнаруживать в исследуемой пробе, уже на этапе выявления специфической ДНК, детерминанты патогенности иерсиний, определять О-серогенотип *Y. pseudotuberculosis* и биотипы патогенных *Y. enterocolitica*.

Эффективность подобного подхода изучена при проведении мониторинговых исследований на десяти территориях Сибири и Дальнего Востока (2010–2015 гг.). В результате проведенных исследований выделено 305 культур иерсиний (2,2 % от числа исследованных проб): 92 *Y. pseudotuberculosis*, 197 *Y. enterocolitica*, из них 16 патогенных 2–4 биотипов (7,6 %), 12 культур *Y. kristensenii*, 2 культуры *Y. frederiksenii* и 2 – *Y. intermedia*. Получено 362 положительных результата в ПЦР (12,6 %): 75 (2,6 %) *Y. pseudotuberculosis* и 287 – *Y. enterocolitica* (10,0 %).

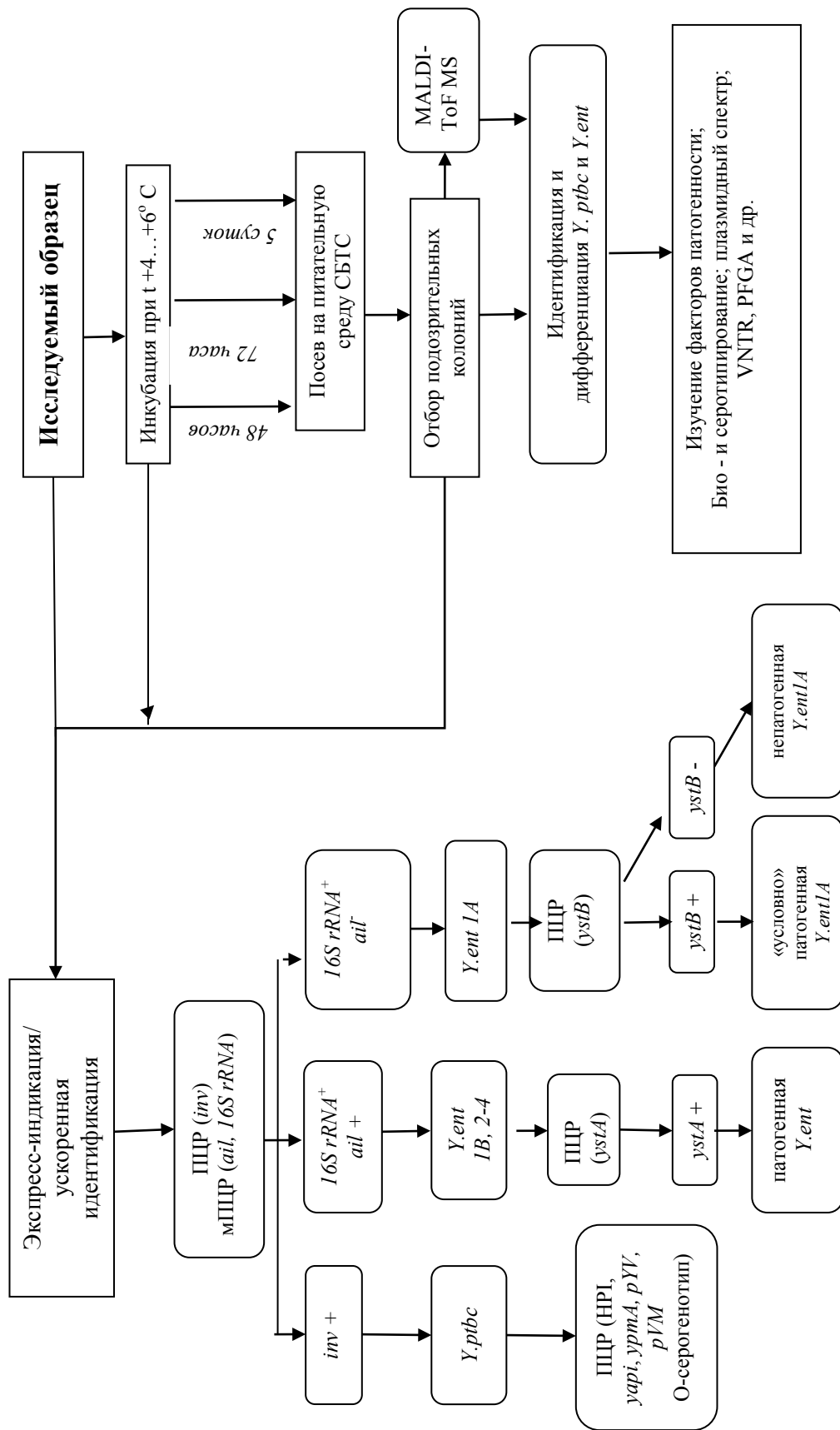


Рисунок 1 – Оптимизированная схема лабораторных исследований на энтеропатогенные иерсинии

