

УДК 616.932:616-07(471)

А.А. АБДИРАСИЛОВА<sup>1</sup>, А.К. КАСЕНОВА<sup>1</sup>, А.М. МАТЖАНОВА<sup>2</sup>, Р.С. МУСАГАЛИЕВА<sup>1</sup>,  
Б.К. КУРМАНОВ<sup>1</sup>, А.С. ЖУНУСОВА<sup>1</sup>, Ш. БАХТЫБЕККЫЗЫ<sup>1</sup>, Н.К. МУКАШЕВ<sup>1</sup>,  
Н.П. КАБЫШЕВА<sup>1</sup>, З.А. САГИЕВ<sup>1</sup>, М.М. КУЛЬБАЕВА<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Казахский научный центр карантинных и зоонозных инфекций им. М. Айкимбаева  
Комитета по защите прав потребителей Министерства национальной экономики  
Республики Казахстан (КЗПП МНЭ РК), г. Алматы,

<sup>2</sup>Кызылординская противочумная станция КЗПП МНЭ РК, г. Кызылорда

## ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ПРИ РАССЛЕДОВАНИИ СЛУЧАЕВ ОСТРОЙ КИШЕЧНОЙ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННЫХ ШТАММАМИ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА, В КЫЗЫЛОРДЕ В 2015 ГОДУ



Абдирасилова А.А.

Холера, несмотря на общую тенденцию к снижению уровня заболеваемости, остается актуальной проблемой здравоохранения как во всем мире, так и в Казахстане. Генетические методы дали возможность не только эффективной индикации и идентификации возбудителей, но и определения эпидемического потенциала нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 и не O1/не O139 серогрупп. В работе представлены результаты применения метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) при расследовании случаев неэпидемической холеры в Кызылординской области летом 2015 года.

**Цель исследования.** Определение эффективности метода ПЦР с разработанным в КНЦКЗИ набором праймеров для детекции и идентификации холерных вибрионов в расследовании подозрительных на холеру случаев заболевания людей.

**Материал и методы.** Изучены 19 штаммов холерного вибриона, выделенных из различного материала, собранного в очагах холеры летом 2015 г. в Кызылорде. Применялись бактериологический, серологический методы, фаготипирование и полимеразная цепная реакция (ПЦР).

**Результаты и обсуждение.** Изученные штаммы по комплексу культуральных, биохимических, иммунологических и фаголитических свойств идентифицированы как *V. cholerae* non O1. Применение метода мультиплексной ПЦР с родо- и видоспецифическими праймерами позволило выявить циркуляцию холерных вибрионов двух серогрупп: *V. cholerae* O1 Eltor и *V. cholerae* non O1.

**Вывод.** Применение метода мультиплексной ПЦР позволило повысить эффективность схемы лабораторной диагностики холеры за счет ускоренной идентификации и внутривидовой дифференциации штаммов холерного вибриона, выявило циркуляцию штаммов двух серогрупп холерного вибриона – *V. cholerae* O1 Eltor с атипичными свойствами и *V. cholerae* non O1.

**Ключевые слова:** мультиплексная ПЦР, праймеры, холера неэпидемическая, больной, холерный вибрион, серогруппа.

Холера, несмотря на общую тенденцию к снижению уровня заболеваемости, остается актуальной проблемой здравоохранения как во всем мире, так и в Казахстане. По оценкам экспертов ВОЗ, во всем мире ежегодно происходит от 1,3 до 4,0 миллиона случаев заболевания холерой и 21 000–143 000 случаев смерти от холеры [1]. В этиологической структуре заболеваний, вызванных холерными вибрионами, в последние десятилетия все чаще отмечаются случаи заражения людей нетоксигенными штаммами O1 и вибрионами не O1 серогрупп. Об этом свидетельствуют многочисленные научные публикации [2-8]. Интерес к таким серогруппам холерного вибриона возрос с началом применения в лабораторных исследованиях молекулярно-генетических методов, в т.ч. полимеразной цепной реакции (ПЦР). Генетические методы дали возможность не только эффективной индикации и идентификации возбудителей, но и определения эпидемического потенциала

нетоксигенных O1 и не O1/не O139 серогрупп холерного вибриона. В Казахском научном центре карантинных и зоонозных инфекций им. М. Айкимбаева (КНЦКЗИ) разрабатываются праймеры для детекции возбудителей холеры. Праймеры были апробированы на штаммах холерного вибриона, выделенных из клинического материала, и проб воды, собранных в ходе вспышки неэпидемической холеры в Кызылординской области Республики Казахстан в 2015 г.

По комплексу факторов, обуславливающих эпидемическую опасность по холере, Кызылординская область относится к I типу территории. Начиная с 1997 г., практически каждый эпидемический сезон – с мая по сентябрь, с пиком в июне-августе, выявляются случаи заражения людей *V. cholerae* non O1, были случаи выделения из клинических проб *V. cholerae* O1 Ogava (2009 г.), *V. cholerae* RO-вариантов (1998 г.). Исследователи отмечают, что более 50% заболевших – это дети. Среди выделенных от больных культур *V.*

**Контакты:** Абдирасилова Айгуль Акзамовна, канд. мед. наук, зав. референс-лабораторией Казахского научного центра карантинных и зоонозных инфекций им. М. Айкимбаева, КЗПП МНЭ РК, г. Алматы. Тел.: + 7 701 883 0077, e-mail: aigul.abdirassilova@mail.ru

**Contacts:** Aigul Akzamovna Abdirasilova, PhD, Head of reference laboratory Aikimbayev's Kazakh Scientific Center for Quarantine and Zoonotic Diseases, Committee on Consumer Protection of Ministry of National Economy of the Republic of Kazakhstan, Almaty c., Kazakhstan. Ph.: + 7 701 883 0077, e-mail: aigul.abdirassilova@mail.ru

*cholerae non O1* неоднократно выявлялись гемолизнегативные штаммы с выраженным энтеропатогенным действием на кроликов-сосунков. Отмечена постоянная циркуляция в воде открытых водоемов области тех же серологических вариантов возбудителя [9-12].

