

УДК [616.34-002+616-002.71]-079.4

## РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ИЕРСИНИОЗОВ

О.Ю. Портнягина<sup>1</sup>, О.П. Вострикова<sup>1</sup>, О.Д. Новикова<sup>1</sup>, М.П. Исаева<sup>1</sup>, А.М. Стенкова<sup>1</sup>, К.В. Гузев<sup>1</sup>, В.Г. Малашенкова<sup>2</sup>, В.А. Хоменко<sup>1</sup>, О.В. Сидорова<sup>1</sup>, Т.А. Горбач<sup>3</sup>, Т.Ф. Соловьева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН (690022 Владивосток, пр-т 100 лет Владивостоку, 159),

<sup>2</sup>Владивостокский государственный медицинский университет (690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 2),

<sup>3</sup>Медобъединение ДВО РАН (690022 Владивосток, ул. Кирова, 95).

**Ключевые слова:** иерсиниозы, диагностика, порины наружной мембраны.

Для верификации острых кишечных и вторично-очаговых форм иерсиниозов разработана серия диагностических тест-систем. В качестве антигенов для иммуноферментного анализа использованы видоспецифические белки возбудителей псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза (*Yersinia pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*) – порины наружной мембраны иерсиний, для полимеразной цепной реакции – фрагменты нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих эти белки.

Уровень заболеваемости инфекциями в мире остается высоким, несмотря на значительные успехи, достигнутые в борьбе с ними. По данным ВОЗ, ежегодно в мире острые кишечные инфекции переносят 2 млрд человек. В России из 5 млн случаев острых кишечных инфекций, зарегистрированных за последние 10 лет, половину составили заболевания неустановленной этиологии. Псевдотуберкулез и кишечный иерсиниоз имеют достаточный удельный вес в инфекционной патологии человека и постоянно регистрируются наряду с другими кишечными инфекциями. В последние годы, несмотря на тенденцию к снижению вспышечной заболеваемости псевдотуберкулезом и кишечным иерсиниозом, наблюдается рост числа спорадических случаев [11]. Следует особо подчеркнуть, что большая часть болеющих иерсиниозами – дети в возрасте до 14 лет, они составляют более 65% от общего числа пациентов [2, 9]. Диагностика острых кишечных инфекций, в том числе обусловленных иерсиниями, характеризуется низкой эффективностью средств и способов их верификации. Такое положение определяет устойчивое внимание ученых к совершенствованию бактериологических и разработке иммунохимических методов лабораторной диагностики псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза. Особое значение для выбора оптимальной схемы лечения имеет ранняя диагностика этих заболеваний с помощью высокоспецифичных и чувствительных тест-систем [13].

Иерсиниозные инфекции отличаются выраженным полиморфизмом клинических проявлений [1, 9]. Кроме того, характерными особенностями патогенеза иерсиниозов являются длительное сохранение возбудителя в организме, незавершенность патологического процесса и нарушения иммуногенеза. Если на

определенном этапе симптомы системного заболевания начинают превалировать над признаками инфекционного процесса, то наблюдается развитие осложнений или вторично-очаговых форм этой патологии. Например, доказана роль иерсиний в формировании хронических заболеваний желудочно-кишечного тракта, мочевыводящих путей, а также в развитии коллагенозов, артритов и др. [5, 10].

В настоящей работе приведены результаты разработки новых средств для ранней и дифференциальной диагностики острых и вторично-очаговых форм иерсиниозов. На основе неспецифических порообразующих белков наружной мембраны возбудителей псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза (*Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*) разработаны иммуноферментные тест-системы, фрагменты нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих пориновые белки, использованы для генодиагностики с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

**Материал и методы.** Проанализированы образцы сыворотки крови, полученные из лаборатории Роспотребнадзора по Приморскому краю, из стационарного отделения Медобъединения ДВО РАН, из кардиологического отделения Городской клинической больницы № 2 Владивостока. Исследованы 457 образцов сыворотки крови взрослых пациентов с диагнозами: псевдотуберкулез и кишечный иерсиниоз (162), острая кишечная инфекция неясной этиологии (70), поражение опорно-двигательного аппарата (65), поражение периферической нервной системы (130), сальмонеллез (30). Также изучены 55 образцов сыворотки крови детей с кардиологической патологией (40) и острой кишечной инфекцией неясной этиологии (15). В качестве контроля взята сыворотка крови 45 здоровых доноров (Станция переливания крови).