От людей изолированы 82 штамма *Y. pseudotuberculosis* O:1b (Иркутская, Новосибирская области) и один штамм *Y. pseudotuberculosis* O:1a (Иркутская область). От мелких млекопитающих выделены четыре культуры *Y. pseudotuberculosis* O:3 в Иркутской области и по одному штамму O:4 (Забайкальский край) и O:1b (Новосибирская область). По одной культуре *Y. pseudotuberculosis* O:1b получено со смывов с картофеля (0,03 %) и репчатого лука (0,5 %) в Новосибирской области.

Патогенные *Y. enterocolitica* выделены от мелких млекопитающих в Иркутской (пять штаммов 3/O:3 и один 2/O:9), Новосибирской (два штамма 3/O:3 и три 4/O:3) областях, Республике Тыва (по одному штамму 4/O:3 и 2/O:9) и Ханты-Мансийском АО (один штамм 2/O:9).

Мультиплексной ПЦР в 59 смывах с тушек кур розничной торговли (59,6 %) выявлены специфические фрагменты ДНК *Y. enterocolitica*, в том числе в 58 пробах с праймерами на фрагмент гена *16S rRNA* и в одной – *16S rRNA* и *ail*. При последующем бактериологическом исследовании изолированы 11 культур *Y. enterocolitica* 1А и одна патогенная культура *Y. enterocolitica* 2/O9. Факт выделения патогенной иерсинии с тушек птиц установлен впервые в РФ.

От диких мигрирующих птиц в Новосибирской области изолировано по одному штамму *Y. pseudotuberculosis* O:1b и патогенная *Y. enterocolitica*, а также обнаружена специфическая ДНК, характеризующаяся наличием детерминант патогенности *ail*, *ystA* и *yadA* (23,9 %), что подтверждает роль птиц как природного резервуара патогенных иерсиний.

Результаты комплексного применения ПЦР и бактериологического метода на вспышках достоверно подтверждают значимость капусты, репчатого лука и моркови как основных факторов передачи псевдотуберкулеза, а мелких млекопитающих как резервуара *Y. pseudotuberculosis*. Инфицированность овощей и мелких млекопитающих методом ПЦР установлена в 9,2 % и 4,0 %, бактериологическим методом – в 0,4 % и 1,7 % соответственно (табл. 1).

Таблица 1

Результаты исследования больных, грызунов и объектов окружающей среды при расследовании вспышек

Объект исследования	Результаты исследования					
	Бактериологический метод			ПЦР		
	число исслед.	положит.	%	число исслед.	положит.	%
Больные	326	46	14,1±1,9	152	60	39,5±4,0
Мелкие млекопитающие	174	3	1,72±0,99	99	4	4,0±2,0
Смывы с овощей	733	3	0,41±0,24	228	21	9,2±1,9

Штаммы *Y. pseudotuberculosis*, изолированные во время вспышек в Новосибирской (2011 г.), Тюменской (2012 г.) и Иркутской (2012 г.) областях, типированы VNTR-методом и в PFGE (Новосибирская область, 2011 г.). В VNTR они формировали характерные кластеры для каждого «события» (рис. 2).



Рисунок 2 – Дендрограмма, характеризующая степень родства штаммов *Y. pseudotuberculosis* 93 и *Y. pseudotuberculosis* 101, изолированных от больных во время вспышки в г. Тюмени в 2012 г.

В PFGE установлены сходные электрофоретические паттерны штаммов, изолированные от больных и вероятного фактора передачи, что достоверно подтверждает причинно-следственную связь.

**Фенотипические и молекулярно-генетические свойства *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*, изолированные в Сибири и на Дальнем Востоке.** По источникам выделения исследуемые штаммы распределены следующим образом: от человека 196 (87,1 %), от грызунов 19 и с объектов окружающей среды 10 штаммов. Фенотипически *Y. pseudotuberculosis* не имели каких-либо отличий по биохимическим признакам и характеризовались однотипными свойствами. Идентификация музейных и свежевыделенных штаммов MALDI-ToF MS позволила установить 100 % их принадлежность к *Y. pseudotuberculosis*. По результатам анализа отмечены десять плазмидных вариантов с молекулярной массой 82:47; 47; 82:47:17; 110:82:47:17; 82:47:17:2,7; 82:47:2,7; 82:47:4,4; 82:47:3,3:2,7; 82:47:5,5 и 47:5,5 MDa.

