

УДК 616-076 616 981 452 (574)

А.А. Абдирасилова

**ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМ
ПРИ ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКОМ ОБСЛЕДОВАНИИ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ ЧУМЫ
КАЗАХСТАНА**

**Казахский научный центр карантинных и зоонозных инфекций им М. Айкимбаева (КНЦКИ) МЗ РК,
Алматы**

Целью данного исследования является определение эффективности сконструированных униклекс-, дуплекс- и мультиплекс-вариантов ПЦР тест-системы для эпизоотологического обследования природных очагов чумы, определение специфичности и чувствительности ПЦР наборов для выявления возбудителя чумы с атипичными признаками, для исследования переносчиков чумного микроба в природных очагах чумы. Исследование проводили на модели штаммов возбудителя чумы и близкородственных микробов, групповых суспензии блох и клещей.

Подбор праймеров для детекции гена *caf1*, *pla* и *yopE* осуществлялся с помощью программного обеспечения Primer 3 и комплекса онлайн-программ BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool. Синтез праймеров осуществлялся традиционным фосфоамидитным методом на автоматическом синтезаторе ДНК/РНК H6 (K&A, Германия). Очистка полученных растворов праймеров проводилась методом гель-фильтрации на колонках Centri•Pure N10 (emp Biotech GmbH, Германия). Экстракция геномной ДНК *Y.pestis*, *Y.pseudotuberculosis* и *Y.enterocolitica* осуществлялась с помощью набора QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Германия). Тестирование специфичности праймеров и тест-систем проводилось методом стандартной ПЦР. Анализ результатов амплификации осуществлялся стандартным методом горизонтального электрофореза в агарозном геле. В работе использовали штаммы *Y.pestis* из коллекции музея живых культур (МЖК) КНЦКИ, суспензии блох и клещей, собранных в Среднеазиатском пустынном очаге чумы.

Впервые в Казахстане сконструированы для производственного изготовления ПЦР тест-системы для детекции чумного микроба в полевых и лабораторных условиях. ПЦР тест-системы на основе праймеров к генам чумного микроба *yopE*, *caf1* и *pla* позволили выявить циркуляцию F1⁻ (бесфракционных) штаммов чумного микроба. Исследование групповых суспензий блох и клещей, собранных в период эпизоотологического обследования природных очагов чумы, подтвердило специфичность, высокую чувствительность наборов.

Ключевые слова: чумной микроб, гены *caf1*, *pla*, *yopE*, блохи, эпизоотия

**DIAGNOSTIC CAPACITY OF PCR TEST SYSTEMS FOR EPIZOOTIC STUDY
OF THE PLAGUE NATURAL FOCI OF KAZAKHSTAN**

A.A. Abdirasilova

**M. Aikimbayev's Kazakh Scientific Center for Quarantine and Zoonotic Diseases, Ministry of Health,
the Republic of Kazakhstan, Almaty**

The aim of the research is to determine of the efficiency of developed uniplex, duplex, and multiplex variants of PCR test systems for the epizootic research of the plague natural foci. The research was carried out on the model of plague and its relative strains, and with the suspension of fleas and ticks.

Selection of the primers used for detection of the genes *caf1*, *pla* and *yopE* is carried out by the program software Primer 3 and the complex of online program BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool. Synthesis of primers is carried out by the traditional phosphoramidite method on the automatic synthesizer DNA/RNA H6 (K&A, Germany). Purification of the received solutions of primers is carried out by the gel filtration method on Centri•Pure N10 columns (emp Biotech GmbH, Germany). Extraction of genomic DNA of *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica* is done by QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Germany). Testing of specific primers and test system was carried out by the standard PCR. Analysis of amplification's results is conducted by standard method of horizontal agarose gel electrophoresis. In the research, *Y.pestis* strains from the Alive cultures museum of M. Aikimbayev's Kazakh Scientific Center for Quarantine and Zoonotic Diseases, and suspensions of ticks and fleas collected from the Central Asian Desert Plague Focus were used.

For the first time in Kazakhstan, for production, PCR test systems have been developed for detection of the plague microbe in the field and laboratory conditions. The PCR test systems developed on the base of specific primers to plague microbe's genes *yopE*, *caf1* and *pla* helped to detect the circulation of plague microbe without F1 (without fraction). Research of suspensions of fleas and ticks collected during the plague epizooty confirmed the specificity and high sensitivity of the developed test systems.

Key words: plague microbe, gene, *caf1*, *pla*, *yopE*, fleas, epizooty

АКТУАЛЬНОСТЬ

В Казахстане 40 % территории энзоотичны по чуме, что создает постоянную угрозу заражения человека. Своевременное выявление и идентификация возбудителя чумы позволяют предотвращать вспышки и эпидемии данного опасного заболевания. Одним из оптимальных методов экспресс-диагностики чумы является полимеразная цепная реакция (ПЦР), обладающая высокой чувствительностью и специфичностью. Применение готовых наборов – ПЦР тест-систем позволяет стандартизировать процедуру диагностики, снизить вероятность ошибки и сократить время получения результатов анализа.