В стационарных условиях использовались общеклинические и стандартные лабораторные методы (клинико-лабораторные, биохимический анализ, функциональные пробы, ревматологические пробы), инструментальное обследование (рентгенография и сонография суставов, электро- и эхокардиография). Лабораторные и иммунологические исследования проводили при поступлении в стационар, далее – в динамике с интервалом 7–14 дней. В качестве серологического контроля использовали «Диагностикум эритроцитарный кишечной иерсиниозный антигенный,

сухой», производства Санкт-Петербургского НИИ вакцин и сывороток, предприятия по производству бактериальных препаратов ФМБА России. Анализ сыворотки крови в реакции непрямой гемагглютинации осуществлялся на базе лечебных учреждений согласно существующим нормативным документам: инструкция МЗ СССР № 15-6/42 «По эпидемиологии, лабораторной диагностике иерсиниозов, организации и проведению профилактических и противоэпидемических мероприятий» и инструкция МЗ СССР «По применению биодиагностикума эритроцитарно-кишечноиерсиниозного».

Бактериологическое обследование проводилось на базе лаборатории Роспотребнадзора по Приморскому краю в соответствии с нормативными инструкциями (МУ 3.1.1.2438-09; протокол № 3 от 25 декабря 2008 г.). Схема исследования включала обогащение материала при низкой температуре, использование дифференциально-диагностических сред для выделения и идентификации культур, определения их биотипа, серотипа, вирулентности. Видовая принадлежность культур устанавливалась по комплексу типичных морфологических, культуральных, биохимических, антигенных и других свойств. Серотипирование штаммов *Y. enterocolitica* проводилось с помощью реакции агглютинации на стекле по общепринятой методике с диагностическими сыворотками (коммерческий набор О-моновалентных сывороток) к *Y. enterocolitica* серогрупп О:3, О:4, О:4.32, О:4.33, О:5, О:5.27, О:6.30, О:6.31, О:7.8, О:9, О:13 и О:13.7 (согласно прилагаемой инструкции и МУ 3.1.1.2438-09). Выделенные от больных культуры *Y. enterocolitica* принадлежали к О:3, О:9 и О:5.27 серовариантам возбудителя.

Для выделения поринов использовали штамм 134 *Y. enterocolitica* серовара О:3 и штамм 598 *Y. pseudotuberculosis* серовара IB из коллекции НИИЭМ СО РАМН. Для генодиагностики были взяты штаммы нескольких видов иерсиний из коллекции НИИЭМ СО РАМН (табл.).

Для исследования сыворотки крови применяли непрямой вариант иммуноферментного анализа (ИФА) на микропланшетах Costar (США). В качестве антивидовых антител использовали коммерческие иммуноферментные конъюгаты производства НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (г. Москва). Результаты учитывали на спектрофотометре  $\mu$ Quant, BIO-TEK INSTRUMENTS, INC (США) при 492 нм. В качестве хромогена применяли 0,04 %-ный раствор ортофенилендиамина.

При определении диагностического титра в ИФА на основе порина из *Y. enterocolitica* сравнивали результаты анализа индивидуальных и пуловых сывороток здоровых доноров и индивидуальных сывороток крови больных кишечным иерсиниозом с бактериологически подтвержденным диагнозом при различных разведениях (1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600 и 1/3200). Величину, равную отношению средних значений оптической плотности продукта ферментативной реакции антигена с сывороткой крови больных

Таблица

Микроорганизмы, использованные в работе

| Штамм/плазмида  | Микроорганизм                | Серотип      |
|-----------------|------------------------------|--------------|
| 3260 (82-, 48-) | <i>Y. pseudotuberculosis</i> | IB           |
| M4835, M4836    | <i>Y. pseudotuberculosis</i> | IB           |
| M3159           | <i>Y. pseudotuberculosis</i> | III          |
| M3747           | <i>Y. pseudotuberculosis</i> | IV           |
| 164             | <i>Y. enterocolitica</i>     | O:3          |
| 1234            | <i>Y. enterocolitica</i>     | O:3          |
| 6579            | <i>Y. enterocolitica</i>     | O:9          |
| 4849            | <i>Y. frederiksenii</i>      | Не определен |
| 253/8744        | <i>Y. intermedia</i>         | Не определен |
| 991             | <i>Y. kristensenii</i>       | Не определен |