Проведение O-серотипирования штаммов показало, что в Сибирском регионе циркулируют четыре O-серотипа *Y. pseudotuberculosis*: O:1a, O:1b, O:3 и O:4a с доминированием O:1b серотипа (94,6 %), который всегда обнаруживается при вспышечной заболеваемости. Удельный вес *Y. pseudotuberculosis* O:3 составил 4,0 %, два штамма *Y. pseudotuberculosis* O:1a и один *Y. pseudotuberculosis* O:4a обнаружены соответственно в Иркутской области и Забайкальском крае.

На Дальнем Востоке выявлено шесть O-серотипов псевдотуберкулезного микроба: O:1a, O:1b, O:1c, O:3, O:4a и O:4b, частота распределения которых составляла 56,5 % для O:1b, 17,4 % – O:1a, по 8,7 % – O:3 и O:4b. По одному штамму отнесены к *Y. pseudotuberculosis* O:1c (Приморский край) и *Y. pseudotuberculosis* O:4a (Сахалинская область). Отмечено, что среди грызунов Дальневосточного региона циркулировали *Y. pseudotuberculosis* O:1c (один штамм в Приморском крае) и *Y. pseudotuberculosis* O:4b (по одному штамму в Приморском и Хабаровском краях) серотипы, которые не выявлялись от больных и объектов окружающей среды, а серотип O:4a, выделенный от человека в Сахалинской области, не был обнаружен среди грызунов.

Хромосомный ген *inv* в ПЦР обнаруживался у всех исследуемых штаммов *Y. pseudotuberculosis*, плазмидный ген *yers* – у всех свежeweыделенных штаммов. В 96,2 % случаев обнаружен ген суперантигена *урmA* при отсутствии генов *урт В/С*. В 7,1 % выявлен «остров высокой патогенности» НРГ, содержащий гены *ирp2* (*Y. pseudotuberculosis* O:1b и *Y. pseudotuberculosis* O:3), 71,8 % штаммов характеризовались наличием гена *pil PQ* острова патогенности YAPI.

Все штаммы *Y. pseudotuberculosis* по наличию генов плазмиды вирулентности, суперантигена и острова высокой патогенности НРГ разделены нами на четыре геногруппы (табл. 2). Доминирующей (90,7 %) в Сибири и на Дальнем Востоке является первая генетическая группа ( $pYV^+$ ,  $урmA^+$ , НРГ), в которую включено преобладающее число *Y. pseudotuberculosis*, изолированных от больных (97,5 %), все штаммы, выделенные из смывов с объектов окружающей среды, и 15,8 % штаммов от мелких млекопитающих. Первая геногруппа разделена на две подгруппы, характеризующиеся штаммами, содержащими одну плазмиду вирулентности  $pYV$  47 MDa (31,4 %) и штаммы с двумя плазмидами  $pYV$  47 MDa и  $pVM$  82 MDa (68,6 %). На плазмиде  $pVM$  82 MDa расположен генный комплекс, детерминирующий IV тип секреторной системы, аналогичный для *Legionella pneumophila* и *Coxiella burnetti* (Eppinger M. et al., 2007). Система ответственна за внутриклеточное паразитирование, что вызывает более тяжелое течение инфекции с преобладанием генерализованных форм, получивших название дальневосточная скарлатиноподобная лихорадка (ДСЛ) (Шурыгина И. А. и др., 2003). Одноплазмидные штаммы ( $pYV$  47 MDa) *Y. pseudotuberculosis* также вызывают эпидемические осложнения, но заболевание проявляется «минорной», более легкой, формой псевдотуберкулеза.

Таблица 2

Геногруппы *Y. pseudotuberculosis*, изолированных из различных источников, на территории Сибири и Дальнего Востока

Источник и регион выделения		Число штаммов	Геногруппы			
			I	II	III	IV
			$pYV^+$ $урmA^+$ НРГ абс. (%)	$pYV^+$ $урmA^-$ НРГ <sup>+</sup> абс. (%)	$pYV^+$ $урmA^+$ НРГ <sup>+</sup> абс. (%)	$pYV^+$ $урmA^-$ НРГ абс. (%)
Больные		196	191 (97,5)	1 (0,5)	2 (1,0)	2 (1,0)
Смывы		10	10 (100,0)	0	0	0
Мелкие млекопитающие		19	3 (15,8)	5 (26,3)	8 (42,1)	3 (15,8)
<b>Итого</b>		<b>225</b>	<b>204</b> <b>(90,7±1,9)</b>	<b>6</b> <b>(2,7±1,1)</b>	<b>10</b> <b>(4,9±1,4)</b>	<b>5</b> <b>(2,2±1,0)</b>
В т.ч.	Сибирь	202	190 (94,1)	2 (1,0)	8 (4,0)	1 (0,4)
	Дальний Восток	23	14 (60,9)	4 (17,4)	2 (8,7)	4 (17,4)
О-серогенотип			O:1 b	O:1 a	O:3	O:1c ,O:4a, O:4b