Создание отечественных тест-систем для ПЦР-детекции чумного микроба позволит установить контроль над эпизоотическим процессом в природных очагах чумы, проводить экспресс-детекцию чумного микроба у человека и животных с подозрением на чуму, а также в объектах внешней среды [1, 2]. Анализ данных за 1990–2003 гг. свидетельствует о том, что заражение через укус инфицированных блох продолжает оставаться основным механизмом. Из 17 очагов чумы за анализируемый период возникновения 11 очагов связано с укусами зараженных чумой блох. Из 23 больных, зарегистрированных за этот период, 12 (52,17 %) человек заразились чумой через укус блох [3, 6]. Показана перспективность ПЦР-исследования блох в природных очагах чумы [4, 5].

Серьезным препятствием внедрения ПЦР-детекции чумного микроба в практику полевых и лабораторных исследований противочумных учреждений Казахстана является дефицит коммерческих наборов ПЦР тест-систем для обеспечения потребности противочумных учреждений РК, высокая стоимость зарубежных коммерческих тест-систем и сложность их регистрации на территории страны. Выходом из создавшейся ситуации является организация отечественного производства ПЦР тест-систем в Казахском научном центре карантинных и зоонозных инфекций им М. Айкимбаева, который является единственным в Центральной Азии и в Казахстане производителем препаратов для диагностики возбудителей особо опасных инфекций. Экспериментальные и лабораторные серии ПЦР наборов для детекции чумного микроба были разработаны в референс-лаборатории КНЦКЗИ.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЙ

Целью данного исследования является определение эффективности сконструированных униклекс-, дуплекс- и мультиплекс-вариантов ПЦР тест-систем для эпизоотологического обследования природных очагов чумы, выявления штаммов возбудителя чумы с атипичными признаками, для исследования переносчиков чумы в природных очагах чумы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подбор праймеров для детекции гена *caf1*, *pla* и *yopE* осуществлялся с помощью программного обеспечения Primer 3 и комплекса онлайн-программ BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) на основе информации, представленной в базе данных NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Синтез сконструированных праймеров осуществлялся традиционным фосфоамидитным методом на автоматическом синтезаторе ДНК/РНК H6 (K&A, Германия). Очистка полученных растворов праймеров проводилась методом гель-фильтрации на колонках Centri•Pure N 10 (emp Biotech GmbH, Германия). Экстракция геномной ДНК *Y.pestis*, *Y.pseudotuberculosis* и *Y.enterocolitica* осуществлялась с помощью набора QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Германия). Тестирование специфичности праймеров и тест-систем проводилось методом стандартной ПЦР на амплификаторах разных моделей: Px2 (Thermo Scientific Hybaid, США) и Терцик Mastercycler pro (ДНК Технология, Россия). Состав сконструированных праймеров и размер полученных ампликонов приведены в таблице 1.

Реакционная смесь готовилась из отдельных компонентов: 0,5 мкл 10 мМ dNTP, 2,5 мкл 10хПЦР буфера (10 мМ KCl, 100 мМ TrisHCl, pH 9,0) и 0,5 единиц ДНК-полимеразы (Sigma, USA), к смеси добавляли 10 пмоль каждого праймера (табл. 1), 25 нг ДНК матрицы (полученной из разных штаммов бактерий вида *Y. pestis*) и деионизированную воду до конечного объема 25 мкл.

Анализ результатов амплификации осуществлялся стандартным методом горизонтального электрофореза в агарозном геле.

Оптимальная температура отжига для системы праймеров определялась эмпирически. Реакцию амплификации в формате мультиплекс (*yopE* + *caf1* + *pla*) проводили по программе, приведенной в таблице 2.

Таблица 1

Состав праймеров и размер ампликонов генов *yopE*, *caf1* и *pla* *Y. Pestis*

Ген	Праймер	Размер ампликона, п.н.
<i>yopE</i>	F: 5' - GGATCTAGCAGCGTAGGAGAAA - 3'	481
	R: 5' - AGAAGGGAATACCACAAACAGG - 3'	
<i>caf1</i>	F: 5' - GCTTACTCTTGGCGGCTATAAA - 3'	304
	R: 5' - TACGGTTACGGTTACAGCATCA - 3'	
<i>pla</i>	F: 5' - TATTCTGTCCGGGAGTGCTAAT - 3'	700
	R: 5' - ATAATAACGTGAGCCGGATGTC - 3'	

Программа амплификации участков генов *uorE*, *caf1* и *pla* *Y. pestis*

Этап	Температура, °С	Число циклов	Время
1	94	1	2 мин.
2	94	35	1 мин.
	55		1 мин.
	72		1 мин.
	72		1 мин.
3	72	1	10 мин.
4	4	1	Хранение