иерсиниозом и здоровых доноров при различных разведениях, определяли по формуле:

$$F_c/F_{зд} \text{ при } F_c = F_{оп} - F_{ф},$$

где  $F_c$  – оптическая плотность продукта специфической реакции антиген/антитело (антитело – сыворотка крови);  $F_{оп}$  – общая оптическая плотность продукта реакции;  $F_{ф}$  – оптическая плотность продукта неспецифической фоновой реакции;  $F_{зд}$  – оптическая плотность продукта реакции антигена с сывороткой здорового донора (отрицательный контроль). Результат считали положительным при  $F_c/F_{зд} \geq 2,1$ . Величины, соответствующие отношению  $F_c/F_{зд}$  в указанном диапазоне разведений сывороток, оказались равны 3,6, 4,0, 4,2, 5,5, 5,0 и 4,1 соответственно. За диагностический титр были приняты разведения 1/800–1/1600, при этих титрах можно было достоверно дифференцировать больного иерсиниозом и здорового донора.

В качестве антигена в ИФА использовали термоденатурированные порины наружной мембраны *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*, выделенные по методу Rosenbusch в нашей модификации [3].

Образцы бактериальной ДНК выделяли из цельной крови с помощью набора «ДНК-сорб-В-50» (ЦНИИ эпидемиологии МЗ РФ, г. Москва) в соответствии с рекомендациями производителя. Дизайн праймеров был выполнен с использованием программ Primer Premier 5 и GeneRunner. Специфические праймеры были синтезированы ЗАО «Евроген» (г. Москва). В работе использовались Taq ДНК-полимеразы производства Applied Biosystems (США) и «Сибэнзим» (г. Новосибирск) в соответствии с рекомендациями производителя. ПЦР проводили в буфере, содержащем 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 200 мкМ dNTP, по 50 пМ прямого и обратного праймеров, 2,5 ед. Taq ДНК-полимеразы и 25–50 нг матрицы ДНК. Температурный режим ПЦР: 1) предварительная денатурация хромосомной ДНК при 95°C – 3 мин; 2) 30 циклов денатурации при 94°C – 20 с, отжига при 55°C – 30 с и полимеразной реакции при 72°C – 1 мин 10 с; 3) достройка ПЦР-фрагментов

при 72°C – 5 мин. Результаты реакции анализировали с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле. ПЦР-фрагменты были клонированы в pBluescript SK (-) либо были использованы для прямого секвенирования после очистки силикагелем (Sigma, США). Секвенирование проводили в трех повторениях для исключения возможных ошибок при амплификации. Нуклеотидные последовательности ПЦР-продуктов определяли по методу Сэнгера на автоматическом ДНК-секвенаторе ABI 310 (Applied Biosystems, США) с использованием универсальных прямого и обратного M13-праймеров и секвенирующего набора ABI Prism BigDye Terminator (Applied Biosystems, США).

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel. Объем выполненных исследований позволяет оценить результаты с достоверностью 95–99%. Достоверность полученных результатов подтверждали, определяя стандартное отклонение ( $\delta$ ) и стандартную ошибку (по формуле для ограниченной выборки), нижний и верхний пределы доверительного интервала значений. Достоверность различий средних величин оценивали с использованием критерия Стьюдента.

**Результаты исследования.** Ранее в лаборатории молекулярных основ антибактериального иммунитета ТИБОХ ДВО РАН была разработана тест-система ИФА для диагностики псевдотуберкулеза на основе порина наружной мембраны *Y. pseudotuberculosis* (иерсинина) [6]. Наши исследования показали, что использование иерсинина в ИФА обеспечивает не только высокий уровень (95–98%) дифференциальной диагностики псевдотуберкулеза и других кишечных инфекций со сходными клиническими признаками, но и позволяет выявлять заболевание на ранних стадиях и независимо от сероварианта возбудителя [7].

С целью расширения сферы применения ИФА на основе поринов для верификации иерсиниозов была разработана вторая тест-система на основе порообразующего белка наружной мембраны *Y. enterocolitica* для диагностики кишечного иерсиниоза. Предпосылкой для создания этой тест-системы явились ранее полученные данные о том, что этот порин является иммунодоминантным белком и видоспецифическим антигеном, поскольку взаимодействует с антителами к различным серовариантам возбудителя кишечного иерсиниоза [4].

