

Т.В. Каримова ¹, Л.Н. Фомина ¹, В.Г. Малявин ¹, М.В. Чеснокова ²,
Б.Т. Климов ², Э.Ф. Опочинский ³

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА ЗА ИЕРСИНИОЗАМИ В НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ. СИСТЕМА УПРАВЛЕНИЯ КАЧЕСТВОМ

¹ Центр гигиены и эпидемиологии в Новосибирской области (Новосибирск)

² Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока (Иркутск)

³ Федеральный центр гигиены и эпидемиологии (Москва)

Представлены результаты микробиологического мониторинга за иерсиниозами в Новосибирской области и опыт внедрения системы менеджмента качества в деятельность лаборатории особо опасных инфекций.

Ключевые слова: иерсиниозы, лабораторная диагностика, управление качеством

MODERN METHODS OF LABORATORY RESEARCHES IN EPIDEMIOLOGICAL MONITORING OF YERSINIOSES IN NOVOSIBIRSK REGION. QUALITY CONTROL SYSTEM

T.V. Karimova ¹, L.N. Fomina ¹, V.G. Malyavin ¹, M.V. Chesnokova ²,
V.T. Klimov ², E.F. Opochinsky ³

¹ Center of Hygiene and Epidemiology in Novosibirsk Region, Novosibirsk

² Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East, Irkutsk

³ Federal Center of Hygiene and Epidemiology, Moscow

The results of yersinioses microbiological monitoring in Novosibirsk Region are presented and introduction of a quality management system in activities of a laboratory of especially dangerous infections is experienced.

Key words: yersinioses, laboratory diagnostics, quality management

АКТУАЛЬНОСТЬ

Иерсиниозы (псевдотуберкулез и кишечный иерсиниоз) имеют повсеместное распространение как в мире (Япония, Скандинавия, Восточная и Центральная Европа), так и в России (Сибирь, Северо-Западный регион, Дальний Восток) [1, 7, 11, 13]. Для человека они представляют опасность как пищевые сапрозоонозы [6], относятся к «эмерджентным» (emergent) инфекциям, эпидемиологические проявления которых возникают внезапно без видимых предвестников.

Новосибирская область — территория с высоким уровнем эпидемиологической опасности по псевдотуберкулезу, заболеваемость превышает среднефедеральный показатель в 8,3 раза (20,9 и 2,5 на 100 тыс. населения соответственно), ежегодно регистрируются вспышки псевдотуберкулезной инфекции, преимущественно в детских коллективах, фактором передачи служат овощные салаты. Для кишечного иерсиниоза характерна спорадическая заболеваемость (3,2 на 100 тыс. населения), не установлено значение в патологии человека энтеротоксигенных иерсиний, недостаточно изучены факторы их передачи.

Система эпидемиологического надзора за иерсиниозами требует совершенствования в плане ее быстрой, точной лабораторной диагностики, своевременного выявления возбудителя в эпидемических очагах инфекций. Это обуславливает укрепление,

модернизацию, оснащение практических лабораторий центров гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора современным оборудованием и внедрение в их работу новейших, надежных, эффективных средств и методов выявления возбудителей.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обобщить накопленный опыт применения современных методов лабораторной диагностики и поддержания системы управления качеством исследований при проведении эпидемиологического мониторинга иерсиниозов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование основано на ретроспективном и проспективном анализе данных микробиологического мониторинга иерсиниозов в Новосибирской области в период с 1995 по 2011 годы. Проведено бактериологическое исследование материала от 34728 больных людей, 119652 пробы из объектов окружающей среды (пищевые продукты, смывы, мелкие млекопитающие). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) использовали при исследовании 59 больных и 794 проб из объектов окружающей среды. Выделение и идентификацию культур, их био- и серотипирование выполняли согласно общепринятым методам [4, 5]. Для выявления и дифференциации ДНК вирулентных и авирулентных штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* и

Y. enterocolitica в объектах окружающей среды и клиническом материале использовали наборы для ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией («АмплиСенс *Yersinia enterocolitica/pseudotuberculosis*-FL) и с электрофоретической детекцией («АмплиСенс *Yersinia enterocolitica*-Ph, «АмплиСенс *Yersinia pseudotuberculosis*-Ph») производства ООО «Интерлабсервис», Москва.