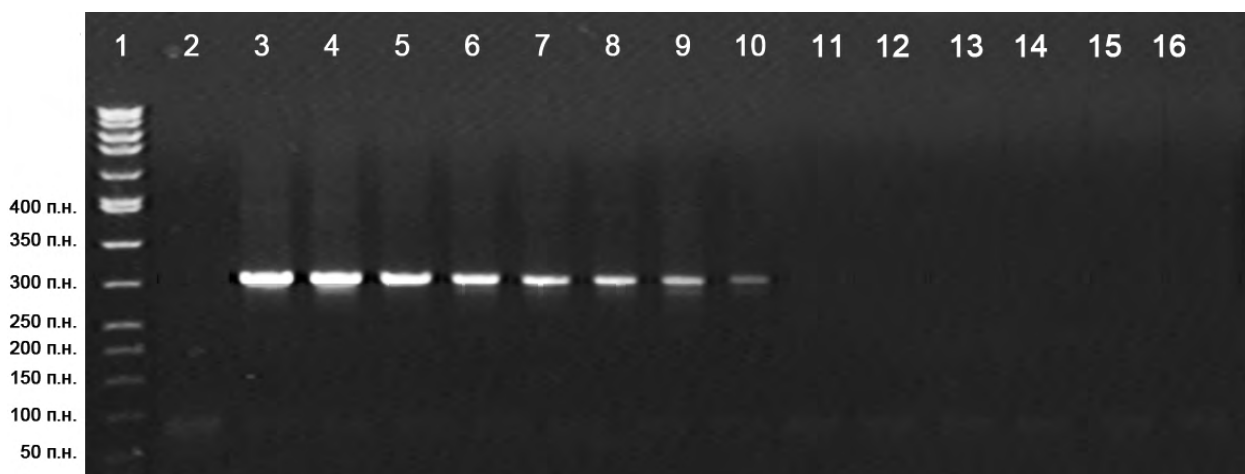


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации. 1 – маркер молекулярного веса; 2 – отрицательный контроль амплификации; 3–10 – образцы ДНК *Y. pestis* в разной концентрации (10^{10} , 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 мк/мл); 11–16 – образцы ДНК *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium*, *Shigella flexneri* и *Sh. sonnei*, соответственно.

В работе использован полевой материал, собранный на территории Прибалхашского автономного очага чумы (ЛЭРы «Баканасская древнедельтовая равнина» и «Равнина Акдала»). Суспензии блох и клещей были исследованы бактериологическим методом и ПЦР. 70 штаммов *Y. pestis* из коллекции музея живых культур (МЖК) КНЦКЗИ были исследованы тремя методами: бактериологическим, серологическим и ПЦР.

Серологические исследования проводили с использованием иммуноглобулинового эритроцитарного чумного диагностикума, произведенного в отделе медицинских иммунобиологических биологических препаратов КНЦКЗИ, в системе реакции РНГА-РТНГА. ПЦР проводили с набором реагентов для детекции генов *caf1*, *pla*, и *uorE* чумного микроба с анализом результатов амплификации стандартным методом электрофореза в агарозном геле. Праймеры использовали в униплекс, дуплекс и мультиплекс режиме.

РЕЗУЛЬТАТЫ

ПЦР тест-система, созданная в референс-лаборатории КНЦКЗИ, показала высокую чувствительность, выявляя присутствие гена *caf1* при концентрации чумного микроба в исследуемой пробе, равной 1×10^3 микробных клеток/мл. При этом не наблюдалось неспецифических реакций с ДНК других энтеробак-

терий: *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Salmonella enteritidis*, *S. Typhimurium*, *Shigella flexneri* и *Sh. sonnei* (рис. 1). Как видно на рисунке 1, целевой продукт размером 304 п.н. имеется только в образцах, представляющих ДНК *Y. pestis*. Аналогичные результаты были получены при изучении разных штаммов *Y. pestis*, что свидетельствует об эффективности и высокой специфичности разработанной ПЦР тест-системы. ПЦР тест-система для обнаружения гена *caf1* чумного микроба методом полимеразной цепной реакции успешно прошла тестирование в отделе биолого-технологического контроля КНЦКЗИ.

Использование *caf1*, *pla*, и *uorE* в формате дуплекс и мультиплекс не влияло на уровень чувствительности праймеров (рис. 2, 3). Присутствие генов *pla* и *uorE* выявляется при концентрациях микроба чумы, равной 1×10^4 и 1×10^3 микробных клеток/мл соответственно.

Бактериологическое исследование 18 групповых суспензий блох, добытых на территории Таукумского автономного очага (ЛЭР «Кромка песков»), показали отрицательный результат. В 4 пробах из этих 18 суспензий блох был получен положительный результат в ПЦР. На электрофореграмме 2 зарегистрировано наличие генов *caf1* и *pla*, детерминирующих видоспецифические признаки чумного микроба, синтез F1-капсульного антигена и активатор плазминогена. (рис. 4).