Заболевания, вызванные холерными вибрионами, регистрируются на фоне роста заболеваемости острыми кишечными инфекциями (ОКИ). Так, в 2014 г. с января по апрель, т.е. до эпидемического сезона, в Кызылординской области официально зарегистрировано 333 случая ОКИ различной этиологии (78% – дети), что почти в два раза выше за тот же период в 2013 г. (177 больных, 92% – дети). Необходимо обратить внимание на кишечные инфекции неуточненной этиологии. По данным КГСЭН РК, количество случаев ОКИ неуточненной этиологии в области за 1999-2012 гг. составляло в среднем 700-800 [13]. Для снижения данного показателя была бы оптимальной организация лабораторий для проведения ПЦР в отделениях противочумных организаций, сельских участковых больницах, амбулаториях, удаленных от центров. В отличие от бактериологической лаборатории в ПЦР-лаборатории исследуется обеззараженный материал, метод универсальный по технике проведения, меняются лишь тест-системы для индикации возбудителей. Особенно это актуально для Казахстана, который характеризуется небольшим количеством крупных населенных пунктов, находящихся друг от друга на значительных расстояниях.

В нашей работе приведены результаты применения метода ПЦР в расследовании случаев неэпидемической холеры. В г. Кызылорда в 2015 г. с 27 июня по 13 июля были выявлены шесть человек с заболеванием, подозрительным на холеру, в том числе два ребенка двух и трех лет. По данным предварительного эпидемиологического расследования, по клинической картине больным был поставлен диагноз: пищевая токсикоинфекция.

Целью настоящей работы было определение эффективности метода ПЦР с разработанным в КНЦКЗИ набором праймеров для детекции и идентификации холерных вибрионов в расследовании подозрительных на холеру случаев заболевания людей.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Изучены штаммы холерного вибриона, выделенные из посевов испражнений больных и контактных с ними людей, воды из водопровода, емкостей в домах, где выявлены заболевшие, из открытых водоемов, сточной воды (всего 19 проб). Материал был засеян на пластинки щелочного агара (рН 7,8). Изолированные штаммы микроорганизмов идентифицировали по антигенным, биохимическим свойствам, по чувствительности к холерным бактериофагам. В работе использованы следующие диагностические препараты: О-холерный иммуноглобулиновый эритроцитарный диагностикум (КНЦКЗИ), холерные агглютинирующие О-, О139-, RO-сыворотки, холерные бактериофаги – классический «С» и «Эль-Тор» (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Саратов), реагенты для биохимических исследований.

Комплекс классических лабораторных исследований был дополнен методом ПЦР. Предварительно исследуемые штаммы инактивировались путем кипячения в течение 15 мин. с момента закипания воды. В работе использованы праймеры для детекции холерных вибрионов *ompA F/R*, *orfAB F/R*, *ctxA F/R*, *wbeN F/R* и *wbfR F/R*, разработанные и синтезированные

в референс-лаборатории КНЦКЗИ и прошедшие лабораторные испытания в референс-лаборатории Центра. Поиск последовательностей участков генов, к которым подбирались праймеры, проводился с использованием базы данных NCBI (National Center for Biotechnological Information, USA). Предварительную оценку специфичности праймеров и ампликонов проводили с помощью пакета программ BLAST.

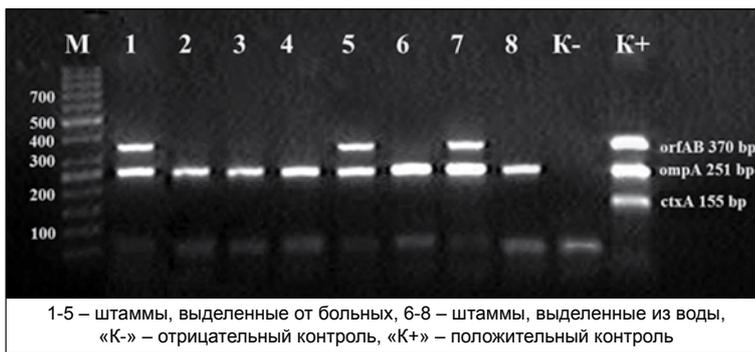
Праймеры *ompA F/R* определяют отношение к виду *Vibrio cholerae*, *orfAB F/R* – к серогруппе *V. cholerae* O1, биологическому варианту *Eltor*, или к серогруппе O139, *ctxA F/R* – способность холерных вибрионов к выработке экзотоксина холерогена – основного фактора патогенности возбудителей холеры, *wbeN F/R* – принадлежность к серогруппе O1, *wbfR F/R* – к серогруппе O139. Выделение ДНК из обеззараженных клеточных суспензий штаммов проводилось с помощью коммерческих наборов «QIAamp DNA MiniKit» (Promega, США) и «ДНК-сорб-В» (АмплиСенс, Россия). ПЦР выполняли в режиме мультиплекс на амплификаторах «Veriti» (Applied Biosystems, США) и «Терцик» (НПО «ДНК-технология», Россия). Учет результатов ПЦР производили методом электрофоретического разделения продуктов амплификации (ампликонов) в 1,2% агарозном геле. Молекулярный вес ампликонов определяли с помощью маркеров «GeneRuler» (Thermo Fisher Scientific, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В посевах испражнений пяти больных на пластинках щелочного агара (рН 7,8) обнаружены голубоватые прозрачные колонии, аналогичные колонии обнаружены и в посевах воды из источников, связанных эпидемиологически с этими больными. Серологическое исследование выделенных штаммов в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) дало отрицательные результаты. Штаммы не давали агглютинацию с О-, O139-, RO-холерными сыворотками, не лизировались специфическими холерными бактериофагами, агглютинировали эритроциты курицы, были способны образовать ацетилметилкарбинол – положительная реакция Фогес-Проскауэра. Определение сахаролитических ферментов по Хейбергу выявило, что все изоляты относятся к I типу ферментации (разлагали маннозу и сахарозу и были инертны в отношении арабинозы). По результатам проведенных исследований штаммы, выделенные из клинического материала и воды, по комплексу культуральных, биохимических, иммунологических и фаголитических свойств идентифицированы как *V. cholerae non O1*.