Вторая геногруппа ( $pYV^+$ ,  $урmA^-$ , НРГ<sup>+</sup>) представлена сероваром *Y. pseudotuberculosis* O:1a, который впервые в России был выделен от больного в Иркутской области в 2013 г. и вызывал генерализованную форму псевдоту-

беркулеза. Ранее этот серовар изолирован только от мелких млекопитающих в Иркутской области (1995 г.), Хабаровском (1987, 1997 гг.) и Приморском (1988, 1997 гг.) краях. В третью ( $pYV^+$ ,  $ypmA^+$ ,  $HPI^+$ ) и четвертую ( $pYV^+$ ,  $ypmA^-$ ,  $HPI^-$ ) геногруппы входят редко встречающиеся штаммы *Y. pseudotuberculosis*, выделенные от больных и грызунов.

Изучено 345 штаммов *Y. enterocolitica* биотипов 1А и 2–4, изолированных в Сибири и на Дальнем Востоке. Штаммы *Y. enterocolitica* биотипа 1А получены не только из объектов окружающей среды (217 шт., 72,2 %), но также от мелких млекопитающих и птиц (49 шт., 16,4 %) и больных людей (34 шт., 11,4 %). Штаммы *Y. enterocolitica* 2–4 биотипов выделены от больных (11 шт., 23,9 %), мелких млекопитающих и птиц (34 шт., 76,1 %). По результатам серотипирования *Y. enterocolitica* биотипа 1А (86,7±1,8 %) определено 10 сероваров: О:4,32; О:4,44; О:5; О:6,30; О:6,31; О:7,8; О:12,26; О:13,7; О:19,8; О:41,43. Установлено, что ни один из штамма *Y. enterocolitica* 1А не имел детерминант адгезии-инвазии (*ail* и *ustA* генов). Единственным геном, детерминирующим патогенные свойства, которым обладали 245 штаммов (81,9 %), являлся ген токсинообразования *ystB*. Двенадцать штаммов *Y. enterocolitica* 1А, выделенных от больных в Новосибирской области и Республике Алтай, содержали ген токсинообразования *ystB*. Клинически заболевания сопровождалось симптомами энтерита и энтероколита, что позволяет сделать предположение о потенциальной роли *Y. enterocolitica* 1А в качестве этиологического агента кишечного иерсиниоза. Известно, что этот патоген продуцирует термостабильный энтеротоксин YSTb, который структурно и функционально гомологичен термостабильному токсину энтеротоксигенных *Escherichia coli* (Ramamurthy T. et al., 1997).

Штаммы *Y. enterocolitica* 2–4 биотипов (13,3±1,8 %) от людей и мелких млекопитающих относились к биотипам/сероварам 3/О:3 (47,8±7,4 %), в 23,9±6,3 % – 4/О:3 и 28,3±6,6 % – 2/О:9. Для патогенных *Y. enterocolitica* 2–4 биотипов установлено наличие плазмиды  $pYV$  и хромосомных генов вирулентности *ail*, *ystA*, штаммы отнесены к фаготипам  $X_3$  (2/О:9) и VIII (4/О:3), а также к уникальному только для России фаготипу  $X_z$  (3/О:3 и 2/О:9).

Для штаммов *Y. enterocolitica*, имеющих нечеткие фенотипические характеристики, были проведены MALDI-ToF MS и ПЦР с праймерами к фрагменту гена *16S rRNA*. Так, например, для штамма 178 был определен фенотип, который характерен для *Y. bercovieri*: сахароза (+), рамноза (-), раффиноза (-), мальтоза (+), сорбоза (-), фукоза (+). Однако проведение ПЦР с праймерами, комплементарными последовательности оперона *16S rRNA*, позволило отнести штамм к виду *Y. enterocolitica*. Принадлежность этого штамма к *Y. enterocolitica* была подтверждена и методом MALDI-ToF MS с достоверной идентификацией до вида с высокой степенью вероятности (Score Value >2,3). Масс-спектрометрический анализ и применение дифференцирующих тестов фукозы и сорбозы позволили нам идентифицировать два новых для РФ вида: *Y. mollaretii* 1472 и *Y. bercovieri* 1639, которые ранее были отнесены к *Y. enterocolitica*.

**Алгоритм трехуровневой системы мониторинга на энтеропатогенные иерсинии.** В Российской Федерации создана Единая национальная система индикации и идентификации возбудителей инфекционных болезней, предусмат-



ривающая трехуровневую структуру лабораторной диагностики инфекционных болезней на территориальном, региональном и федеральном уровнях. Концепция такого системного подхода регламентирована приказом Федеральной службы № 88 от 17.03.2008 «О мерах по совершенствованию мониторинга за возбудителями паразитарных и инфекционных болезней», в котором определены основные функции и задачи диагностических лабораторий практических и научных учреждений Роспотребнадзора (Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство, 2014).