При конструировании тест-системы на основе порина из *Y. enterocolitica* определялись следующие параметры: концентрация антигена, наносимого на планшет, и разведение исследуемой сыворотки крови. Концентрация антигена составила 10 мкг/мл, за диагностический титр сыворотки было принято разведение 1/800–1/1600. В ходе апробации тест-системы для диагностики кишечного иерсиниоза были проанализированы сыворотки крови больных с характерными клиническими признаками заболевания, а также, учитывая полиморфизм иерсиниозной инфек-

ции, сыворотки крови больных псевдотуберкулезом и сальмонеллезом. Показано, что при разведении 1/800–1/1600 оптическая плотность продуктов реакции сыворотки крови больных псевдотуберкулезом с порином из *Y. enterocolitica* была в 1,5–2 раза ниже, а больных сальмонеллезом – не превышала контрольных значений. Следует отметить, что в 12% случаев в сыворотках здоровых доноров был обнаружен повышенный уровень антител к порину. Этот результат коррелирует с наблюдениями некоторых авторов о том, что в регионах с постоянно циркулирующим возбудителем заболевания общий фон уровня антител в крови местных жителей выше, чем по стране в целом [14]. Для сравнения эффективности и чувствительности предлагаемой тест-системы и используемой в клинической практике реакции непрямой гемагглютинации на основе эритроцитарного кишечной иерсиниозного диагностикума, были выбраны сыворотки больных с бактериологически подтвержденным диагнозом. Обнаружено, что эффективность ИФА более чем в 2 раза выше (90%) по сравнению с реакцией непрямой гемагглютинации (42%).

Таким образом, ИФА на основе видоспецифического белка-порина наружной мембраны *Y. enterocolitica* является высокоэффективным методом диагностики кишечного иерсиниоза, позволяет выявлять специфические антитела к порину в сыворотках крови больных независимо от серологического варианта возбудителя и обеспечивает дифференциацию данного заболевания от других кишечных инфекций.

Клинические проявления псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза имеют много общего. Кроме того, в современных условиях фактическая заболеваемость, особенно иерсиниозом, значительно выше официально зарегистрированной, поскольку лабораторная диагностика данных инфекций остается не унифицированной и недифференцированной. Проведенные нами исследования показали, что проблему дифференциальной диагностики иерсиниозов можно решить при комплексном использовании двух тест-систем ИФА на основе поринов из *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*. Так, при анализе сыворотки крови от 70 больных с неясным диагнозом и клиническими симптомами острой кишечной инфекции в 5,7% случаев возбудителем оказался псевдотуберкулезный микроб, а 54% пациентов были больны кишечным иерсиниозом. Этот вывод сделан на основании того, что уровень антител к порину из *Y. enterocolitica* (при диагностическом титре 1/1600) в сыворотке крови второй группы больных в среднем был в 2 раза выше, чем к порину из *Y. pseudotuberculosis*. У больных первой группы уровень антител к порину из *Y. pseudotuberculosis* при диагностическом титре 1/800 был в 1,5 раза выше, нежели к порину из *Y. enterocolitica*.

Иерсиниоз отличается от других кишечных инфекций развитием рецидивирующих, осложненных и хронических состояний, что, в свою очередь, является триггером аутоиммунных заболеваний. В связи

с этим проблема установления причин возникновения иммунной патологии требует совершенствования диагностических подходов, позволяющих верифицировать инфекционный процесс на различных стадиях.

Мы использовали тест-системы ИФА на основе белков-поринов для установления этиологии вторично-очаговых форм иерсиниозов [8]. Аprobация проходила на базе Медицинского объединения Дальневосточного отделения РАН при обследовании лиц, находившихся на стационарном и амбулаторном лечении. В сыворотке крови пациентов с симптомами поражения опорно-двигательного аппарата (деформирующий артроз, инфекционный артрит, ревматоидный артрит) в 42% случаев были обнаружены антитела к порину *Y. pseudotuberculosis*. Антитела к порину *Y. enterocolitica* в анализируемых сыворотках не выявлены.

Показано, что тест-система на основе поринов иерсиний имеет высокую диагностическую ценность при установлении этиологии заболеваний, связанных с поражениями периферической нервной системы (вертеброгенная люмбагия, дискогенный радикулит) на разных стадиях заболевания (обострение, ремиссия, хроническое состояние). В сыворотках крови этих пациентов в 32% случаев были выявлены антитела к порину из *Y. enterocolitica*, в 17% случаев – к порину из *Y. pseudotuberculosis* в диагностических титрах независимо от стадии болезни.