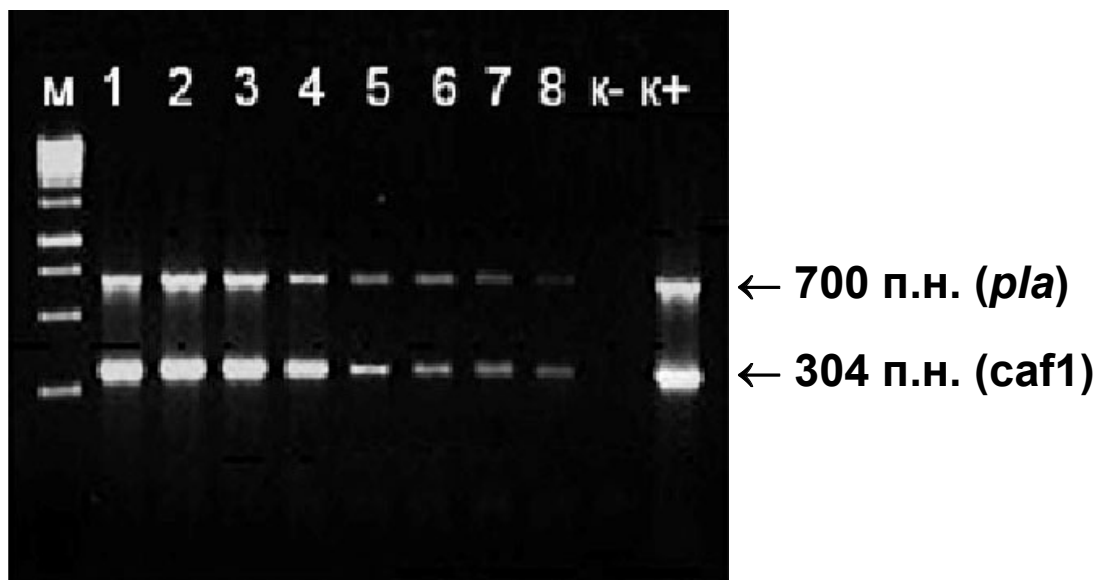


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации (ПЦР в формате дуплекс). М – маркер молекулярного веса; 1–8 – образцы ДНК *Y. pestis* в разной концентрации (10^{10} , 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 мк/мл); «К–» – отрицательный контроль амплификации (ДНК *Y. pseudotuberculosis*); «К+» – положительный контроль амплификации.

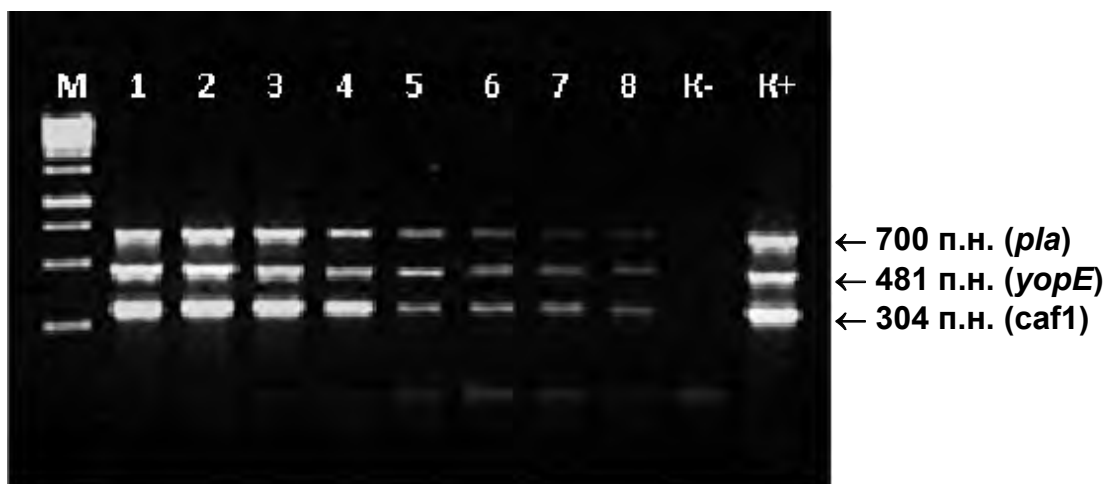


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов амплификации (ПЦР в формате мультиплекс). М – маркер молекулярного веса; 1–8 – образцы ДНК *Y. pestis* в разной концентрации (10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 мк/мл); «К–» – отрицательный контроль амплификации (ДНК *Y. pseudotuberculosis*); «К+» – положительный контроль амплификации.

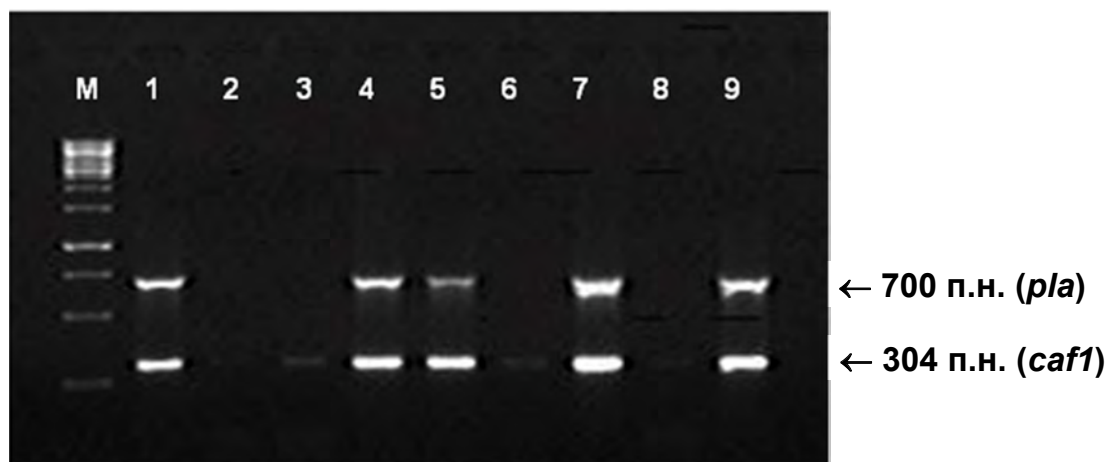


Рис. 4. Результаты исследования блох методом ПЦР с использованием экспериментальной тест-системы (КНЦКЗИ). М – маркер молекулярного веса; 1 – положительный контроль амплификации, 2 – отрицательный контроль амплификации; 3 – отрицательная проба, 4– групповые суспензии блох *Nosopsylla laeviceps* 83э, 5 – групповые суспензии блох *X. g. minax* 3э, 6 – отрицательная проба, 7 – групповые суспензии блох *X. skrjabini* 8э, 8 – отрицательная проба, 9 – групповые суспензии блох *X. skrjabini* 12э.