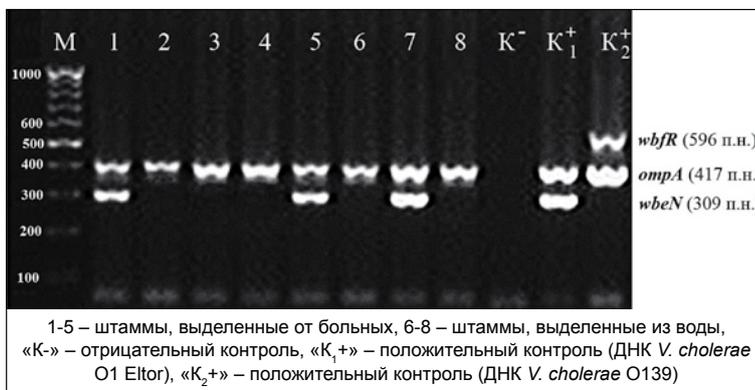
Стандартные лабораторные тесты были дополнены методом ПЦР. Полученные результаты показали, что все штаммы содержали в своем геноме ген *ompA*, т.е. являются представителями рода *Vibrio*, вида *cholerae*. В ДНК трех из них обнаружен ген *orfAB*, что означает отношение к серогруппе *V. cholerae* O1, биовару *Eltor*. Ген *orfAB* входит в состав острова патогенности VSP-II, который является уникальным для холерных вибрионов Эль-Тор и O139 серогрупп [14]. Ни один изолят не имел гена *ctxA*, т.е. не способен к выработке холерогена (рис. 1).

По результатам изучения методом ПЦР выделенные штаммы были отнесены к микроорганизмам рода *Vibrio* двух генотипов: 1. [*ompA*+/*orfAB*+/*ctxA*-], 2. [*ompA*+/*orfAB*-/*ctxA*-]. Причем штаммы с первым генотипом обнаружены в испражнениях двух больных и в одной пробе воды из емкости в доме больного (дорожки 1,5,7 на рис. 1).



1-5 – штаммы, выделенные от больных, 6-8 – штаммы, выделенные из воды, «K-» – отрицательный контроль, «K+» – положительный контроль

Рисунок 1 – Некоторые результаты изучения штаммов холерных вибрионов, выделенных из проб испражнений больных и воды из источников, эпидемиологически связанных с больными, в мультиплексной ПЦР с праймерами *ompA*, *orfAB*, *ctxA*



1-5 – штаммы, выделенные от больных, 6-8 – штаммы, выделенные из воды, «K-» – отрицательный контроль, «K<sub>1</sub>+» – положительный контроль (ДНК *V. cholerae* O1 E10r), «K<sub>2</sub>+» – положительный контроль (ДНК *V. cholerae* O139)

Рисунок 2 – Некоторые результаты изучения штаммов холерных вибрионов, выделенных из проб испражнений больных и воды из источников, эпидемиологически связанных с больными, в мультиплексной ПЦР с праймерами *wbfR*, *ompA*, *wbeN*

Вибрионы с генотипом [*ompA*+/*orfAB*-/*ctxA*-] были отнесены к серогруппе *V. cholerae non O1*. Принадлежность трех штаммов холерного вибриона с генотипом [*ompA*+/*orfAB*+/*ctxA*-] к серогруппе *V. cholerae O1* была подтверждена исследованием в ПЦР с использованием набора из трех праймеров для детекции и идентификации вибрионов вида *V. cholerae* по участкам генов *wbfR*, *ompA* и *wbeN*. Некоторые результаты представлены на рисунке 2.

Продукты амплификации с парой праймеров *wbeN* F/R были получены с ДНК тех же штаммов (дорожки 1, 5, 7 на рис. 2), в которых были выявлены специфичные для гена *orfAB* последовательности, что подтверждает принадлежность этих штаммов к серогруппе *V. cholerae O1*. В ДНК ни одного из штаммов не обнаружен ген *wbfR*, который является детерминантом поверхностного антигена O139. В геноме остальных изученных штаммов выявлена последовательность только гена *ompA*, что подтвердило принадлежность их к виду *V. cholerae*.