С помощью тест-систем на основе поринов проведен анализ сыворотки крови детей, находившихся на лечении в кардиологическом отделении Городской клинической больницы № 2 с диагнозом «миокардит». В 10% случаев обнаружены антитела к порину *Y. pseudotuberculosis*, в 5% случаев – к порину *Y. enterocolitica*. Следовательно, причиной наблюдаемой сердечно-сосудистой патологии могли быть перенесенные ранее псевдотуберкулез и кишечный иерсиниоз.

С целью совершенствования способов ранней и дифференциальной диагностики иерсиниозов нами был разработан метод ПЦР на основе праймеров, комплементарных консервативным участкам последовательностей генов *ompF*-подобных поринов патогенных для человека *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*. Ранее с помощью ПЦР были клонированы нуклеотидные последовательности соответствующих генов и по ним определены первичные структуры *OmpF*-подобных поринов этих возбудителей. Показано, что аминокислотные последовательности поринов иерсиний имеют между собой высокую (более 80%) степень гомологии. Методом множественного выравнивания последовательностей зрелых *ompF*-поринов иерсиний определено, что консервативные участки их полипептидной цепи локализованы в трансмембранных доменах, а переменные – соответствуют наружным участкам (так называемым наружным петлям).

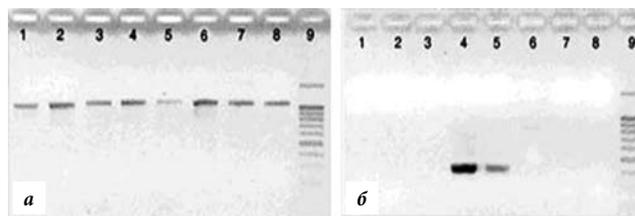


Рис. Электрофорез в 1,5%-ном агарозном геле: а – первый этап генодиагностики; б – второй этап генодиагностики. 1 – *Y. intermedia*, 2 – *Y. frederiksenii*, 3 – *Y. kristensenii*, 4, 5 – *Y. enterocolitica*, 6–8 – *Y. pseudotuberculosis*, 9 – ДНК-маркеры 100–150 п.н.

Для выяснения возможного полиморфизма нуклеотидной последовательности гена *ompF* было проведено исследование 4 штаммов *Y. pseudotuberculosis* и 3 штаммов *Y. enterocolitica*, а также некоторых штаммов непатогенных для человека видов иерсиний (*Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*). Штаммы патогенных иерсиний были изолированы от лиц с различными клиническими проявлениями заболевания и отличались по эпидемиологической характеристике. Данные, полученные при сравнении участков нуклеотидных последовательностей, использовали при конструировании специфичных ПЦР-праймеров для дифференциации иерсиний.

Для выявления генетического материала бактерий рода *Yersinia* была подобрана гнездовая (nested) система праймеров. Для первого шага ПЦР сконструирована пара типоспецифических праймеров, которые были комплементарны наиболее консервативным участкам, кодирующим область гена поринов иерсиний *OmpF* (F3 5'-TGCAGTAGTAATCCCAGC-Y; RY 5'-CGGATCCTTAGAAGCTGATAAACCAAGCC-Y).

Для второго шага ПЦР выбрана пара праймеров, комплементарных определенному участку в составе *ompF*-гена *Y. enterocolitica* (F227 5'-GTCTGGGCTTTGCTGGTCTG-Y; R614 5'-GCGTCGTATTTAGACCAACG-Y). Анализ образцов бактериальной ДНК, представленных 3 штаммами *Y. enterocolitica* и 4 штаммами *Y. pseudotuberculosis*, показал, что на первом этапе ПЦР у всех бактерий рода *Yersinia* образуется фрагмент ожидаемой длины в 1100 нуклеотидов. Прямое секвенирование подтвердило, что полученные ПЦР-фрагменты соответствуют *ompF*-гену *Yersinia* (рис., а). На втором этапе образуется ПЦР-фрагмент длиной в 600 нуклеотидов, специфичный только для штаммов *Y. enterocolitica* (рис., б).

Аprobацию полученных праймеров проводили с использованием клинического материала – 15 образцов крови детей, находящихся на лечении в детском инфекционном отделении Городской клинической больницы № 2 Владивостока. В нескольких образцах выявлен генетический материал, соответствующий *ompF*-гену *Yersinia*. ДНК патогенных сероваров *Y. enterocolitica* обнаружена в 3 образцах, ДНК иерсинии неопределенного вида – в 1 образце.