Совершенствование лабораторной диагностики иерсиниозов связано с организацией и проведением диагностических и мониторинговых исследований с учетом ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025-2009 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий», предусматривающего постоянное поддержание системы управления качеством исследований, внедрением современных технологий, разграничением объемом и номенклатуры лабораторных исследований в лабораториях различного уровня.

Лабораторные исследования на энтеропатогенные иерсинии проводят:

- на территориальном уровне ИЛЦ ЛО, ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъекте Российской Федерации;

- на региональном уровне ИЛЦ региональных центров по мониторингу за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней II–IV групп патогенности территорий прикреплённых субъектов Российской Федерации (при необходимости);

- на федеральном уровне ИЛЦ Референс-центра по мониторингу за иерсиниозами Санкт-Петербургского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Референс-центра по мониторингу возбудителей природно-очаговых инфекций бактериальной и вирусной этиологии (Иркутский научно-исследовательский противочумный институт).

В основе алгоритма диагностических и мониторинговых исследований лежат следующие принципы: применение комплексного исследования на два патогена (*Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*); использование экспресс-индикации и ускоренной идентификации возбудителей в исследуемом материале; четкое разграничение объемов и номенклатуры исследований; применение высокотехнологичных методов исследования для расширенной идентификации патогена; рациональное оснащение лабораторий диагностическими препаратами, питательными средами и оборудованием; практическое, методическое и информационное взаимодействие с лабораториями разных уровней.

Алгоритм предусматривает ряд последовательных действий, направленных на индикацию, идентификацию, родовую и видовую дифференциацию энтеропатогенных иерсиний в биологическом материале и в объектах окружающей среды с использованием бактериологического, молекулярно-генетического и серологического методов. Он включает следующие этапы: 1) забор материала для исследования; 2) высеив на среды обогащения с одновременным выполнением экспресс-индикации (ПЦР, МФА); 3) высеив со сред обогащения на дифференциально-диагностические среды (с предварительной щелочной обработкой) и одновременное выполнение ускоренных методов идентификации (ПЦР);

4) отсев подозрительных колоний для последующей идентификации и дифференциации выделенных культур, в том числе с применением MALDI-ToF MS, с использованием автоматизированных или полуавтоматизированных систем идентификации (Vitec, Api-20E и др.), молекулярно-генетических методов исследования (ПЦР); 5) серологическое исследование крови больных и переболевших для выявления антител (ИФА, РНГА, РА).

С учетом предложенного алгоритма и поставленных задач определяется материально-техническое оснащение лабораторий каждого уровня современным оборудованием, питательными средами, диагностическими препаратами и тест-системами. Разграничиваются объем и номенклатура исследований, внедряются современные подходы, основанные на ПЦР-скрининге, ускоренной идентификации подозрительных колоний (или выделенных культур) масс-спектрометрическим методом, используются автоматизированные или полуавтоматизированные системы идентификации.

*В лабораториях ЛО* проводятся диагностические исследования клинического материала в следующем объеме:

- посев на среды накопления, «холодовое обогащение» с периодическими высевами на дифференциально-диагностические среды, отсев характерных по морфологическим свойствам колоний иерсиний на полиуглеводные среды;

- идентификация и дифференциация выделенных культур до вида по морфологическим, биохимическим и антигенным свойствам, в том числе, с использованием полу- или автоматизированных систем идентификации при наличии оборудования и тест-систем;

- выявление антител в парных сыворотках (РА, РНГА, ИФА);

- экспрессные и ускоренные методы исследования (ПЦР, MALDI-ToF MS) – при наличии оборудования.

*Лаборатории ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии»* проводят исследования материала из объектов окружающей среды и по эпидпоказаниям от больных людей в следующем объеме:

- посев на среды накопления, «холодовое обогащение» с периодическими высевами на дифференциально-диагностические среды, отсев характерных для иерсиний колоний на полиуглеводные среды с одновременным выполнением экспрессных методов диагностики на энтеропатогенные иерсинии (MALDI-ToF MS, ПЦР, Real-time ПЦР);

- идентификацию и дифференциацию выделенных культур до вида по морфологическим, биохимическим и антигенным свойствам, в том числе, с использованием полу- или автоматизированных систем идентификации при наличии оборудования и тест-систем;

- выявление антител в парных сыворотках (РА, РНГА, ИФА).

