

А.П. Самсонова, Ю.В. Ананьина

**ПРИМЕНЕНИЕ ПЦР-АНАЛИЗА ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ЛЕПТОСПИРОЗОВ
В РЕГИОНАХ СИБИРИ И ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА**

ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН (Москва)

Описан опыт применения ПЦР-анализа в изучении лептоспирозов в регионах Сибири и Дальнего Востока. Показано, что разработанные ПЦР-тест-системы могут использоваться для индикации лептоспир и диагностики лептоспирозов при изучении краевой патологии в этом регионе.

Ключевые слова: лептоспирозы, диагностика, ПЦР

THE USE OF PCR-ANALYSIS IN LEPTOSPIROSES RESEARCH IN SIBERIA AND FAR EAST

A.P. Samsonova, Ju.V. Anajina

SRI of Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamalei RAMS, Moscow

The experience of use of PCR-analysis in leptospiroses research in Siberia and Far East is described. It was shown, that developed PCR-test systems may be used for leptospira detection and leptospiroses diagnostics during pathology study in this region.

Key words: leptospiroses, diagnostics, PCR

В России ежегодно выявляется от 600 до 1,5 тыс. случаев заболеваний людей лептоспирозами. Лептоспирозы распространены на территории всех федеральных округов России, включая Сибирский и Дальневосточный [5]. На долю этих округов приходится всего лишь по несколько процентов от заболеваемости в целом по России. Это связано в первую очередь с недостаточным объемом проводимых диагностических исследований (несколько процентов от общего объема РМА, проводимых по России в целом).

В настоящее время лептоспирозы продолжают занимать одно из важных мест в инфекционной патологии людей и животных как в России, так и в ряде зарубежных стран, в том числе и граничащих с регионами Сибири и Дальнего Востока (Китай, Япония, Корея). В последние годы прослеживаются некоторые новые тенденции в характере эпидемического проявления, этиологической и социальной структуре заболеваемости, а также спектре основных хозяев лептоспир. Поэтому требуется разработка новых методических подходов к изучению лептоспир и лептоспирозов.

Как показывает наш опыт, эффективное изучение различных аспектов лептоспирозной инфекции в настоящее время возможно только при сочетании традиционных методов исследования [10] с новейшими молекулярно-генетическими методами. Одним из ключевых моментов при этом является разработка и использование высокочувствительных, специфичных, простых в исполнении, быстрых и воспроизводимых методов индикации лептоспир в органах и тканях людей и животных и в объектах окружающей среды. Кроме того, необходимо разработать схемы типирования и дифференциации лептоспир, позволяющие про-

водить исследование не только в чистых культурах, но и непосредственно в исследуемых материалах. Наиболее перспективным, а зачастую и практически единственным подходом во многих случаях является применение полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Лептоспиры относятся к микроорганизмам с выраженным фенотипическим и генотипическим полиморфизмом [2]. Известны случаи, когда даже единичные нуклеотидные замены в нуклеотидных последовательностях генов-мишеней у возбудителей приводят к нарушению процесса отжига праймеров и, в конечном итоге, к отрицательным результатам ПЦР. Поэтому возникает вполне законный вопрос, возможно ли использование тест-систем ПЦР, разработанных на основе генов штаммов лептоспир из одного региона России или мира, при изучении лептоспирозной инфекции в других регионах [4]? В данной статье мы описываем опыт работы лаборатории лептоспирозов ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН по применению ПЦР-анализа в диагностике лептоспирозов людей в регионах Сибири и Дальнего Востока.

В начале 90-х годов прошлого века, когда мы начали использовать ПЦР в изучении лептоспирозной инфекции, геном этих возбудителей был исследован сравнительно слабо. Поэтому в качестве олигонуклеотидных последовательностей для синтеза праймеров использовались случайно клонированные фрагменты геномов различных штаммов лептоспир с неизвестными нуклеотидными последовательностями и функциями. Нами совместно с лабораторией генной инженерии патогенных микроорганизмов (зав. академик РАМН А.А. Гинцбург) удалось на основе олигонуклеотидных последовательностей праймеров,