Заражение больных холерой в Кызылорде в 2015 г. произошло через воду. Отсутствие агглютинации с видоспецифическими холерными сыворотками штаммов, идентифицированных с помощью ПЦР как *V. cholerae O1 E10r*, возможно, является результатом фенотипической пластичности холерного вибриона. При постоянной циркуляции холерных вибрионов O1 серогруппы в объектах окружающей среды на них воздействует целый комплекс факторов и определенных параметров существования; формируется «персистирующий»

фенотип («persister») – один из вариантов адаптивной изменчивости холерного вибриона. Процесс адаптации к условиям окружающей среды модифицирует поверхностные структуры клетки, следствием чего являются изменения антигенного фенотипа, фагочувствительности. Такие же результаты были получены и в экспериментальных условиях, когда наряду с другими морфологическими изменениями происходило существенное снижение или утрата агглютинабельности холерными сыворотками О-, Инаба и Огава. При этом более широкий диапазон экологической пластичности обнаружен у нетоксигенных штаммов в сравнении с токсигенными [15, 16, 17, 18]. Все изученные штаммы отличались отсутствием чувствительности к бактериофагам. По литературным данным в последние годы появляются сообщения о фагорезистентных культурах холерных вибрионов Эль-Тор. По мнению ряда авторов, это ставит под сомнение диагностическую ценность фагового теста [5, 16, 20, 21].

Утрата штаммами *V. cholerae O1* свойств агглютинабельности и чувствительности к фагам в нашем случае значительно снизила диагностическую эффективность стандартной схемы исследования. Полимеразная цепная реакция позволила на основе выявления участков специфических для рода и вида генов холерного вибриона не только идентифицировать штаммы, но и дифференцировать серогруппы.

## ВЫВОДЫ

Высокая экологическая пластичность представителей рода *Vibrio*, в частности, вида *Vibrio cholerae*, появление атипичных штаммов холерного вибриона требуют адекватной схемы лабораторной диагностики холеры. Методы детекции и идентификации холерного вибриона, используемые в существующей схеме, основаны на выявлении фенотипических признаков и свойств, которые отличаются адаптивной изменчивостью. Введение в схему лабораторной диагностики полимеразной цепной реакции, основанной на выявлении маркерных участков генома – более стабильного элемента живого организма, обеспечивает надежную детекцию и идентификацию возбудителя инфекции. Использование метода мультиплексной ПЦР в расследовании случаев заболевания людей холерой в Кызылорде в 2015 г. выявило циркуляцию штаммов двух серогрупп холерного вибриона – *V. cholerae O1 E10r* с атипичными свойствами и *V. cholerae non O1*.

### Прозрачность исследования

Исследование не имело спонсорской поддержки. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать.

### Декларация о финансовых и других взаимоотношениях

Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами. Авторы не получали гонорар за статью.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1 Mohammad Ali, Nelson A.R., Lopez A.L., Sack D.A. Updated global burden of cholera in endemic countries // *PLOS Neglected Tropical Diseases*. – 2015. – Vol. 9(6)

2 Авдеева Е.П., Мазрухо Б.Л., Воронежская Л.Г., Монахова Е.В., Кудрякова Т.А., Цедова Э.Г., Ньематов А.С., Иногамова И.А., Якубова И.С. Характеристика энтеропатогенности холерных вибрионов не O1/O139 серогрупп, выделенных в Узбекистане // *Журн. микробиол., эпидемиол. иммунобиол.* – 2005. – № 3. – С. 80-82

3 Авдеева Е.П., Мазрухо Б.Л., Воронежская Л.Г., Цедова Э.Г., Монахова Е.В., Михась Н.К., Ньематов А.С., Иногамова И.А., Якубова И.С., Оброткина Н.Ф., Малькова Г.И., Давыдова В.К., Агапов Б.Л. Особенности циркуляции различных по происхождению холерных вибрионов не O1/O139 серогрупп // *Эпидемиология и инф. болезни*. – 2006. – №2. – С. 19-22

4 Ерошенко Г.А., Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Кутырев В.В. Генетические особенности штаммов холерных вибрионов не O1 / не O139 серогруппы, выделенных от больных в Астрахани в 1976–2003 гг. // *Проблемы особо опасных инфекций*. – 2006. – Вып. 92. – С. 41-44

5 Костромитина Е.А. Молекулярно-генетические свойства штаммов холерного вибриона эльтор с различной эпидемиологической значимостью: автореф. ... канд. мед. наук: 03.00.07, 03.00.15. – Саратов, 2004. – 170 с.

6 Кругликов В.Д., Монахова Е.В., Архангельская И.В., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Авдеева Е.П., Божко Н.В., Смоликова Л.М. Характеристика штаммов холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп, вызвавших заболевания людей в Ростовской области // *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* – 2011. – №5. – С. 18-22

7 Монахова Е.В. Факторы патогенности нехолерогенных штаммов *Vibrio cholerae*: автореф. ... док. биол. наук: 03.02.03. – Ростов-на-Дону, 2012. – 282 с.

8 Онищенко Г.Г., Ломов Ю.М., Москвитина Э.А., Подосинникова Л.С., Водяницкая С.Ю., Прометной В.И., Монахова Е.В., Водопьянов С.О., Телесманич Н.Р., Дудина Н.А. Холера, обусловленная *Vibrio cholerae* O1 stxAV-tcrA+ // *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* – 2007. – №1. – С. 23-29

9 Ермаков Г.Н., Акимжанов Р.К., Примбетова Л.И., Бисенулы М., Мусагалиева Р.С., Утепова И.Б. Об эпидемиологической обстановке по холере и вибриозу в Кызылординской области // *Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане*. – Алматы, 2000. – Вып. 4. – С. 298-299

10 Мусагалиева Р.С. Особенности эпидемиологии современной холеры в Казахстане: дисс. ... канд. мед. наук: 14.00.30. – Алматы, 2003. – 128 с.