На базе Референс-центра по природно-очаговым инфекциям ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (руководитель центра — директор института, доктор мед. наук, профессор С.В. Балахонов) проведено расширенное изучение молекулярно-генетических свойств 48 штаммов *Y. pseudotuberculosis* и 75 штаммов *Y. enterocolitica*. Плазмиды определяли по методу T. Kieser [12]. Структура праймеров, размер амплифицирующего фрагмента и постановка реакции представлены в работе Т.М. Bogdanovich et al. [8]. Определение генов суперантигена YPM, инвазивности *inv*, «острова высокой патогенности» *hpi* *Y. pseudotuberculosis* (выделение, структура праймеров, программы амплификации, состав реакционной смеси) были аналогичны, использованным в работе Н. Fukushima et al. [9]. Все манипуляции с ДНК *Y. enterocolitica* для определения генов *ail*, *ystA*, *ystB* (выделение, структура праймеров, программы амплификации, состав реакционной смеси) были аналогичны, использованным в работе W.J.B. Wannet et al. и A. Ibrahim et al. [10, 14]. Синтез олигонуклеотидных праймеров осуществлен в ЗАО «Синтол» (Москва).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В 2009 — 2011 гг. в соответствии с программами оснащения испытательных лабораторных центров (ИЛЦ) и Региональных центров мониторинга ин-

фекционных болезней II — IV групп патогенности лаборатория особо опасных инфекционных болезней (ООИ) ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Новосибирской области» оснащена современным лабораторным оборудованием для ПЦР, в том числе амплификаторами «Rotor-Gene» 6000 и ДТ-96 с учетом результата в режиме Real-time, детектором «Джин-4» с учетом результата по конечной точке, экстрактором нуклеиновых кислот EasyMAG, а также идентификатором микроорганизмов MicroScan (Германия). Комплект оборудования позволил создать дополнительные рабочие места на всех этапах ПЦР анализа, увеличить количество исследуемых образцов за один цикл амплификации в 3 раза, заменить биохимическую идентификацию в пробирках и одновременно изучать антибиотикочувствительность, сократить сроки получения результатов при массовом исследовании диагностического материала на вспышках иерсиниозов.

Оптимальный подход к выявлению патогенов (*Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*) реализовался через применение нескольких методов лабораторного исследования к одному образцу, включающих, наряду с бактериологическим анализом, использование ПЦР (рис. 1).

Подобный подход к лабораторной диагностике иерсиниозов в Новосибирской области увеличил достоверность результатов и частоту обнаружения иерсиний. Так, среднегодовой показатель (1995 — 2011 гг.) выделения иерсиний от людей составил 4,12 % (РФ — 0,73 %), из объектов окружающей среды — 5,10 % (РФ — 0,05 %). Метод ПЦР внедрен в деятельность лаборатории ООИ с 2005 г. При индикации *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* в объектах окружающей среды и материале от больных людей специфические ампликоны ДНК энтеропатогенных иерсиний обнаружены