Таким образом, тест-система на основе типоспецифических праймеров, комплементарных наиболее

консервативным участкам в области гена поринов иерсиний *ompF* и участку *ompF*-гена *Y. enterocolitica*, может быть использована в клинической практике как экспресс-метод для обнаружения генетического материала патогенных и непатогенных для человека бактерий рода *Yersinia* и дифференциальной диагностики кишечного иерсиниоза, вызываемого патогенными сероварами *Y. enterocolitica*.

**Обсуждение полученных данных.** В практическом здравоохранении доступен широкий круг лабораторных методов диагностики иерсиниозов, начиная с классического бактериологического посева и рутинного серологического анализа и заканчивая молекулярно-генетическими методами исследования. Главным достоинством предлагаемых нами методов диагностики является использование в качестве диагностических антигенов видоспецифических белков (*ompF*-подобных поринов наружной мембраны иерсиний), что позволяет определять заболевание, вызываемое всеми серовариантами данных возбудителей. В ходе исследований предложены новые подходы, позволяющие проводить дифференциальную диагностику различных форм иерсиниозов, с помощью тест-систем ИФА на основе поринов из *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*, а также осуществлять экспресс-диагностику генетического материала бактерий рода *Yersinia* и дифференциацию вида *Y. enterocolitica* с помощью ПЦР на основе праймеров, специфических к нуклеотидной последовательности хромосомного гена *ompF*.

Особенностью патогенеза иерсиниозной и псевдотуберкулезной инфекции является развитие вслед за кишечными проявлениями внекишечных осложнений, которые наблюдаются иногда в течение нескольких месяцев, а у части больных – даже в течение нескольких лет [13]. Это обусловлено тем, что одновременно с инфекционным процессом в организме могут развиваться различные по степени выраженности иммунопатологические изменения (или вторично-очаговые формы иерсиниоза). Последние рассматриваются как аутоиммунные, поскольку они обусловлены особенностями самого возбудителя. Иерсинии проявляют антигенную мимикрию, т.е. обладают общими антигенами, сходными с антигенами тканей и органов человека [15]. По мнению некоторых исследователей, такие антигены у бактерий и человека не являются полностью идентичными, а содержат общие антигенные детерминанты (эпитопы), что создает предпосылки для развития в инфицированном организме аутоиммунного процесса [11, 15].

Известно, что наиболее часто при иерсиниозах возникают осложнения в виде поражения опорно-двигательного аппарата и периферической нервной системы. Кроме того, иерсиниозы, как и другие бактериальные инфекции, могут сопровождаться развитием сердечно-сосудистых расстройств, обусловленных токсическим поражением синусового узла и проводящей системы, что выражается в приглушении сер-

дечных тонов, систолическом шуме и кардиографических изменениях различного характера. Тяжелая форма заболевания иногда приводит к токсическому поражению сердечной мышцы или инфекционно-аллергическому миокардиту.

Нами впервые продемонстрирована возможность применения тест-систем ИФА на основе поринов наружной мембраны *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* для установления этиологии вторично-очаговых форм заболеваний. Полученные результаты, на наш взгляд, являются очень перспективными, поскольку этиологическая верификация таких иммунопатологий практически не осуществляется ввиду отсутствия специфических методов диагностики. Кроме того, в настоящее время не существует нормативных документов, регламентирующих сроки и объем диспансерного наблюдения за лицами, перенесшими иерсиниоз. В практическом здравоохранении диспансерное наблюдение за реконвалесцентами осуществляется обычно в течение 1–3 месяцев после выписки из стационара. Однако неблагоприятные исходы иерсиниозной инфекции нередко проявляются спустя несколько месяцев после острого периода болезни, причем полиморфной симптоматикой. В большинстве случаев пациенты с формирующейся постиерсиниозной патологией обращаются за медицинской помощью не к инфекционистам, а к врачам смежных специальностей, которые зачастую расценивают данную клиническую картину как проявление самостоятельной нозологии, не связанной с иерсиниозом. Использование видоспецифических белков-поринов в качестве диагностических антигенов позволяет в значительной степени повысить эффективность диагностики иерсиниозов. Широкое распространение предлагаемых тест-систем в медицинской практике позволит устранить несоответствие между эпидемиологической значимостью иерсиниозов и низким уровнем развития средств ранней и дифференциальной диагностики их острых кишечных и вторично-очаговых форм, а также обеспечит возможность проведения своевременной и адекватной терапии.