11 Справки о проведении санитарно-противоэпидемических и профилактических мероприятий в очагах карантинных и других особо опасных инфекций в Кызылординской области и оказании консультативно-методической помощи за 2003-2011 гг. <http://adilet.zan.kz/>

12 Матжанова А.М. Кызылорда қаласында тіркелген эпид маңызы жоқ тырысқак ауруы туралы. Доклад на расширенном ученом совете. – Алматы: КНЦКЗИ, 2015

13 Бюллетени инфекционной заболеваемости населения Республики Казахстан за 1999-2012 гг. (Ф1).

14 O'Shea Y.A., Finnan S., Reen F.J., Morrissey J.P., O'Gara F., Fidelma E. Boyd The *Vibrio* seventh pandemic island-II is

a 26.9 kb genomic island present in *Vibrio cholerae* El Tor and O139 serogroup isolates that shows homology to a 43.4 kb genomic island in *V. vulnificus* // *Microbiology*. – 2004. – Vol. 150. – No. 12. – P. 4053-4063

15 Черепяхина И.Я. Антигенная изменчивость холерных вибрионов, выделенных в период седьмой пандемии холеры: автореф. ... док. мед. наук: 03.00.07. – Ростов-на-Дону, 2000. – 43 с.

16 Зинич Л.С., Хайтович А.Б. Экологические основы для проведения эпидемиологического надзора за холерой. Актуальные проблемы эпидемиологии и профилактической медицины: Матер. Всеросс. научно-практ. конф. молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. – Ставрополь: Изд-во ООО «Экспо-Медиа», 2014. – С. 20-22

17 Миронова Л.В., Хунхеева Ж.Ю., Басов Е.А., Пономарева А.С., Миткеева С.К., Балахонов С.В. Анализ стабильности генотипа *Vibrio cholerae* в условиях низкой температуры и дефицита питательных веществ // *Пробл. особо опасных инф.* – 2016. – Вып. 3. – С. 52-56

18 Jubair M., Morris J.G., Ali A. Survival of *Vibrio cholerae* in nutrient-poor environments is associated with a novel «persister» phenotype // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7(9)

19 Балахонов С.В., Миронова Л.В., Хунхеева Ж.Ю., Урбанович Л.Я., Басов Е.А., Гольдапель Э.Г., Куликалова Е.С., Пономарева А.С., Миткеева С.К., Ганин В.С., Кобанова Г.И. Актуальные вопросы совершенствования мониторинга вибриофлоры поверхностных водоемов в системе эпидемиологического надзора за холерой в Сибири и на Дальнем Востоке // *Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. проблемной комиссии (48.04) Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации*. – Ростов-на-Дону: Дониздат, 2015. – Вып. 28. – С. 37-44

20 Иванова С.М., Титов Г.В., Безсмертный В.Е., Кругликов В.Д., Москвитина Э.А., Титова С.В., Монахова Е.В., Мазрухо А.Б., Кудрякова Т.А., Зубкова Д.А., Писанов Р.В. Информация о биологических свойствах холерных вибрионов O1 серогруппы, изолированных из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации в 2013 году. Холера и патогенные для человека вибрионы: матер. совещ. специалистов Роспотребнадзора в г. Ростове-на-Дону (4-5 июня 2014 г.). – Ростов-на-Дону: Дониздат, 2014. – Вып. 27. – С. 59-61

21 Иванова С.М., Титов Г.В., Безсмертный В.Е., Титова С.В., Кругликов В.Д., Москвитина Э.А., Архангельская И.В., Ежова М.И., Кудрякова Т.А., Зубкова Д.А., Водопьянов С.О., Водопьянов А.С. Информация о биологических свойствах холерных вибрионов O1 серогруппы, изолированных из объектов окружающей среды и от людей на территории Российской Федерации в 2014 году. Холера и патогенные для человека вибрионы: матер. проблемной комиссии (48.04) Координационного науч. совета по санитарно-эпидемиол. охране территории Российской Федерации. – Ростов-на-Дону: Дониздат, 2015. – Вып. 28. – С. 67-70

## REFERENCES

1 Mohammad Ali, Nelson AR, Lopez AL, Sack DA. Updated global burden of cholera in endemic countries. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2015;9(6)

2 Avdeeva EP, Mazrukho BL, Voronezhskaya LG, Monakhova EV, Kudriakov TA, Tsedova EG, Nematov AS, Inogamova

IA, Yakubov IS. Feature enteropathogenic *Vibrio cholerae* O1 does not / O139 serogroups isolated in Uzbekistan. *Zhurn. mikrobiol., epidemiol. immunobiol = Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2005;3:80-2 (In Russ.)

3 Avdeeva EP, Mazrukho BL, Voronezhskaya LG, Tsedova EG, Monakhova EV, Mikhas NK, Nematov AS, Inogamova IA, Yakubov IS, Obrotkina NF, Malkova GI, Davydova VK, Agapov BL. Features of circulation of different origin of *V. cholerae* O1 does not / O139 serogroups. *Epidemiologiya i inf. Bolezni = Epidemiology and inf. disease*. 2006;2:19-22 (In Russ.)

4 Eroshenko GA, Kukleva LM, Shavina NY, Kutyrev VV. The genetic characteristics of strains of *V. cholerae* O1 does not / do not serogroup O139 isolated from patients in Astrakhan in 1976-2003. *Problemy osobo opasnykh infekcii = Plague*. 2006;92:41-4 (In Russ.)

