

УДК 579.2: 613.472 (470.63)

**ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ БАКТЕРИАЛЬНОЙ
ЗАГРЯЗНЕННОСТИ НЕКОТОРЫХ ВОДОЕМОВ
СТАВРОПОЛЬСКОГО КРАЯ**© 2010 Е.Н. Башкот¹, А.С. Геогджаян², И.В. Жарникова², Б.В. Солодовников²,
М.Е. Михайлова²¹ Ставропольский государственный аграрный университет² Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт

Поступила в редакцию 09.04.2010

Для экологического мониторинга бактериальной загрязненности некоторых водоемов Ставропольского края, повышения чувствительности и специфичности обнаружения возбудителя туляремии, разработана биотехнология получения магнимоносорбентной (МИС) тест-системы для селективного концентрирования патогена. Селективное концентрирование возбудителя туляремии на МИС с последующим проведением экспрессных методов позволит исследовать пробы в различных объектах внешней среды, включая воду поверхностных водоемов неограниченного объема, с различной степенью загрязнения и низкой концентрацией возбудителя.

Ключевые слова: *магнимоносорбент, возбудитель туляремии, индикация, концентрирование, иммуноферментный анализ, полимерная цепная реакция*

На территории Российской Федерации существуют природные очаги особо опасных и других инфекций, в связи с этим необходим контроль бактериальной загрязненности. Одной из устойчивой зоонозной инфекций, имеющей природную очаговость, является туляремия. Характерная особенность эпидемиологии данного возбудителя – множественность механизмов заражения и путей передачи инфекции, почти 100%-ная восприимчивость к ней людей. Природные очаги туляремии характеризуются стойкостью, длительностью существования и могут проявлять активность через много лет относительного благополучия. Возбудитель туляремии обладает высокой экологической пластичностью.

В Ставропольском крае существует обширный и стойкий очаг туляремии, с 1972 по 2004 гг. выделены 363 штамма данного возбудителя. Последний цикл активности очага (2003-2005 гг.) выявил эпидемическую значимость локальных источников водоснабжения – родниковых каптажей.

Башкот Елена Николаевна, кандидат сельскохозяйственных наук, старший преподаватель кафедры экологии и ландшафтного строительства. E-mail: es-agro@yandex.ru

Геогджаян Анна Самвеловна, научный сотрудник лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов». E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Жарникова Ирина Викторовна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник научно-производственной лаборатории особо опасных и других инфекций. E-mail: IVJ-biotech@yandex.ru

Солодовников Борис Владимирович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории индикации. E-mail: sbvl64@mail.ru

Михайлова Марина Евгеньевна, научный сотрудник лаборатории подготовки специалистов. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Источником инфекции явились грызуны, среди которых отмечалась эпизоотия туляремии. В настоящее время на территории РФ выявляют 6 основных ландшафтных типов природных очагов туляремии: лугополевой, степной, пойменно-болотный, предгорно- (горно) -ручьевого, лесной, тундровый [1]. Одним из распространенных является водный путь передачи инфекции: заражение людей происходит через контаминированную возбудителем воду ручьев и других открытых водоемов. Основным источником инфицирования воды являются водяные полевки, ондатры, полевки-экономки. Механизм заражения преимущественно алиментарный, реже – контактный (купание в зараженном источнике, умывание). Исследование объектов внешней среды является эффективным способом обнаружения возбудителя туляремии, так как для него характерна значительная устойчивость во внешней среде.

Пробы воды берут из различных водоемов на глубине 10-20 см от поверхности стоячей или слабо проточной воды. Но концентрация возбудителя туляремии в водных объектах, как правило, ниже чувствительности известных методов диагностики. Традиционно при исследовании проб требуется предварительная фильтрация, центрифугирование. Эти манипуляции чрезвычайно трудоемки, требуют строгого соблюдения режима [2]. В связи с этим целесообразно использование магнитных ловушек с магнимоносорбентами (МИС), представляющих собой алюмосиликатную магнитную матрицу с иммобилизованными антителами против туляремийного микроба, позволяющих проводить селективное концентрирование возбудителя. В ранее представленной нами работе [2] сообщалось о применении данных МИС для концентрирования возбудителя туляремии в водных

объектах внешней среды с последующей постановкой иммуноферментного анализа (ИФА). При исследовании 4 водных объектов (р. Егорлык, левая ветвь Правоегорлыкского канала; проток р. Алибек в бассейне р. Теберда; озеро Мусса-Ачитара, бассейн р. Гоначхир и озеро Доломит в бассейне р. Узункол) в ИФА были получены отрицательные результаты.

На основе разработанных органокремнезёмных МИС сконструированы тест-системы для диагностики возбудителя туляремии не только в ИФА, но и в полимеразной цепной реакции (ПЦР). Данное сочетание МИС с экспресс-анализами необходимо для повышения чувствительности, достоверности и воспроизводимости результатов, что возможно в связи со способностью МИС селективно фиксировать на своей поверхности исследуемый материал из большого объёма жидкости, проводить эффективную отмывку проб от загрязнений, мешающих проведению индикаторных реакций [3, 4].