*Авторы выражают глубокую признательность сотрудникам НИИЭМ СО РАМН д-ру мед. наук профессору Н.Ф. Тимченко и д-ру мед. наук Ф.Н. Шубину за предоставленные штаммы микроорганизмов, многолетнее плодотворное сотрудничество и ценные замечания в ходе обсуждения результатов данной работы.*

*Работа поддержана грантом 03-1-0-05-004 президиума РАН по программе «Фундаментальные науки – медицине».*

#### Литература

1. Бениова С.Н., Гордеев А.В., Малащенко В.Г. и др. Иммунопатологические аспекты иерсиниозных инфекций у детей // Педиатрия. 2001. № 2. С. 111–112.
2. Быданов М.Л. Некоторые клинические особенности течения иерсиниозной инфекции у детей // Экология человека. 1999. № 3. С. 65–66.
3. Вострикова О.П., Ким Н.Ю., Лихацкая Г.Н. и др. Структура и функция порообразующих белков бактерий рода

- Yersinia*. I. Выделение с сравнительная характеристика физико-химических свойств и функциональной активности поринов *Yersinia*. // Биоорг. химия. 2006. Т. 32, № 4. С. 371–383.
4. Вострикова О.П., Лихацкая Г.Н., Новикова О.Д., Соловьева Т.Ф. Антигенное родство и функциональные свойства поринов рода *Yersinia* // Биол. мембраны. 2000. Т. 17, № 4. С. 399–409.
  5. Каманцев В.Н., Скрипченко Н.В., Тихомирова О.В., Бехтерева М.К. Поражения периферической нервной системы при иерсиниозной инфекции у детей // Российский мед. журн. 2003. № 2. С. 27–29.
  6. Портнягина О.Ю., Вострикова О.П., Хоменко В.А. и др. Апробация иммуноферментной тест-системы на основе белка-порины из *Yersinia pseudotuberculosis* для диагностики псевдотуберкулеза (экстраинтестинального иерсиниоза) у детей // Иммунология. 2000. № 2. С. 59–61.
  7. Портнягина О.Ю., Новикова О.Д., Вострикова О.П. и др. Бактериальные порины как перспективные антигены для диагностики и вакцинопрофилактики инфекционных заболеваний // Вестник ДВО РАН. 2004. № 3. С. 7–34.
  8. Портнягина О.Ю., Вострикова О.П., Хоменко В.А. и др. Иммунопатологии, вызываемые иерсиниями, и их диагностика // Физиология и здоровье человека: тез. докл. 1-го Съезда физиологов СНГ. Сочи, 2005. Т. 2. С. 112–113.
  9. Псевдотуберкулез / Сомов Г.П., Покровский В.И., Беседнова Н.Н., Антоненко Ф.Ф. М.: Медицина, 2001. 256 с.
  10. Смирнов И.В. Возбудитель иерсиниоза и близкие к нему микроорганизмы // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2004. Т. 6. С. 10–21.
  11. Ценева Г.Я. Иерсинии и иерсиниозы. СПб.: Медмассмедиа, 2006. 168 с.
  12. Шурыгина И.А., Чеснокова М.В., Климов В.Т. Клинико-лабораторная диагностика псевдотуберкулеза при спорадическом уровне заболеваемости // Актуальные вопросы инфекционной патологии: тез. докл. Международного евро-азиатского конгресса по инфекционным болезням. Витебск, 2008. Т.1. С. 197.
  13. Ющенко Г.В. Современное состояние проблемы иерсиниозов // Эпидем. инфекц. болезни. 1998. № 6. С. 8–11.
  14. Makiikola O., Heesemann J., Toivanen A., Granfors K. High frequency of *Yersinia* antibodies in healthy populations in Finland and Germany // Rheumatology Internat. 1997. Vol. 16, No. 6. P. 227–229.
  15. Wenzel B.E., Heeseman J., Heufelder A. et al. Enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* and organ-specific autoimmune diseases in man // Contrib. Microbiol. Immunol. 1991. Vol. 12, No. 3. P. 80–88.

Поступила в редакцию 10.02.2010.