Динамика появления бесфракционных F1⁻ вариантов чумного микроба анализирована по данным эпизоотологического обследования в 2002–2009 гг. трех ЛЭРов Прибалхашского автономного очага

чумы – Баканасской древнедельтовой равнины, равнины Акдала, Баканасской саксауловой рощи. Анализированы свойства 107 штаммов, изолированных от больших песчанок и 255 штаммов от блох и клещей.

Таблица 3

Динамика выявления бесфракционных штаммов чумного микроба

№	Год исследования		Большие песчанки		Эктопаразиты		Всего штаммов	F1 ⁻
			Всего штаммов	F1 ⁻	Блохи	Клещи		
1	2002	весна	1	–	–	–	–	–
		осень	1	–	41	5	46	–
2	2003	весна	–	–	5	1	6	–
		осень	12	–	35	4	39	–
3	2004	весна	–	–	–	–	–	–
		осень	–	–	13	–	13	–
4	2005	весна	6	–	2	–	2	–
		осень	5	1	31	4	35	2
5	2006	весна	4	4	3	–	3	3
		осень	10	10	12	1	13	12
6	2007	весна	15	5	12	–	12	5
		осень	10	3	43	1	44	25
7	2008	весна	3	3	–	–	–	–
		осень	23	16	26	2	28	14
8	2009	весна	2	–	3	–	3	2
		осень	15	13	6	5	11	10

Таблица 4

Результаты изучения F⁻ штаммов Прибалхашского автономного очага

№	Сектора первичных районов (ЛЭР)	Сектора	РНГА	Результаты ПЦР	
				Caf1	Pla
1.	Баканасская древнедельтовая равнина	7-К 1	отр.	+	+
2.	Баканасская древнедельтовая равнина	7-К 1	отр.	+	+
3.	Баканасская древнедельтовая равнина	7-К 1	отр.	+	+
4.	Баканасская древнедельтовая равнина	7-К 1	отр.	+	+
5.	Баканасская древнедельтовая равнина	8-Л-3	отр.	+	+
6.	Баканасская древнедельтовая равнина	8-Л-3	отр.	отр.	+
7.	Баканасская древнедельтовая равнина	8-Л-3	отр.	+	+
8.	Баканасская древнедельтовая равнина	8-Л-3	отр.	+	+
9.	Баканасская древнедельтовая равнина	8-К-3	отр.	+	+
10.	Баканасская древнедельтовая равнина	8-К-3	отр.	+	+
11.	Баканасская древнедельтовая равнина	8-К-3	отр.	отр.	+
12.	Баканасская древнедельтовая равнина	8-К-3	отр.	+	+
13.	Баканасская древнедельтовая равнина	8-К-3	отр.	+	+
14.	Баканасская древнедельтовая равнина	8-К-3	отр.	+	+
15.	Баканасская древнедельтовая равнин	8-К-3	отр.	+	+
16.	Равнина «Акдала»	10-М-1	отр.	отр.	+
17.	Равнина «Акдала»	10-М-1	отр.	+	+
18.	Равнина «Акдала»	10-М-1	отр.	+	+
19.	Равнина «Акдала»	10-М-1	отр.	+	+
20.	Равнина «Акдала»	11-Н-1	отр.	+	+
21.	Равнина «Акдала»	11-П-1	отр.	+	+
22.	Баканасская саксауловая роща	12-М-1	отр.	+	+
23.	Баканасская саксауловая роща	12-М-1	отр.	+	+
24.	Баканасская саксауловая роща	12-М-1	отр.	+	+
25.	Баканасская саксауловая роща	12-М-1	отр.	+	+
26.	Баканасская саксауловая роща	12-М-1	отр.	+	+
27.	Баканасская саксауловая роща	12-М-1	отр.	+	+
28.	Баканасская саксауловая роща	12-М-1	отр.	+	+

Полученные результаты свидетельствуют о наличии определенной закономерности в появлении F1⁺ вариантов. В 2002–2004 гг. на территории Баканасской древнедельтовой равнины, равнины Акдала и Баканасской саксауловой рощи среди изолированных штаммов не было зарегистрировано бесфракционных штаммов. Первые F1-штаммы чумного микроба были изолированы в 2005 г., а в последующие годы включительно до 2009 г. бесфракционные штаммы составляли основную часть изолированных штаммов (табл. 3).

28 штаммов чумного микроба (2005) по данным серологического изучения считались лишенными капсульного антигена фракции 1. ПЦР-диагностика этих штаммов на наличие гена *caf1*, кодирующего синтез капсульного антигена F1, выявила у 25 штаммов наличие гена капсульного антигена (табл. 4, рис. 5).

Отрицательные серологические результаты связаны с низким содержанием антигена F1 в опытных штаммах.

Важность использования ПЦР дуплекс тест-системы при эпизоотологическом обследовании территории природных очагов чумы показали результаты исследования суспензии клещей, представленные на рисунке 4.

ПЦР-исследование штаммов чумного микроба, выделенных на территории Прибалхашского

автономного очага, дали ожидаемые результаты за исключением одного штамма (на рисунке 7 – дорожка № 1), который дал отрицательный результат на наличие гена пестициногенности (*pst*). Данный штамм требует дальнейшего изучения, тем более, что соответствующий ему бенд *caf1*, также отличается слабым свечением.