Одним из перспективных методов экспресс-анализа на наличие ДНК патогена в исследуемом объекте на сегодняшний день является полимеразная цепная реакция (ПЦР) [5]. Важнейшим из условий успешного применения этого метода в диагностике инфекционных заболеваний является наличие эффективных способов подготовки тестируемых в ПЦР проб. ПЦР исследования проводят в соответствии с методическими указаниями [6] и инструкцией к данной тест-системе. Постановка ПЦР включает 3 стадии: пробоподготовку, непосредственно амплификацию и учет результатов (электрофорез). Необходимым условием, значительно повышающим эффективность детекции ДНК в ПЦР при низких концентрациях возбудителя туляремии (1×10^2 ; 1×10^3 мк/мл), является применение мультиплексной ПЦР тест-системы с эффективной амплификацией специфического ДНК-мишеней. Для обнаружения специфического фрагмента ДНК *F. Tularensis* была использована мультиплексная ПЦР тест-система, разработанная в ФГУЗ СтавНИПЧИ с праймерами комплиментарными участкам мобильного элемента *ISFtu2* и генов *23 kDa*, *forA*. Применение этой тест-системы позволяет помимо детекции ДНК возбудителя туляремии определять ориентировочную концентрацию возбудителя за счет различной эффективности амплификации выбранных ДНК-мишеней. При исследовании проб из десятикратных разведений чистой культуры *F. tularensis holarctica* «15 НИИЭГ» с концентрацией (1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 мк/мл) на электрофореграмме отчетливо регистрировались все три ампликона *ISFtu2* (208 п.н.), *23 kDa* (349 п.н.) и *forA* (500 п.н.). При снижении концентрации возбудителя в пробе и соответственно ДНК в амплификационной смеси от 1×10^3 до 1×10^1 мк/мл на электрофореграмме первой исчезает полоса фрагмента *forA* (500 п.н.), затем *23 kDa* (349 п.н.) и последней *ISFtu2* (208 п.н.). Эффективная амплификация фрагмента *ISFtu2* объясняется мультикопийностью данного фрагмента в геноме *F. tularensis* и преимуществом синтеза в мультипраймерной смеси более коротких ампликонов. Присутствие любого из фрагментов и их сочетаний в пробе и располагающихся строго на

уровне положительного контроля интерпретируется как положительный результат. При использовании в качестве проб чистых культур бактерий особых трудностей в подготовке образцов для постановки ПЦР не возникает [7]. Более трудной задачей представляется обработка проб объектов внешней среды (вода открытых водоемов, гнезда грызунов и т.д.), так как в этом случае необходимо использовать особые приемы, позволяющие избавиться от посторонних примесей и максимально сконцентрировать искомую ДНК. Примеси, находящиеся в объектах внешней среды являются ингибиторами ПЦР, способны значительно снижать чувствительность реакции за счет угнетения активности термостабильной ДНК-полимеразы, входящей в состав реакционной смеси [8].

Для устранения этих негативных явлений мы объединили два метода: избирательное концентрирование возбудителя туляремии на МИС с последующей постановкой полимеразной цепной реакции. Эксперименты проводили с чистой культурой – вакцинным штаммом туляремиального микроба «15 НИИЭГ», в модельных опытах на воде с садовой почвой (100:1), контаминированной туляремиальным микробом с концентрациями 10^1 ; 1×10^2 ; 1×10^3 ; 1×10^4 ; 1×10^5 мк/мл. Для модельного опыта собирали систему, состоящую из стеклянных трубок и постоянного магнита. МИС помещали в проточную трубку с фиксацией на постоянном магните, через которую пропускали 3 литра контаминированной воды. При этих условиях достигалось максимальное концентрирование антигена на поверхности МИС за счет реакции «антиген-антитело». В дальнейшем МИС извлекали и помещали во флакон, промывали физиологическим раствором, тем самым обеспечивая отмывание МИС от посторонних примесей, контаминирующей микрофлоры и исследовали в ПЦР.

МИС после контакта с *F. tularensis* суспендировали в 0,1 мл деионизированной воды и далее проводили пробоподготовку [6]. Аликвоту в 10 мкл исследовали в ПЦР. Положительными контролями служили образцы выделенной ДНК *F. tularensis*. Амплификацию проводили на амплификаторе Терцик™ МС 2 (ЗАО «ДНК-технология», Россия). Продукты амплификации анализировали методом электрофореза в 1,5-2% агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием, визуализацией в проходящем ультрафиолетовом свете и документированием на системе EDAS-120. Параллельно все исследуемые пробы подвергали ПЦР-анализу без предварительного концентрирования патогена на магнитоиммосорбенте. Положительные результаты ПЦР были получены при концентрации возбудителя 1×10^2 мк/мл и выше при обычной и сочетанной с концентрированием на МИС пробоподготовкой (при работе с чистыми культурами туляремиального микроба). В модельных опытах (вода с почвой, контаминированные возбудителем туляремии) выявлено преимущество использования МИС в пробоподготовке, что позволило выявить ДНК возбудителя при его концентрации 1×10^2 мк/мл. Обычное выделение ДНК было эффективно лишь при концентрации возбудителя в пробе 1×10^4 мк/мл. При исследовании 4 проб, контактировавших с антителами туляремиальными