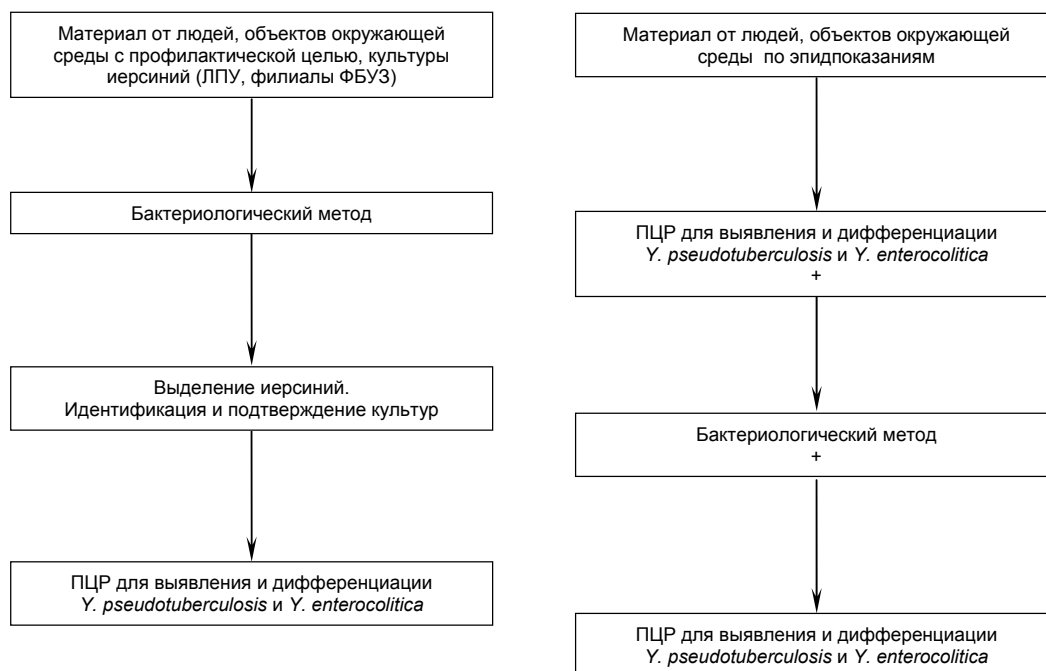


Рис. 1. Алгоритм лабораторной диагностики иерсиниозов.

в 12,85 и 20,43 % соответственно. Чаше от людей выявлялось ДНК *Y. pseudotuberculosis* (13,56 %), а из объектов окружающей среды — ДНК *Y. enterocolitica* (11,08 %). Удельный вес высеваемости *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* и выявления ДНК иерсиний представлены в таблице 1. Введение в алгоритм исследований ПЦР позволило более рационально использовать силы, средства, время, которые сегодня необоснованно много затрачиваются на проведение бактериологических исследований с отрицательным результатом.

Необходимо констатировать, что обеспечение санитарно-эпидемиологических мероприятий не ограничивается предоставлением результатов лабораторных исследований, но и предусматривает постоянное поддержание системы управления качеством.

ИЛЦ ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Новосибирской области» аккредитован в «Системе аккредитации лабораторий, осуществляющих санитарно-эпидемиологические исследования, испытания» на соответствие ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025-2006 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий», а в 2010 г. — в Международной системе аккредитации DAKKS на соответствие ISO/IEC (EN) 17025:2005 аккредитованы три лаборатории центра, в том числе и лаборатория особо опасных инфекций (ООИ).

Обеспечение качества результатов исследований реализуется путем участия в межлабораторных сравнительных испытаниях, проведения внутрилабораторного контроля и подтверждения выделенных культур в Референс-центре (рис. 2).

Таблица 1

Мониторинг иерсиниозов в Новосибирской области (1995–2011 гг.)

Метод и объект исследования	Число исследованных проб	Число положительных результатов абс. (% ± m)	<i>Y. pseudotuberculosis</i> абс. (% ± m)	<i>Y. enterocolitica</i> абс. (% ± m)
Бактериологический	154380	7571 (4,90 ± 0,05)	1290 (0,84 ± 0,02)	6281 (4,07 ± 0,05)
в т.ч. люди	34728	1430 (4,12 ± 0,11)	1248 (3,59 ± 0,10)	182 (0,37 ± 0,04)
окружающая среда	119652	6141 (5,1 ± 0,06)	42 (0,04 ± 0,01)	6099 (5,09 ± 0,06)
ПЦР*	853	114 (13,36 ± 1,16)	22 (2,58 ± 0,54)	92 (10,78 ± 1,06)
в т.ч. люди	59	12 (20,34 ± 5,24)	8 (13,56 ± 4,46)	4 (6,78 ± 3,27)
окружающая среда	794	102 (12,85 ± 1,19)	14 (1,76 ± 0,47)	88 (11,08 ± 1,11)

Примечание: * — исследования проводятся с 2005 г.



Рис. 2. Критерии технической компетенции.

В 2009 – 2011 гг. лаборатория особо опасных инфекций принимала участие в межлабораторных сравнительных испытаниях с уполномоченными провайдером FAPAS, GEMMA (Англия), ЦНИИЭ (г. Москва), института «Вектор» (г. Новосибирск), «ФЦГиЭ» (г. Москва). Всего поступило на исследование 43 шифрованные пробы, выполнено 183 исследования, все задачи решены правильно.