5 Kostromitina EA. *Molekulyarno-geneticheskie svoystva shtammov kholernogo vibriona eltor s razlichnoi epidemi-cheskoi znachimosti: avtoref. ...kand. med. nauk: 03.00.07, 03.00.15*. [Molecular genetic characteristics of strains of *Vibrio cholerae* El Tor with different epidemiological significance: Abstract. ... Cand. of med. Sciences: 03.00.07, 03.00.15.]. Saratov; 2004. P. 170

6 Kruglikov VD, Monakhova EV, Arkhangel'skaya IV, Vodopyanov AS, Vodopyanov SO, Avdeeva EP, Bozhko NV, Smolikova LM. Characterization of strains of *V. cholerae* O1 does not / neO139 serogroups cause disease in humans in the Rostov region. *Zhurn. mikrobiol., epidemiol. immunobiol = Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2011;5:18-22 (In Russ.)

7 Monakhova EV. *Faktory patogennosti neholerogennykh shtammov Vibrio cholerae: avtoref. ... dok. biol. nauk: 03.02.03*. [Factors neholerogennykh pathogenicity strains of *Vibrio cholerae*: Author. ... Doc. of biol. Sciences: 03.02.03.]. Rostov-on-Don; 2012. P. 282

8 Onishchenko GG, Lomov Yu, Moskvitina EA, Podosin-nikova LS, Vodyanitskaya SY, Prometnoy VI, Monakhova EV, Vodopyanov SO, Telesmanich HR, NA Dudina. Cholera is caused by *Vibrio cholerae* O1 ctxAB-tcpA+. *Zhurn. mikrobiol., epidemiol. immunobiol = Journal of microbiology, epidemiol-ogy and immunobiology*. 2007;1:23-9 (In Russ.)

9 Ermekov GN, Akimzhanov RK, Primbetova LI, Bisenuly M, Musagalieva RS, Utepova IB. On the epidemiological situa-tion for cholera and vibriosis in Kyzylorda region. *Karantinnye i zoonoznye infekcii v Kazakhstane = Quarantine and Zoonotic infections in Kazakhstan*. 2000;4:298-9 (In Russ.)

10 Musagalieva RS. *Osobennosti epidemiologii sovremennoi kholery v Kazakhstane: diss. ... kand. med. nauk: 14.00.30*. [Fea-tures of modern epidemiology of cholera in Kazakhstan: diss. ... Cand. of med. Sciences: 14.00.30.]. Almaty; 2003. P. 128

11 *Spravki o provedenii sanitarno-protivoepidemicheskikh i profilakticheskikh meropriyatii v ochagakh karantinnykh i drugikh osobo opasnykh infekcii v Kyzylordinskoj oblasti i okazanii konsultativno-metodicheskoi pomoshhi za 2003-2011 gg.* [References to conduct sanitary and anti-epidemic and pre-ventive measures in the foci of quarantine and other dangerous infections in Kyzylorda region, and providing advisory and methodological assistance for the 2003-2011 biennium]. Avail-able from: <http://adilet.zan.kz/>

12 Matzhanova AM. *Kyzylorda kalasynda tirkelgen epid manyzy zhok tyryskak kauruy turaly. Doklad na rasshirennom uchenom sovete* [Kyzylorda cholera EPIDEMIC registered

in does not matter. The report on the extended meeting of the Scientific Council]. Almaty: KNCKZI; 2015

13 *Biulleteni infekcionnoy zabolevaemosti naseleniya Res-publiki Kazakhstan za 1999-2012 gg. (F1)* [Bulletins infectious morbidity of the population of the Republic of Kazakhstan for 1999-2012 years. (F1)]

14 O'Shea YA, Finnan S, Reen FJ, Morrissey JP, O'Gara F, Fidelma E. Boyd The *Vibrio* seventh pandemic island-II is a 26·9 kb genomic island present in *Vibrio cholerae* El Tor and O139 serogroup isolates that shows homology to a 43·4 kb genomic island in *V. vulnificus*. *Microbiology*. 2004;150(12):4053-63

15 Cherepakhina IYa. *Antigennaya izmenchivost kholernykh vibriov, vydelennykh v period sedmoi pandemii kholery: avtoref. ... dok. med. nauk: 03.00.07*. [Antigenic variation of *V. cholerae* isolated during the seventh cholera pandemic: Ab-stract. ... Doc. of med. Sciences: 03.00.07.]. Rostov-on-Don; 2000. P. 43

16 Zinich LS, Khaytovych AB. *Ekologicheskie osnovy dlya provedeniya epidemiologicheskogo nadzora za kholeroi. Aktual-nye problemy epidemiologii i profilakticheskoi mediciny: Mater. Vseross. nauchno-prakt. konf. molodykh uchennykh i specialistov Rospotrebnadzora* [Ecological basis for the epidemiological surveillance of cholera. Actual problems of epidemiology and preventive medicine: Mater. Vseross. Scient. Conf. young scien-tists and specialists of Rospotrebnadzor]. Stavropol: Publishing house LLC "Expo-Media"; 2014. P. 20-2

17 Mironova LV, Hunheeva ZhYu, Basov EA, Ponomareva AS, Mitkeeva SK, Balakhonov SV. Stability Analysis of genotype *Vibrio cholerae* in low temperature conditions and nutritional deficiencies. *Problemy osobo opasnykh infekcii = Plague*. 2016;3:52-6 (In Russ.)