на МИС, из водных объектов (р. Егорлык, левая ветвь Правоегорлыкского канала; проток р. Алибек в бассейне р. Теберда; озеро Мусса-Ачитара, бассейн р. Гоначхир и озеро Доломит в бассейне р. Узункол) в ПЦР получены отрицательные результаты, что подтвердило предыдущие результаты в ИФА. Использование МИС в ПЦР позволило максимально сконцентрировать микробные клетки и исключить отрицательное влияние на компоненты реакции ингибиторов. Мультиплексный формат тест-системы повышает надежность ответа в случаях, когда выделить живую культуру невозможно.

Выводы: нами сконструированы магнитоиммуносорбенты на основе магнитной матрицы, испытания диагностической ценности которых в лабораторных и модельных условиях показали возможность их эффективного использования при исследовании объектов внешней среды (детекции возбудителя туляремии) в сочетанных экспресс-анализах – ИФА, ПЦР.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Методические указания «Профилактика инфекционных болезней. Эпидемиологический надзор за туляремией» (МУ 3.1.2007-05). – М., 2005. – 36 с.
2. Башкот, Е.Н. Разработка схем гидроэкологического мониторинга / Е.Н. Башкот, М.С. Жихарева, Т.В. Жарникова, А.А. Семирчева // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – Том 11 (27) № 1 (6), 2009. – С. 1120–1122.
3. Ефременко, В.И. Магнитоуправляемые иммобилизованные системы в микробиологическом мониторинге природных очагов и объектов внешней среды на наличие возбудителей опасных инфекционных болезней // Журн. микробиол. – 1997. – №2. – С. 102-106.
4. Жарникова, И.В. Методологические подходы и разработка биотехнологии иммунобиологических препаратов для диагностики инфекционных особо опасных заболеваний и детекции их возбудителей. Автореф. дисс. ...доктора биол. наук – Ставрополь, 2005. – 39 с.
5. Романова, Л.В. *Francisella tularensis*: некоторые аспекты экологии и диагностики. Автореф. дисс. ...доктора биол. наук – Ставрополь, 2008. – 35 с.
6. Методические указания (МУ) 1.3.1794-03 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I-II групп патогенности». – М, 2003. – 38 с.
7. Кутырев, В.В. Актуальные проблемы совершенствования ускоренной диагностики особо опасных инфекционных болезней / В.В. Кутырев, А.Н. Куличенко, А.М. Кокушкин // Проблемы санитарно-эпидемиологической охраны территорий стран Содружества Независимых Государств: Тез. докл. Междунар. науч.-практ. конф. (15-17 сент., 1998). – Саратов, 1998. – С. 122-124.
8. Drosten, C. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Cremean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR / C. Drosten, S. Gottig, S. Schilling et al. // J. Clin. Microbiol. – 2002. – Vol. 40, N 7. – P. 517-523.

ECOLOGICAL MONITORING OF SOME RESERVOIRS BACTERIAL IMPURITY IN STAVROPOLSKY KRAY

© 2010 E.N. Bashkot¹, A.S. Geogdzhayan², I.V. Zharnikova², B.V. Solodovnikov²,
M.E. Mihaylova²

¹ Stavropol State Agrarian University

² Stavropol Science Research Antiplague Institute

For ecological monitoring of bacterial impurity of some reservoirs in Stavroposky kray, for increasing sensitivity and specificity of detection tularemia activator, the biogeotechnology of reception the magnitoimmunosorbent (MIS) test-system for selective pathogen concentration is developed. Tularemia activator selective concentration on MIS with the subsequent carrying out the express methods (EIA and PCR) will allow to research tests in various objects of hazardous environment, including water of surface reservoirs of unlimited volume, with a various contamination level and low concentration of the activator.

Key words: *magnitoimmunosorbent, tularemia activator, indication, concentration, enzyme immunoassay, polymerase chain reaction*

Elena Bashkot, Candidate of Agriculture, Senior Lecturer at the Department of Ecology and Landscape Construction. E-mail: eco-agro@yandex.ru

Anna Geogdzhayan, Research Fellow at the Laboratory "Collection of Pathogen Microorganisms". E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Irina Zharnikova, Doctor of Biology, Leading Research Fellow at the Research-and-Production Laboratory of Especially Hazardous and Other Infections. E-mail: IVJ-biotech@yandex.ru

Boris Solodovnikov, Candidate of Biology, Senior Research Fellow at the Laboratory of Indication. E-mail: sbv164@mail.ru

Marina Mikhaylova, Research Fellow at the Laboratory of Specialists Preparation. E-mail: snipchi@mail.stv.ru