Возможности ПЦР на основе мультиплексного анализа для одновременного выявления нескольких специфических нуклеотидных последовательностей показаны на рисунке 8 – электрофореграмма продуктов амплификации штаммов чумного микроба с использованием ПЦР тест-системы для одновременного выявления родоспецифического гена *yopE* и двух видоспецифических генов *caf1*, *pla*. На дорожке № 9 отсутствуют бенды, соответствующие видовым генам *Y. pestis*. В ДНК штамма выявлена лишь нуклеотидная последовательность, специфичная для рода *Yersinia* (*yopE*).

При испытании мультиплекс *yopE*, *pla*, *caf1* – набора выявили 5 штаммов чумного микроба, выделенных в ходе эпизоотологического обследования очаговой территории в Кызылординской области, которые не имели гена *pla*, кодирующего активатор плазмидогена, одного из факторов патогенности *Y. pestis* (рис. 9).

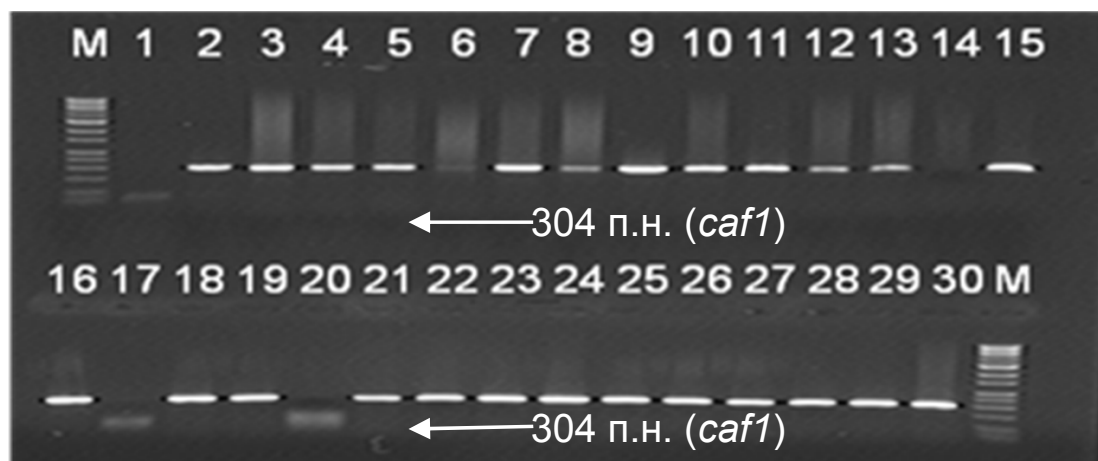


Рис. 5. Результаты исследования бесфракционных штаммов *Y. pestis* методом ПЦР с использованием экспериментальной тест-системы (КНЦКЗИ). М – маркер, 1 – отрицательный контроль, 2 – положительный контроль, 3–30 – штаммы *Y. pestis* F1, М – маркер.

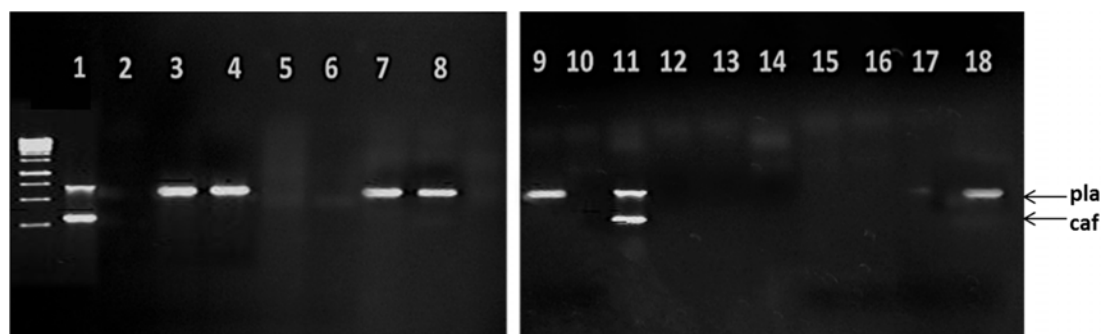


Рис. 6. Электрофореграмма продуктов амплификации суспензий клещей с использованием набора для ПЦР на основе мультиплексного анализа для выявления генов *caf1* и *pla* чумного микроба, собранных на территории Прибалхашского автономного очага чумы: 1 – положительный контроль, 2 – отрицательный контроль, 3–7 – суспензии клещей рода *Rhipicephalus*, 8 – суспензия клещей рода *Hyalomma*, 9–10 – суспензии клещей рода *Rhipicephalus*, 11 – суспензия клещей рода *Hyalomma*, 12–18 – суспензии клещей рода *Rhipicephalus*.