Внутрилабораторный контроль проводился в целях предупреждения получения недостоверных результатов, как до начала проведения исследований (испытаний), так и в ходе испытаний. Первое включало мониторинг параметров окружающей среды, контроль качества и условий хранения диагностических препаратов, тест-систем и расходных материалов, поверку средств измерений, соблюдение сроков аттестации и технического обслуживания испытательного оборудования. Второе предполагало оперативный (точность, повторяемость, воспроизводимость результатов исследований) и статистический (стабильность результатов исследований) контроль, расчет и оценку неопределенности измерений. Согласно ISO 17025 для контроля качества использовались сертифицированные или аттестованные стандартные образцы, проводилось дублирование испытаний с использованием тех же или других методов, а также повторные испытания сохраняемых объектов.

В рамках внутрилабораторного контроля разработаны программа и график надзора за испытательным персоналом: разработаны матрицы полномочий, которыми определены функции, обязанности и допуски для каждого сотрудника к испытаниям, работе на оборудовании и прочим функциям.

В соответствии с требованиями ISO 9001:2008, ISO 17025:2005 в лабораториях ИЛЦ ежегодные проводятся внешние (Центральным органом по аккредитации РФ, аккредитационным центром ФРГ ГмБХ DAkkS) и внутренние аудиты (специалистами ИЛЦ ФБУЗ «ЦГиЭ в Новосибирской области», имеющие сертификаты внутренних аудиторов).

В ходе внешнего аудита ассессоры выявили несоответствия в технической деятельности (50 %) и в системе менеджмента качества (50 %) ИЛЦ ФБУЗ «ЦГиЭ в Новосибирской области». Основные причины несоответствия заключались в: недостаточной регламентации процессов; незнании, непонимании персоналом требований стандарта; неисполнение персоналом требований внутренних документов ИЛЦ; недостаточном объеме внутрилабораторного контроля. Выявленные несоответствия, в том числе в лаборатории ООИ, были устранены в установленные сроки, что позволило получить Сертификат аккредитации на 5 лет.

Трехуровневая система организации лабораторной диагностики иерсиниозов предусматривает направление выделенных культур иерсиний для подтверждения и исследования их молекулярно-генетических свойств в Референс центре по мониторингу природно-очаговых инфекционных болезней (ФКУЗ Иркутский противочумный

институт Роспотребнадзора) [2]. Все изученные штаммы были подтверждены. Штаммы *Y. pseudotuberculosis* принадлежали к O:1b серотипу двухплазмидному варианту (pVM 82 и pYV47 MDa), имели гены суперантигена *urn a/c*, детерминанты пилей адгезии IV типа (*uapI*), инвазивности (*inv*), но не содержали остров высокой патогенности *hpi*. По набору факторов патогенности относились к первой генетической группе *Y. pseudotuberculosis*, преобладающей в Сибири [3].

Штаммы *Y. enterocolitica*, выделенные от мелких млекопитающих (5 штаммов), были представлены 3 и 4 биотипами O:3 серотипа, содержали плазмиду вирулентности (pYV 47 MDa) и *ystA* ген термостабильного токсина, что свидетельствует об их патогенности. Остальные штаммы отнесены к 1A биотипу и характеризовались наличием у 80 % штаммов гена *ystB*. Последнее имело отношение и к 12 штаммам *Y. enterocolitica*, изолированным от больных с энтероколитическим синдромом, — несмотря на отсутствие плазмиды pYV, генов *inv* и *ail* выявление гена термостабильного токсина B может свидетельствовать об этиологической роли сапрофитных *Y. enterocolitica* 1A в инфекционной патологии человека и их эпидемиологической значимости.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оснащение лаборатории особо опасных инфекций в Новосибирской области современным оборудованием и внедрение новых эффективных методов диагностики иерсиниозов позволило оптимизировать микробиологический мониторинг возбудителя, заключающейся в повышении результативности и оперативности исследований, уменьшении объема отрицательных исследований классическим методом за счет применения экспресс диагностики.

Аккредитация в международной системе DAkkS способствовала внедрению системы менеджмента качества в деятельность лабораторий, созданию прозрачной структуры, позволяющей проследить весь производственный цикл и минимизировать влияние человеческого фактора и, в конечном итоге, значительно улучшить качество исследований и достоверность результатов. Это нашло отражение в абсолютном подтверждении изолированных лабораторий особо опасных инфекций культур иерсиний, а расширенная идентификация штаммов в Референс-центре установила циркуляцию в Новосибирской области возбудителей *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* с определенным набором факторов патогенности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иерсинии и иерсиниозы / под ред. проф. Г.Я. Ценовой. — СПб., 2006. — 168 с.
2. Чеснокова М.В. и др. Алгоритм лабораторной диагностики иерсиниозов // Дальневосточный журнал инфекционной патологии — 2010. — № 17. — С. 188 — 192.