описанных в работах С. Gravekamp с соавт. [12], разработать две ПЦР-тест-системы, названные по обозначению праймеров в указанной работе, G и B. С помощью этих тест-систем удалось проводить индикацию лептоспир наиболее эпидемически значимых серогрупп (с помощью G-тест-системы: *Icterohaemorrhagiae*, *Javanica*, *Canicola*, *Ballum*, *Pyrogenes*, *Pomona*, *Sejroe*, *Hebdomadis*, *Tarasovi*, *Mini*, *Manhao*, с помощью B-тест-системы: *Grippotyphosa*) в гомогенатах органов экспериментально инфицированных животных (золотистые хомячки, белые мыши, телята), клиническом материале и объектах окружающей среды [6, 8, 9]. Хотя разработка тест-систем проводилась с использованием ДНК эталонных диагностических штаммов (M-20, MoskvaV), изначально выделенных на территории Европы, тем не менее, они оказались пригодными для индикации лептоспир из коллекции лаборатории лептоспирозов ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, выделенных и в других регионах земного шара. Среди них были также штаммы выделенных в Сибири и на Дальнем Востоке (Россия и Китай).

На следующем этапе работы мы исследовали возможность использования разработанных ПЦР-тест-систем для диагностики лептоспирозов людей при спорадических случаях в Центральном (Московская и Тульская области) и вспышках в Южном (Краснодарский край) федеральных округах [1, 4]. Далее мы провели испытания этих ПЦР-тест-систем во время вспышек лептоспирозов в Сибири (Курганская область, 1994 г. – лептоспироз *Grippotyphosa*) и на Дальнем Востоке (провинция Хунань, Китай, 1994 г. – лептоспироз *Icterohaemorrhagiae*) [3]. Исследования сывороток крови больных проводились параллельно методом ПЦР и традиционным методом РМА («золотой стандарт») [10]. Было показано, что на ранних стадиях заболевания (1-я неделя) метод ПЦР демонстрирует более высокую диагностическую чувствительность (в среднем 78,2 %), специфичность (94,2 %) и эффективность (88,8 %), чем РМА (диаг-

ностическая чувствительность 0 – 35,3 %). ДНК патогенных лептоспир (в данном случае серогрупп *Grippotyphosa* и *Icterohaemorrhagiae*) можно обнаружить в крови больных уже 1–3-го дня заболевания (табл. 1), в то время как в РМА специфические агглютинины в сыворотке крови – только в конце 1-й недели. В ряде случаев положительные результаты ПЦР отмечались при лептоспирозе *Icterohaemorrhagiae* и в период реконвалесценции (4–5-я неделя). Анализ полученных данных позволил установить некоторые особенности динамики выявления ДНК лептоспир в сыворотках крови больных лептоспирозами, вызванными лептоспирами различных серогрупп [3].

Следует подчеркнуть необходимость учета фазы заболевания при интерпретации данных результатов ПЦР в клинической практике. Получение отрицательных результатов ПЦР на 1-й неделе заболевания не может служить основанием для прекращения диагностического поиска. Диагностическую эффективность лабораторного анализа можно значительно повысить за счет параллельного использования серологических тестов (РМА, БАСА) [10] и ПЦР на любой стадии заболевания. ПЦР-анализ дает хорошие результаты даже при лечении больных антибиотиками, и поэтому его можно использовать для контроля эффективности лечения больных.

Эти результаты подтвердили полученные ранее данные о возможности использования этих ПЦР-тест-систем для индикации лептоспир в клинических материалах. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о возможности использования ПЦР-тест-систем G и B для диагностики лептоспирозов в регионах Сибири и Дальнего Востока.

Достигнутые в последние годы успехи в картировании и секвенировании генома лептоспир [11] позволили более целенаправленно вести исследования, используя в качестве генетических мишеней, в зависимости от целей и задач те или иные гены лептоспир, нуклеотидные последовательности и функции которых известны. В каче-

Таблица 1
Результаты лабораторного исследования сывороток крови больных лептоспирозом *Grippotyphosa* на первой неделе заболевания

День заболевания	РМА	БАСА	ПЦР
1	0/3	0/3	2/3
2	0/2	0/2	2/2
3	0/5	0/5	3/5
4	2/3	1/3	2/3
5	1/1	0/1	1/1
6	1/1	0/1	1/1
7	2/2	0/2	1/2
Всего	6/17	1/17	12/17

Примечание: в числителе – число положительных результатов, в знаменателе – общее число исследованных сывороток крови больных.