18 Jubair M, Morris JG, Ali A. Survival of *Vibrio cholerae* in nutrient-poor environments is associated with a novel «persister» phenotype. *PLoS One*. 2012;7(9)

19 Balakhonov SV, Mironova LV, Hunheeva Zh. Yu., Urbanowicz LY, Basov EA, Goldapel EG, Kulikalova ES, Ponomarev AS, Mitkeeva CK., Ganin VS, Kobanova GI. *Aktualnye voprosy sovershenstvovaniya monitoringa vibrioflory poverhnostnykh vodoemov v sisteme epidemiologicheskogo nadzora za kholeroi v Sibiri i na Dalnem Vostoke. Kholera i patogennye dlya cheloveka vibriony: Mater. problemnoi komissii (48.04) Koordinatsionnogo nauchnogo soveta po sanitarno-epidemiologicheskoi okhrane territorii Rossiiskoi Federacii* [Actual issues of improving the monitoring vibrioflory surface water bodies in the system of epidemiological surveillance of cholera in Siberia and the Far East. Cholera and human pathogenic vibrios: Mater. Problem Commission (48.04) of the Scientific Council on the sanitary and epidemiological protec-tion of the territory of the Russian Federation]. Rostov-on-Don: Donizdat; 2015. No. 28. P. 37-44

20 Ivanova SM, Titov GV, Bezsmertnyi VE, Kruglikov VD, Moskvitina EA, Titova SV, Monakhova EV, Mazrukho AB, Kudriakov TA, Zubkova DA, Pisanov RV. *Informatsiya o biologicheskikh svoystvakh kholernykh vibriov O1 serogruppy, izolirovannykh iz obektov okruzhaiushhei sredy na territorii Rossiiskoi Federacii v 2013 godu. Kholera i patogennye dlya cheloveka vibriony: mater. soveshh. specialistov Rospotrebnadzora v g. Rostove-na-Donu (4-5 iunya 2014g.)* [Information about the biological properties of *V. cholerae* serogroup O1 isolated from the environment of objects on the territory of the Russian Federation in 2013. Cholera and human pathogenic

vibrios: mater. ings of the Conference. Rospotrebnadzor specialists in Rostov-on-Don (June 4-5, 2014.]. Rostov-on-Don: Donizdat; 2014. No. 27. P. 59-61

21 Ivanova SM, Titov GV, Bezsmertnyi VE, Titova SV, Kruglikov VD, Moskvitina EA, Arkhangelsk IV, Yezhov MI, Kudriakov TA, Zubkova DA, Vodopyanov SO, Vodopyanov AS. *Informaciya o biologicheskikh svoistvakh kholernykh vibrionov O1 serogruppy, izolirovannykh iz obektov okruzhaiushhei sredy i ot liudei na territorii Rossiiskoi Federacii v 2014 godu. Kholera i patogennye dlya cheloveka vibriony: mater. problemnoi komissii (48.04) Koordinatsionnogo nauch. soveta po sanitarno-epidemiol. okhrane territorii Rossiiskoi Federacii* [Information about the biological properties of *V. cholerae* serogroup O1 isolated from environmental objects and from people in the territory of the Russian Federation in 2014. Cholera and human pathogenic vibrios: mater.problemnoy Commission (48.04) Coordination scientific. Council for sanitary-epidemiology. protection of the territory of the Russian Federation]. Rostov-on-Don: Donizdat; 2015. No. 28. P. 67-70

#### ТҰЖЫРЫМ

**А.А. ӘБДІРӘСІЛОВА<sup>1</sup>, А.К. ҚАСЕНОВА<sup>1</sup>,  
А.М. МАТЖАНОВА<sup>2</sup>, Р.С. МҰСАҒАЛИЕВА<sup>1</sup>,  
Б.К. ҚҰРМАНОВ<sup>1</sup>, Ш. БАХТЫБЕКҚЫЗЫ<sup>1</sup>,  
Н.К. МҰҚАШЕВ<sup>1</sup>, А.С. ЖҮНІСОВА<sup>1</sup>,  
Н.П. ҚАБЫШЕВА<sup>1</sup>, З.А. САҒИЕВ<sup>1</sup>, М.М. КҮЛЬБАЕВА<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>М. Айқымбаев атындағы Қазақ карантиндік және зооноздық инфекциялар ғылыми орталығы, Қазақстан Республикасы Ұлттық экономика министрлігі Тұтынушылардың құқықтарын қорғау комитеті (ҚР ҰЭМ ТҚҚК), Алматы қ.,

<sup>2</sup>Қызылорда обаға қарсы күрес станциясы, ҚР ҰЭМ ТҚҚК

#### ҚЫЗЫЛОРДАДА 2015 Ж. ТЫРЫСҚАҚ ВИБРИОНЫНЫҢ ШТАМДАРЫ АРҚЫЛЫ ТУЫНДАҒАН ЖІТІ ІШЕК ЖҰҚПАЛАРЫ ЖҰҒУЫНЫҢ ТЕКСЕРУІ КЕЗІНДЕ ПТР ӘДІСІНІҢ ҚОЛДАНЫЛУЫ

Ауыру деңгейінің жалпы төмендеу үрдісіне қарамастан тырысқақ, бүкіл әлемде де және Қазақстанда да, денсаулық сақтаудың өзекті мәселесі болып қалуда. Генетикалық әдістер қоздырғыштарды тиімді индикациялау мен идентификациялауда ғана емес, сонымен қатар *V. cholerae* O1 және non O1/ non O139 серотоптардың токсигенді емес штамдарының эпидемиялық потенциалын анықтауға да мүмкіндік берді. Бұл жұмыста 2015 ж. жазында Қызылордада эпидемиялық емес тырысқақ жұғуын тексеру кезінде полимеразды тізбекті реакция (ПТР) әдісін қолдану нәтижелері ұсынылған.