#### DEVELOPMENT AND APPROVAL OF HIGH-EFFICIENCY TEST SYSTEMS INTENDED FOR DIAGNOSING YERSINIOSIS

O.Yu. Portnyagina<sup>1</sup>, O.P. Vostrikova<sup>1</sup>, O.D. Novikova<sup>1</sup>, M.P. Isaeva<sup>1</sup>, A.M. Stenkova<sup>1</sup>, K.V. Guzev<sup>1</sup>, V.G. Malashenkova<sup>2</sup>, V.A. Khomenko<sup>1</sup>, O.V. Sidorova<sup>1</sup>, T.A. Gorbach<sup>3</sup>, T.F. Soloviova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS (159 100 Aniv. Of Vladivostok Av. Vladivostok 690022 Russia), <sup>2</sup> Vladivostok State Medical University (2 Ostryakova Av. Vladivostok 690950 Russia), <sup>3</sup> Medical Association of FEB RAS (95 Kirova St. Vladivostok 690022 Russia)

**Summary** – Various diagnostic test systems are used to verify acute bowel-related and secondary nodal forms of yersiniosis. Species-specific proteins of pseudotuberculosis and bowel-related yersiniosis pathogens (*Yersinia pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica*) being outer membrane porins are used as antigens to perform enzyme-linked immunoelectrodiffusion assay. The fragments of nucleotide sequences of genes encoding these proteins are used to perform polymerase chain reaction.

**Key words:** yersiniosis, diagnostics, outer membrane porins.

Pacific Medical Journal, 2010, No. 3, p. 85–90.

УДК 616.98:578.824.1-036.88(571.63)

## ВПЕРВЫЕ ВЫЯВЛЕННЫЙ ЛЕТАЛЬНЫЙ СЛУЧАЙ ЛИССАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В ПРИМОРСКОМ КРАЕ

Г.Н. Леонова<sup>1</sup>, И.В. Ченцова<sup>2</sup>, С.А. Петухова<sup>3</sup>, Л.М. Сомова<sup>1</sup>, С.И. Беликов<sup>4</sup>, И.Г. Кондратов<sup>4</sup>, Н.В. Крылова<sup>1</sup>, Н.Г. Плехова<sup>1</sup>, Е.В. Павленко<sup>1</sup>, Е.В. Романова<sup>4</sup>, В.А. Мацак<sup>2</sup>, Г.А. Смирнов<sup>2</sup>, Д.В. Новиков<sup>2</sup>

<sup>1</sup> НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (690087 г. Владивосток, ул. Сельская, 1),

<sup>2</sup> Приморская краевая клиническая больница № 1 (690090 г. Владивосток, ул. Алеутская, 57),

<sup>3</sup> Владивостокский государственный медицинский университет (690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 2),

<sup>4</sup> Лимнологический институт СО РАН (664033 г. Иркутск, ул. Улан-Батора, 3)

**Ключевые слова:** лиссавирус, клиника, морфология, молекулярная генетика.

Представлены данные комплексного изучения летального случая лиссавирусной инфекции, впервые выявленной на территории Яковлевского района Приморского края. Доказательством этиологической принадлежности случая послужили данные эпидемиологического анамнеза (контакт с летучей мышью), клиники инфекции, а также результаты вирусологического, морфологического и молекулярно-генетического исследований. Это первый верифицированный случай лиссавирусной инфекции на территории Сибири и Дальнего Востока.

Лиссавирусы являются представителями рода *Lissavirus*, принадлежащего к семейству *Rhabdoviridae*. Род

Леонова Галина Николаевна – д-р мед. наук, профессор, заведующая лабораторией клещевого энцефалита НИИЭМ СО РАМН; тел.: 8 (4232) 44-07-12, e-mail: galinaleon@mail.primorye.ru

*Lissavirus* включает 7 генотипов. К 1-му относят вирус классического бешенства, широко распространенный на всех континентах земного шара. В Центральной и Южной Африке циркулируют вирусы 2-го (*Lagos bat virus*), 3-го (*Mokola virus*) и 4-го (*Duvenhage virus*) генотипов. В странах Европы и в европейской части России циркулируют лиссавирусы европейских летучих мышей 1-го и 2-го субтипов (EBLV-1 и EBLV-2), относящиеся к 5-му и 6-му генотипам, которые изолированы от летучих мышей и от людей, укушенных ими. Лиссавирус австралийских летучих мышей (ABLW) относится к 7-му генотипу, изоляты которого также получены от людей [1]. Недавно были открыты четыре новых лиссавируса: Араван (Кыргызстан), Худжанд