*Лаборатории Региональных центров* по мониторингу возбудителей инфекционных и паразитарных болезней II-IV групп патогенности проводят исследования в следующем объеме:

- идентификацию культур (определение биотипа, серовара возбудителя, определение вирулентности культуры по фенотипическим признакам);

- индикацию и идентификацию культур иерсиний при использовании ПЦР, Real-time ПЦР;

– посев на среды накопления с одновременным выполнением экспрессных методов диагностики (MALDI-ToF MS, ПЦР, Real-time ПЦР);

– высев со сред накопления на дифференциально-диагностические среды, отсев подозрительных колоний для последующей родовой и видовой дифференциации;

– идентификацию возбудителя масс-спектрометрическим методом или с использованием полу- или автоматизированных систем идентификации при наличии оборудования и тест-систем.

*Лаборатории Референс-центра* проводят:

– расширенную идентификацию и изучение биологических, биохимических, молекулярно-генетических характеристик иерсиний, в том числе патогенных свойств;

– генотипирование иерсиний современными методами (изучение плазмидного спектра, O-серогенотипирование, VNTR, PFGE, полногеномное секвенирование ДНК);

– диагностические исследования клинического материала, проб из объектов окружающей среды и проб полевого материала.

Общая схема алгоритма исследования в лабораториях разного уровня представлена на рис. 3. Разработанный нами алгоритм мониторинговых исследований нашел отражение в методических указаниях МУК 4.2.3019-12 «Организация и проведение лабораторных исследований на иерсиниозы на территориальном, региональном и федеральном уровнях».