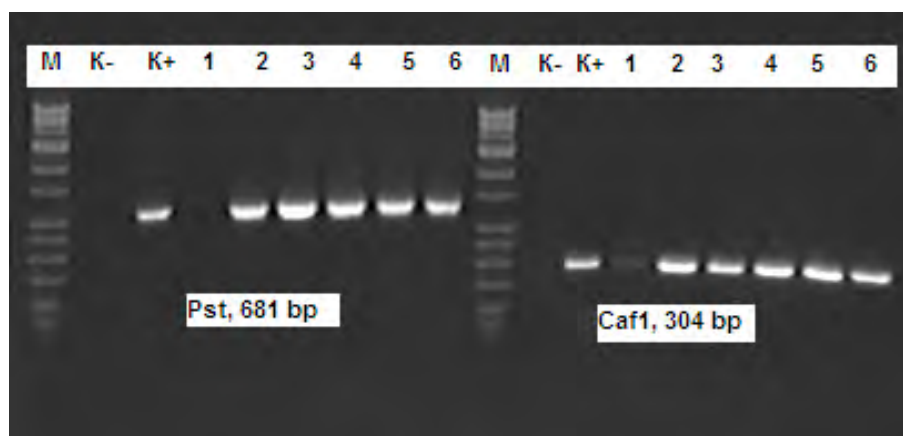


Рис. 7. Электрофореграмма продуктов амплификации суспензий штаммов *Yersinia pestis*, выделенных на территории Прибалхашского природного автономного очага чумы, с использованием ПЦР тест-систем для выявления генов *pst* и *caf1* чумного микроба: М – маркер, «К-» – отрицательный контроль, «К+» – положительный контроль, 1–6 – штаммы чумного микроба.

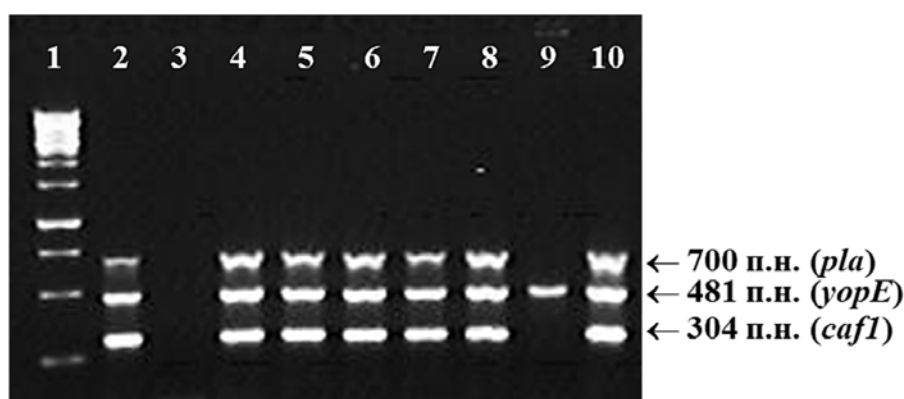


Рис. 8. Электрофореграмма продуктов амплификации суспензий штаммов *Yersinia pestis*, выделенных на территории Прибалхашского природного автономного очага чумы, с использованием набора для ПЦР на основе мультиплексного анализа для выявления генов *caf1*, *pla* и *yopE* чумного микроба: 1 – маркер, 2 – положительный контроль, 3 – отрицательный контроль, 4–10 – штаммы чумного микроба.

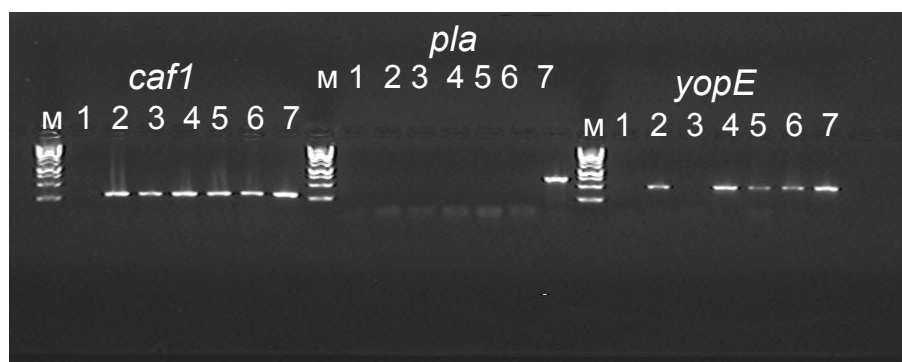


Рис. 9. Результаты исследования пяти штаммов *Y. pestis* (Кызылординская область) методом ПЦР с использованием экспериментальных праймеров *yopE*, *pla*, *caf1* (КНЦКЗИ). М – маркер, 1 – отрицательный контроль, 2–6 – штаммы *Y. pestis*, 7 – положительный контроль.

ОБСУЖДЕНИЕ

До настоящего времени активность эпизоотического процесса на большей части природных очагов чумы Казахстана выявляется бактериологическим и серологическим методами. ПЦР являются основой совершенствования мониторинга природных очагов чумы, изучения динамики и структуры эпизоотического процесса, так как является более чувствительным, стандартным и ускоренным методом детекции

чумного микроба, чем бактериологический, серологический и биологический методы. ПЦР тест-системы перспективны при изучении проблемных вопросов патогенеза, микробиологии, эпизоотологии, эпидемиологии чумного микроба и инфекционного процесса.

ПЦР тест-система, созданная в референс-лаборатории КНЦКЗИ, выявляла присутствие гена *caf1* при концентрации чумного микроба в исследуемой пробе, равной 1×10^3 микробных клеток/мл. При этом

не наблюдалось неспецифических реакций с ДНК близкородственных микроорганизмов.

Блохи грызунов являются наиболее анализируемым материалом при эпизоотологическом исследовании природных очагов чумы. В 2012 году 63 % штаммов возбудителя чумы было изолировано от переносчиков, что предполагает высокий риск заражения людей, так как происходит накопление эпидемического потенциала чумы на территориях, где зарегистрированы эпизоотии чумы. Показаны возможности ПЦР на основе мультиплексного анализа для одновременного выявления нескольких специфических нуклеотидных последовательностей. В ПЦР 18 групповых суспензий блох с отрицательным бактериологическим результатом зарегистрировано наличие генов *caf1* и *pla* для 4 проб.