стве примера можно привести результаты исследования гена, кодирующего липопротеин наружной мембраны лептоспир LipL32. Используя опубликованную в литературе нуклеотидную последовательность этого гена [13], мы с помощью компьютерной программы подобрали и синтезировали две пары праймеров: наружную, фланкирующую фрагмент размером 677 п.н., и внутреннюю — 204 п.н. С помощью ПЦР-тест-систем с этими праймерами мы исследовали ДНК 77 штаммов — представителей рода *Leptospira*. Среди них были штаммы, выделенные на территории пяти континентов Земли (за исключением Антарктиды). Ампликоны размером 677 и 204 п.н. образовывались в результате ПЦР у представителей патогенных лептоспир (геномовиды *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. kirschneri*, *L. noguchi*, *L. weilii*), но отсутствовали у сапрофитических (геномовиды *L. santarosai*, *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. wolbachii*, неопределенных геномовидов 3 и 5, а также представителей родов *Leptonema* и *Turneria*), а у лептоспир геномовида *L. inadai* выявлялся только ампликон размером 204 п.н. [7]. Среди исследованных 63 штаммов патогенных лептоспир 6 были выделены на территории Сибири и Дальнего Востока России и приграничных стран (Китай, Япония). Это свидетельствует о возможности использования разработанных ПЦР-тест-систем для изучения и диагностики лептоспирозов в этом регионе.

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о перспективности ПЦР-анализа в изучении краевой патологии по лептоспирозам в Сибири и на Дальнем Востоке.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ананьина Ю.В. Диагностическая эффективность полимеразной цепной реакции на различных стадиях лептоспирозной инфекции / Ю.В. Ананьина, А.П. Самсонова // Клинич. лабор. диагностика. — 1999. — № 11. — С. 10.
2. Ананьина Ю.В. Межвидовое и внутривидовое разнообразие лептоспир: филогенетические, таксономические и экологические аспекты / Ю.В. Ананьина, А.П. Самсонова // Вестник РАМН. — 2000. — № 1. — С. 18–21.
3. Генодиагностика острой и персистентной лептоспирозной инфекции / Ю.В. Ананьина, А.П. Самсонова, В.В. Лебедев и др. // Журн. микробиол. — 2000. — № 4 (приложение). — С. 23–26.
4. Геномный полиморфизм патогенных лептоспир и проблемы ПЦР-диагностики лептоспирозов / А.П. Самсонова, Е.М. Петров, В.В. Лебедев и др. // Клинич. лабор. диагностика. — 2004. — № 9. — С. 30.
5. Лептоспирозы людей и животных / Под ред. В.В. Ананьина. — М.: Медицина, 1971. — 352 с.
6. Метод полимеразной цепной реакции в изучении гостальной персистенции патогенных лептоспир / А.П. Самсонова, Ю.В. Ананьина, М.Ю. Аксенов и др. // Молекул. генетика, микробиол. вирусология. — 1994. — № 1. — С. 19–23.
7. Распространенность гена, кодирующего липопротеин внешней мембраны LipL32 у лептоспир различных таксонов / А.П. Самсонова, Е.М. Петров, Ю.С. Аляпкина и др. // Журн. микробиол. — 2006. — № 4. — С. 29–32.
8. Разработка тест-системы на основе полимеразной цепной реакции для индикации лептоспир в политипичных очагах лептоспирозов / А.П. Самсонова, Лю Чжун Фу, Е.М. Петров и др. // Молекул. генетика, микробиол. вирусология. — 1994. — № 1. — 1997. — С. 15–19.
9. Разработка тест-системы для выявления *Leptospira interrogans* методом полимеразной цепной реакции / А.П. Самсонова, М.Ю. Аксенов, Ю.В. Ананьина и др. // Молекул. генетика, микробиол. вирусология. — 1994. — № 1. — С. 15–19.
10. Эпидемиология, диагностика и профилактика заболеваний людей лептоспирозами: Метод. указания МУ 3.1.1128-02. Минздрав России. — М., 2002.
11. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathology / A.L.T.O. Nascimento, A.I.Ko, E.A.L. Martins et al. // J. Bacteriol. — 2004. — Vol. 186, N 7. — P. 2164–2172.
12. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers / C. Gravekamp, H. van de Komp, M. Frozen et al. // J. Gen. Microbiol. — 1993. — Vol. 139, N 8. — P. 1691–1700.
13. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection / D.A. Haake, E. Chao, R.L. Zuerner et al. // Infect. Immun. — 2000. — Vol. 68, N 4. — P. 2276–2285.