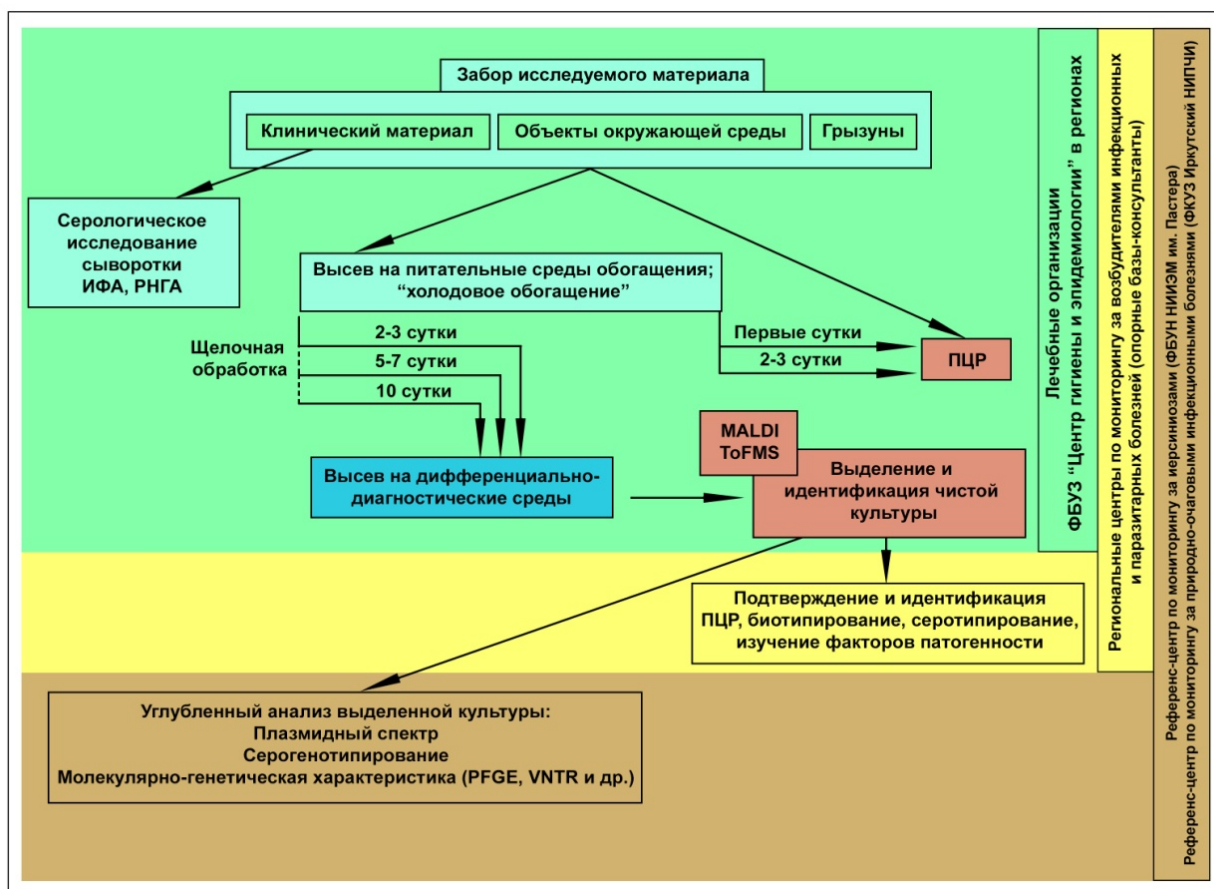


Рисунок 3 – Алгоритм лабораторных исследований на энтеропатогенные иерсинии

Таким образом, определены основные принципы организации лабораторных исследований на энтеропатогенные иерсинии в соответствии с трехуровневой Единой национальной системой индикации и идентификации возбудителей инфекционных болезней. С учетом требований менеджмента качества в деятельности лабораторий предусмотрены дифференцированный подход к объему и номенклатуре исследований, использование ПЦР-скрининга и ускоренной идентификации методом MALDI-ToF MS, углубленный анализ выделенных культур по факторам патогенности и их молекулярно-генетическое типирование. Разработанный порядок организации и проведения лабораторных исследований позволяет усовершенствовать микробиологический мониторинг энтеропатогенных иерсиний, что приводит к минимизации влияния человеческого фактора и, в конечном итоге, улучшению качества исследований и достоверности результатов.

## ВЫВОДЫ

1. Низкая результативность бактериологического метода и недостаточное применение ПЦР в практических лабораториях Роспотребнадзора Сибири и Дальнего Востока влияют на реальную оценку состояния мониторинга и эффективность лабораторной диагностики энтеропатогенных иерсиний.

2. Предложенная схема оптимизации лабораторных исследований на *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*, включающая использование мультиплексной ПЦР и бактериологического исследования с MALDI-ToF масс-спектрометрической идентификацией, увеличивает частоту и спектр выделения энтеропатогенных иерсиний и позволяет провести ПЦР-типирование по основным генным детерминантам возбудителя уже на этапе экспресс-индикации нативного материала.

3. Впервые из смыва с тушек кур розничной торговли изолирована патогенная *Y. enterocolitica* 2/O:9, что свидетельствует о значении этого пищевого продукта в качестве фактора передачи возбудителя. Выделение от диких мигрирующих птиц *Y. pseudotuberculosis* O:1b и патогенной *Y. enterocolitica* O:3, а также обнаружение специфической ДНК, характеризующейся наличием детерминант патогенности *ail*, *ystA*, *yadA* (23,9 %), указывает на роль перелетных птиц как природного резервуара патогенных иерсиний.

4. Мультилокусный VNTR-анализ и пульс-электрофорез (PFGE) штаммов *Y. pseudotuberculosis* продемонстрировал родство исследуемых штаммов для каждой эпидемической вспышки, свидетельствуя об их генотипической идентичности.

5. Фенотипически гомогенная популяция *Y. pseudotuberculosis* характеризуется генетическим полиморфизмом по плазмидным и хромосомным факторам патогенности. Установлены четыре геногруппы *Y. pseudotuberculosis*. Доминирующей в Сибирском и Дальневосточном регионах (90,7 %) является I геногруппа *Y. pseudotuberculosis*, представленная сероваром O:1b, содержащая суперантиген, не имеющая острова высокой патогенности HPI, характеризующаяся двухплазмидным (47:82 MDa) или одноплазмидным (47 MDa) вариантами.

Впервые в России от больного человека выделена *Y. pseudotuberculosis* O:1a, имеющая кластер генов НРІ при отсутствии генов суперантигена и острова патогенности YAP1.

6. Выделенные на территории Сибири и Дальнего Востока *Y. enterocolitica* 1А и 2/O:9, 3/O:3, 4/O:3 обладали типичными биохимическими свойствами. Для патогенных *Y. enterocolitica* 2–4 биотипов установлено наличие плазмиды рYV и хромосомных генов вирулентности *ail* и *ystA*, штаммы отнесены к фаготипам X<sub>3</sub> и VIII, а также к уникальному, только для России, фаготипу X<sub>z</sub>. Значимым маркером для *Y. enterocolitica* 1А служит наличие гена *yst B*, эксклюзивно характерного для этого биотипа.

7. Разработанная трехуровневая система мониторинга на энтеропатогенные иерсинии основана на принципах управления качеством в деятельности лабораторий, разграничения объемов и номенклатуры исследований, оснащения лабораторий современным оборудованием и внедрения высокотехнологичных диагностических процедур, что улучшает качество и достоверность полученных результатов и обеспечивает унифицированный подход к мониторинговым и диагностическим исследованиям.

## СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### *Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ*

1. Псевдотуберкулез в Новосибирской области и пути совершенствования эпидемиологического надзора / Л. К. Иванова, М. В. Чеснокова, В. Т. Климов, А. С. Марамович, **Т. В. Каримова**, Л. И. Козловский, О. Ю. Якунина // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2007. – Вып. 6. – С. 7–11.

2. Алгоритм лабораторной диагностики иерсиниозов / М. В. Чеснокова, В. Т. Климов, **Т. В. Каримова**, К. А. Тирских, М. В. Афанасьев // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. – 2010. – № 17. – С. 188–192.