Патогенные иерсинии могут утрачивать некоторые из плазмид. У чумного микроба «диагностические» гены расположены на плазмидах, являющихся мобильными генетическими элементами. Рекомендуется использование ПЦР тест-системы для одновременного выявления родоспецифического гена *yopE* (pCad) и двух видоспецифических генов *caf1*, *pla* (pFra и pPla), что позволит повысить точность и специфичность идентификации чумного микроба. Широкий спектр изменчивости чумного микроба в процессе эпизоотии, возможность циркуляции F1⁻ вариантов чумного микроба в природных очагах чумы определяют необходимость применения ПЦР тест-систем с регистрацией генов, контролирующих более одного видоспецифического признака, локализованных на разных плазмидах – pF1 и pCad.

ВЫВОДЫ

1. ПЦР тест-системы, сконструированные для производственного выпуска, обладают специфичностью и высокой чувствительностью при детекции чумного микроба.
2. ПЦР-диагностика эффективна при исследовании переносчиков чумы.
3. При эпизоотологическом обследовании рационально использовать ПЦР тест-системы для детекции генов, контролирующих видоспецифические признаки чумного микроба *caf1* и *pla*.
4. При испытании мультиплекс *yopE*, *pla*, *caf1*-набора выявлены бесфракционные штаммы чумного микроба, а также штаммы, не имеющие гена *pla*, кодирующего активатор плазминогена, одного из факторов патогенности *Y. Pestis*
5. Показаны возможности ПЦР на основе мультиплексного анализа для одновременного выявления родоспецифического гена *yopE* и двух видоспецифических генов *caf1*, *pla*.

Сведения об авторах

Абдирасилова А.А. – Казахский научный центр карантинных и зоонозных инфекций им М. Айкимбаева (КНЦКЗИ) МЗ РК (Республика Казахстан, Алматы, ул. Капал, 14; тел. +7727251-0293; e-mail: aabdirasilova@kscqzd.kz)

Information about the authors

Abdirasilova A.A. – M. Aikimbayev's Kazakh Scientific Center for Quarantine and Zoonotic Diseases of Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan (Almaty, Kapal str., 14, the Republic of Kazakhstan; tel. +7727251-0293; e-mail: aabdirasilova@kscqzd.kz)

ЛИТЕРАТУРА

1. Айкимбаев А.М. Основы биологической безопасности. – Алматы, 2009. – С. 312.
2. Абдирасилова А.А. Конструирование тест-системы мультиплексной ПЦР для определения чумного микроба // Гигиена, эпидемиология и иммунобиология. Алматы. – 2012. – № 3 (53). – С. 25–29.
3. Бекенов Ж.Е. Современные представления о природных факторах эпидемического потенциала чумы // Вестник КазНМУ. – Алматы, 2009. – № 1. – С. 9–15.
4. Брюханов А.Ф., Грижебовский Г.М., Брюханова Г.Д. и др. Использование полимеразной цепной реакции (ПЦР) для обнаружения чумного микроба в полевом материале – блохах *Citellophilus tesquorum* // Матер. научно-практ. конф., посв. 100-лет. образ. противочумн. службы России. – Саратов, 1997. – Т. 2. – С. 162–163.
5. Норкина О.В., Куличенко А.Н., Величко Л.Н. и др. Обнаружение возбудителя чумы в блохах с использованием полимеразной цепной реакции // Пробл. особо опасн. инф. – Саратов, 1994. – Вып. 4 (74). – С. 158–164.
6. Сагиев З.А., Айкимбаев А.М., Бекенов Е., Кальжан К. Некоторые особенности чумы в Казахстане на современном этапе // Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане. – Алматы, 2002. – Вып. 6. – С. 79–82.

REFERENCES

1. Ajkimbaev A.M. Basics of biological security. – Almaty, 2009. – S. 312.
2. Abdirasilova A.A. Construction of test-system of multiplex PCR for determination of pestilence microbe // Gigiena, jepidemiologija i immunobiologija. Almaty. – 2012. – № 3 (53). – S. 25–29.
3. Bekenov Zh.E. Modern ideas about nature factors of epidemic potential of plague // Vestnik KazNMU. – Almaty, 2009. – № 1. – S. 9–15.
4. Brjuhanov A.F., Grizhebovskij G.M., Brjuhanova G.D. i dr. Use of PCR for detection of pestilence microbe in field material – *Citellophilus tesquorum* fleas // Mater. nauchno-prakt. konf., posv. 100-let. obraz. protivochumn. sluzhby Rossii. – Saratov, 1997. – T. 2. – S. 162–163.
5. Norkina O.V., Kulichenko A.N., Velichko L.N. i dr. Detection of plague agents in fleas with use of PCR // Probl. osobo opasn. inf. – Saratov, 1994. – Vyp. 4 (74). – S. 158–164.
6. Sagiev Z.A., Ajkimbaev A.M., Bekenov E., Kal'zhan K. Some peculiarities of plague in Kazakhstan nowadays // Karantinnye i zoonoznye infekcii v Kazahstane. – Almaty, 2002. – Vyp. 6. – S. 79–82.