**Зерттеудің мақсаты.** Адамдардың тырысқақты жұқтыруы күдігін тергеу кезінде тырысқақ вибриондарын анықтау және идентификациялау үшін ҚКЗИФО әзірленген праймерлер жиынтығы мен ПТР әдісінің тиімділігін анықтау.

**Материал және әдістері.** Қызылордада 2015 жылдың жазында тырысқақ ошақтарында жиналған әртүрлі материалдардан оқшауланған тырысқақ вибриондарының 19 штамдары зерттелді. Бактериологиялық, серологиялық әдістер, фаготиптеу және полимеразды тізбекті реакция (ПТР) қолданылды.

**Нәтижелері және талқылауы.** Дақылдық, биохимиялық, иммунологиялық және фаголитикалық қасиеттерінің жиын-

тығы бойынша зерттелінген штамдар *V. cholerae* non O1 ретінде анықталды. Туыс және түр арнайы праймерлері бар мультиплексті ПТР әдісін қолдану тырысқақ вибриондарының екі серотоптарының, яғни *V. cholerae* O1 Eltor және *V. cholerae* non O1 таралғанын анықтауға мүмкіндік берді.

**Қорытынды.** Мультиплексті ПТР әдісін қолдану тырысқақ вибриондарының штамдарын жедел идентификациялау және түршілік дифференциациялау арқылы тырысқақтың зертханалық диагностика тиімділігінің сұлбасын арттыруға, тырысқақ вибрионының екі серотоптарының, яғни қасиеттері атипті *V. cholerae* O1 Eltor және *V. cholerae* non O1 таралғанын анықтауға мүмкіндік берді.

**Негізгі сөздер:** мультиплексті ПТР, праймерлер, эпидемиялық емес тырысқақ, ауру адам, тырысқақ вибрионы, серотоп.

#### SUMMARY

**A.A. ABDIRASSILOVA<sup>1</sup>, A.K. KASSENOVA<sup>1</sup>,  
A.M. MATZHANOVA<sup>2</sup>, R.S. MUSAGALIYEVA<sup>1</sup>,  
B.K. KURMANOV<sup>1</sup>, S. BAKHTYBEKKYZY<sup>1</sup>,  
N.K. MUKASHEV<sup>1</sup>, A.S. ZHUNUSOVA<sup>1</sup>,  
N.P. KABYSHEVA<sup>1</sup>, Z.A. SAGIYEV<sup>1</sup>, M.M. KULBAYEVA<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>M. Aikimbayev Kazakh Scientific Center for Quarantine and Zoonotic Diseases, Committee on Consumer Protection, MNE RK, Almaty c., Kazakhstan,

<sup>2</sup>Kyzylorda anti-plague station, Committee on Consumer Protection, MNE RK MNE RK

#### THE USE OF PCR METHOD IN THE INVESTIGATION OF ACUTE INTESTINAL INFECTIONS CAUSED BY STRAINS OF *V. CHOLERAЕ* OCCURRED IN KYZYLORDA IN 2015

Cholera, despite the general downward trend in the incidence level remains an urgent public health problem, both worldwide and in Kazakhstan. Genetic techniques have made it possible not only to effectively detect and identify pathogens, but also to determine epidemic potential of nontoxicogenic strains of *V. cholerae* O1 and non O1 / non O139 serogroups. The paper presents the results of using of the polymerase chain reaction (PCR) for the investigation of cases of non-epidemic cholera in Kyzylorda region in the summer of 2015

**Purpose of researches.** Determination of the efficiency of developed in KSCQZD the PCR primer set for detection and identification of *Vibrio cholerae* in the investigation of suspected cholera cases.

**Material and methods.** 19 strains of *Vibrio cholerae* isolated from a variety of materials collected in the outbreak of cholera in the summer of 2015 in Kyzylorda were studied. There were used bacteriological, serological methods, phage typing, and polymerase chain reaction (PCR).

**Results and discussion.** The studied strains were identified as *V. cholerae* non O1 due to cultural, biochemical, immunological and phage specificity properties. Using of multiplex PCR with genus- and species-specific primers enabled to detect circulation of *Vibrio cholerae* of two serogroups: *V. cholerae* O1 Eltor and *V. cholerae* non O1.

**Conclusions.** Using of multiplex PCR increased the efficiency of the laboratory diagnosis scheme of cholera due to rapid identification and intraspecific differentiation of *Vibrio cholerae* strains; enabled to reveal circulation of two serogroups of *Vibrio cholerae* strains – *V. cholerae* O1 Eltors with atypical properties and *V. cholerae* non O1.

**Key words:** multiplex PCR, primers, non-epidemic cholera, patient, *Vibrio cholerae*, serogroup.

Для ссылки: Абдрасилова А.А., Касенова А.К., Матжанова А.М., Мусагалиева Р.С., Курманов Б.К., Жунусова А.С., Бахтыбекқызы Ш., Мукашев Н.К., Кабышева Н.П., Сағиев З.А., Кульбаева М.М. Применение метода полимеразной цепной реакции при расследовании случаев острой кишечной инфекции, вызванных штаммами холерного вибриона, в Кызылорде в 2015 году // *Medicine (Almaty)*. – 2016. – No 12 (174). – P. 74-79

Статья поступила в редакцию 23.11.2016 г.

Статья принята в печать 12.12.2016 г.