3. Молекулярно-биологическая характеристика *Yersinia enterocolitica*, циркулирующих в различных регионах Российской Федерации / **Т. В. Каримова**, Е. А. Богумильчик, Е. А. Воскресенская, В. Т. Климов, Г. Я. Ценева, М. В. Чеснокова, Л. И. Иванов, Т. Б. Поутонен, А. В. Васильева, Т. В. Громова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2012. – № 1. – С. 16–21.

4. Современные методы лабораторных исследований при проведении эпидемиологического мониторинга за иерсиниозами в Новосибирской области. Система управления качеством / **Т. В. Каримова**, Л. Н. Фомина, В. Г. Малявин, М. В. Чеснокова, В. Т. Климов, Э. Ф. Опочинский // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2012. – № 5 (87), ч. 1. – С. 363–367.

5. Потенциальная опасность мяса птицы как фактора передачи кишечного иерсиниоза / **Т. В. Каримова**, В. Т. Климов, М. В. Чеснокова, М. Б. Черепанова // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2014. – № 4 (77). – С. 57–60.

6. **Каримова, Т. В.** Молекулярно-биологическая характеристика *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia enterocolitica*, выделенных в Сибири и на Дальнем

Востоке / Т. В. Каримова, В. Т. Климов, М. В. Чеснокова // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2016.– Т. 1, № 3 (109), ч. 1. – С. 60–64.

7. Чеснокова, М. В. Дикие птицы – природный резервуар иерсиниозов / М. В. Чеснокова, В. Т. Климов, **Т. В. Каримова** // Вестник ИрГСХА. – 2017. – № 79. – С. 102–108.

#### *Прочие публикации*

8. The *Y. pseudotuberculosis* infections in the Russian Federation / G. Ya. Tseneva, M. V. Chesnokova, O. A. Burgasova, L. V. Sayapina, **T. V. Karimova** // 10<sup>th</sup> International Symposium Brazil «Yersinia 2010», 2010. – P. 101–102.

9. Pseudotuberculosis in the Russian Federation / G. Y. Tseneva, M. V. Chesnokova, V. T. Klimov, E. A. Voskresenskaya, O. A. Burgasova, L. V. Sayapina, K. A. Tirsikh, **T. V. Karimova** // Advances in Experimental Medicine and Biology. – Springer, 2012. – Vol. 954. – P. 63–68.

10. Чеснокова, М. В. Эпидемиологическая и лабораторная диагностика вспышек псевдотуберкулеза / М. В. Чеснокова, В. Т. Климов, **Т. В. Каримова** // Сборник статей в области санитарии и карантина на приграничных территориях между Россией и Китаем: в память 20-летия сотрудничества в области санитарии и карантина между Россией и Китаем. – Харбин, Китай, 2014. – С. 501–512.

11. Identification of *Yersinia* species by MALDI ToF Mass Spectrometry / E. A. Bogumilchik, E. V. Zueva, M. V. Yarygina, **T. V. Karimova**, V. T. Klimov, M. V. Chesnokova, E. A. Voskresenskaya // 12<sup>th</sup> International Symposium *Yersinia* Symp.: Abstract book (October 25-28, Tbilisi). – Tbilisi, Georgia, 2016. – P. 34–35.

#### **Список сокращений**

ДФО – Дальневосточный федеральный округ

ЗФР – забуференный физиологический раствор

ИЛЦ – испытательный лабораторный центр

ЛО – лечебные организации

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СЗФО – Северо-Западный федеральный округ

СФО – Сибирский федеральный округ

НПИ – остров высокой патогенности (High Pathogenicity Island)

PFGE – электрофорез в пульсирующем поле (Pulsed-Field Gel Electrophoresis)

pVM82 – плаزمида *Y. pseudotuberculosis* с молекулярной массой 82 MDa

pYV – плазмида вирулентности иерсиний (Plasmid associated with Yersinia Virulence)

VNTR – переменное число tandemных повторов (Variable Number of Tandem Repeat)

YAPI – адгезивный остров патогенности иерсиний (Yersinia Adhesion Pathogenicity Island)

YPM – суперантигенный токсин *Y. pseudotuberculosis* (Yersinia Pseudotuberculosis-derived Mitogen)

MALDI-ToF MS – матрично-ассоциированная лазерная десорбция/ионизация (масс-спектрометрический анализ) (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)

*Научное издание*

**Каримова** Татьяна Викторовна

**ЭНТЕРОПАТОГЕННЫЕ ИЕРСИНИИ:  
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ, МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ  
ОСОБЕННОСТИ, АЛГОРИТМ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

---

Подписано в печать 08.06.2017. Формат 60×90 1/16  
Усл.-печ. 1,3. Тираж 120 экз. Заказ 269

---

**ИЗДАТЕЛЬСТВО ИГУ**  
664003, г. Иркутск, бульвар Гагарина, 36