3. Чеснокова М.В., Климов В.Т., Марамович А.С. Генотипирование *Yersinia pseudotuberculosis*, выделенных в Сибири и на Дальнем Востоке // Журнал микробиол. — 2006. — № 6. — С. 20–25.
4. Эпидемиологический надзор и профилактика псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза. Методические рекомендации. МУ 3.1.1.2438-09; Утв. Руководителем Роспотребнадзора Г.Г. Онищенко 22.01.2009. — М., 2009. — 66 с.
5. Эпидемиология, лабораторная диагностика иерсиниозов, организация и проведение профилактических и противоэпидемических мероприятий». Инструкция №15-6/42; Утв. зам. начальника Главного эпидемиол. управления Минздрава СССР Г.Г. Онищенко 30.10.1990. — М., 1990. — 49 с.
6. Ющенко Г.В. Современное состояние проблемы иерсиниозов // Эпидемиол. и инфекц. болезни. — 1998. — № 6. — С. 8–11.
7. Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe / Eds: Andrew Amato-Gauci and Andrew Ammon: ECDC, Sweden. — 2007. — P. 254–259.
8. Bogdanovich T.M. et al. Use of O-antigen gene cluster — specific PCRs for the identification and O-genotyping of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* // J. Microbiol. — 2003. — Vol. 41, N 11. — P. 5103–5112.
9. Fukushima H. et al. Geographical heterogeneity between Far Eastern and Western countries in prevalence of the virulence plasmid, the superantigen *Yersinia pseudotuberculosis* — derived mitogen, and the high — pathogenicity island among *Yersinia pseudotuberculosis* strains // J. Clin. Microbiol. — 2001. — Vol. 39, N 10. — P. 3541–3547.
10. Ibrahim A., Liesack W., Stackebrandt E. Polymerase chain reaction-gene probe detection system specific for pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica* // J. Clin. Microbiol. — 1992. — Vol. 30, N 8 — P. 1942–1947.
11. Kangas S. et al. *Yersinia pseudotuberculosis* O:1 traced to raw carrots // Finland. Emerg. Infect. Dis. — 2008. — Vol. 14, N 12. — P. 1959–1961.
12. Kieres T. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli* // Plasmid. — 1984. — Vol. 12, N 1. — P. 19–36.
13. Rimhanen-Finne R. et al. *Yersinia pseudotuberculosis* causing a large outbreak associated with carrots in Finland, 2006 // Epidemiol. and Infect. — 2009. — N 137. — P. 342–347.
14. Wannet W.J.B. et al. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* a rapid and sensitive duplex PCR assay // J. Clin. Microbiol. — 2001. — Vol. 39, N 12. — P. 4483–4486.

Сведения об авторах

Каримова Татьяна Викторовна — заведующая лабораторией особо опасных инфекций ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Новосибирской области» (630099, г. Новосибирск, ул. Фрунзе, 84; тел./факс: (383-2) -20-26-41; e-mail: tatiana-karimova357@gmail.com)

Фомина Людмила Николаевна — менеджер по качеству, врач санитарно-гигиенической лаборатории ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Новосибирской области» (630099, г. Новосибирск; e-mail: nso-dap@rambler.ru)

Малявин Валерий Григорьевич — первый заместитель руководителя Испытательного лабораторного центра (ИЛЦ), технический руководитель ИЛЦ, заведующий отделом лабораторного дела ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Новосибирской области» (630099, г. Новосибирск; тел.: 8-383-2-27-04-96)

Чеснокова Маргарита Валентиновна — доктор медицинских наук профессор заместитель директора по научной и противоэпидемической работе ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (664047, г. Иркутск, ул. Трилиссера, 78; тел.: (3952) 22-13-12; e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru)

Климов Валерий Тимофеевич — кандидат медицинских наук старший научный сотрудник отдела эпидемиологии ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (664047, г. Иркутск, ул. Трилиссера, 78; тел.: (3952) 22-01-43; e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru)

Опочинский Эдуард Федорович — врач-бактериолог лаборатории особо опасных инфекций ФБУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» (117105, г. Москва, Варшавское шоссе, 19А; тел.: 8-495-952-12-64; e-mail: ooi@fcgsen.ru)