

КОНСТРУИРОВАНИЕ ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ГЕННОЙ ДИАГНОСТИКИ РИККЕТСИОЗОВ

Есимсейт Д.Т. , Абделиев Б.З. , Касенова А.К., Абдирасилова А.А. , Туребеков Н.А. , Жумадилова З.Б. , Ковалева Г.Г. , Токмурзиева Г.Ж. , Рябушко Е.А. , Умарова С.К. , Рысбекова А.К. * 

ТОО «Национальный научный центр особо опасных инфекций им. М.Айкимбаева»

Автор для корреспонденции: *rysbeкова23@mail.ru

АБСТРАКТ

Для обеспечения биологической безопасности страны необходимо развитие приоритетных направлений биотехнологии, создание совершенных средств обнаружения патогенных биологических агентов. Бактерии рода *Rickettsia* – одна из наиболее распространенных по всему миру зоонозных патогенов, продолжает оставаться серьезной проблемой для здравоохранения. Одним из решений проблем, связанных с ситуацией по эффективности мониторинга риккетсиозов, является широкое внедрение в клиническую практику современных методов диагностики, основанных на методах амплификации нуклеиновых кислот (МАНК), в частности ПЦР. В работе приведены результаты испытаний экспериментальных серий наборов для детекции риккетсии.

Цель. Разработка и конструирование экспериментальных серий ПЦР тест-систем для детекции риккетсиозов, проведения контрольных испытаний для отработки оптимальных условий с целью достижения максимальной чувствительности и специфичности препарата.

Ключевые слова: риккетсиозы, ПЦР тест-система, праймеры, участки гена, молекулярно-генетический метод, аутохтонные случаи, генотип.

ВВЕДЕНИЕ

Риккетсиозы – группа острых инфекционных заболеваний, которые характеризуются лихорадкой 39,5–40°C, сильной головной болью, кожной сыпью. Большинство риккетсиозов – это природно-очаговые зоонозы, человек является «случайным звеном в цепи циркуляции возбудителя» (Рудаков, 2016). Эпидемический процесс является следствием активизации природных очагов инфекции, заражение людей происходит через укусы членистоногих (клещи, блохи, вши). Исключение составляет эпидемический сыпной тиф – антропоноз (переносчик – платяная вошь - *Pediculus humanus humanus*), вызываемый *Rickettsia prowazekii*, основным носителем которого является человек [1-5].

Бактерии рода *Rickettsia*, пожалуй, одна из наиболее распространенных по всему миру зоонозных патогенов. Рядом исследователей были изучены огромные массивы информации по заболеваемости риккетсиозами в течение прошлого века и двух десятилетий текущего столетия [3,6,7]. По результатам исследований кустарниковый тиф (цугугамуши, *scrub typhus*) угрожает одному миллиарду человек во всем мире и ежегодно вызывает заболевание у одного миллиона человек [5]. Было выявлено 66 133 случая заражения людей клещевыми пятнистыми лихорадками (SFGR) по всему миру, с большой пространственной вариацией на разных континентах. Риккетсиозам группы SFGR, вызванным видом *Rickettsia felis* подвержены 4,4 млрд. человек, *Rickettsia conorii* - 3,7 млрд. и *Rickettsia africae* - 3,6 млрд. человек [8].

Изменение климата меняет ареалы распространения животных, в том числе и носителей-переносчиков возбудителей риккетсиозов. Клещи, которые могут быть не только переносчиками, но и резервуарами риккетсий, могут переноситься перелетными птицами, а меняющиеся экологические условия потенциально могут содействовать выживанию клещей в новых регионах. Так, клещи, рода *Hyalomma* и *Amblyomma*, не аутохтонные для Европы и яв-

ляющиеся переносчиками *Rickettsia*, в том числе *Rickettsia africae*, *R. sibirica mongolotimonae*, *R. aeschlimannii*, уже встречаются в Европе. *Amblyomma* были обнаружены на Сардинии.

Хотя случаи африканской клещевой лихорадки (ATBF) в Европе диагностировали лишь у путешественников, исследователи предполагают аутохтонные случаи уже в ближайшие годы. Еще большему риску, чем Западная Европа, колонизации видами клещей-переносчиков и вместе с ними риккетсиями подвергаются страны, граничащие с азиатскими и африканскими ареалами, в том числе Казахстан и Азербайджан [8, 9].

Территория Казахстана является эндемичной по риккетсиозам группы клещевых пятнистых лихорадок (SFG). Заболеваемость колеблется от 0,4 до 1,8 на 100 тыс. населения, по данным Дмитровского с соавт. (2019), ежегодное количество случаев может превышать цифру 300 [10]. До настоящего времени эндемичными признаются Северо-Казахстанская, Павлодарская, Восточно-Казахстанская (сейчас разделена на ВКО и область Абай) и Кызылординская области, хотя представители рода *Rickettsia* выявлялись у людей и животных и в других регионах страны.

Первые случаи риккетсиоза у людей в Казахстане были выявлены в 1949-1951 гг. в Алматинской области, несколько позже - еще в пяти областях: Южно-Казахстанской, Западно-Казахстанской, Павлодарской, Северо-Казахстанской и Акмолинской (Бартошевич, 1952, Кереев, 1965 по [11]).

Исследования сывороток людей, подозрительных на заболевание риккетсиозами, клещей и грызунов иммунологическими методами, проведенные в 2013 г., выявили положительные результаты не только на эндемичных территориях (Кызылординской, Павлодарской областях, ВКО, СКО). В Жамбылской области 0,1% обследованных на риккетсиозы пациентов имели в крови специфические антитела, в г. Астане – 0,5%.

В Жамбылской области также были отмечены положи-

Таблица 1. Заболеваемость населения риккетсиозами в РК 2023 и январь-апрель 2024 гг

Наименование области	2023		январь-апрель 2024	
	абс.	пок.	абс.	пок.
Республика Казахстан	115	0,58	6	0,03
Кызылординская	79	9,34	5	0,58
Павлодарская	9	1,17	1	0,13
Северо-Казахстанская	17	3,17	-	-
Восточно-Казахстанская	5	0,68	-	-
Абайская	3	0,49	-	-
Акмолинская	2	0,25	-	-

тельные находки при исследовании клещей (2,7%), этот показатель оказался даже выше, чем на эндемичных территориях ВКО (0,1%) и СКО (0,9%). В Алматинской области выявлена инфицированность риккетсиями грызунов (4 %). [12]. В 2023 году из 115 случаев риккетсиозов (Таблица 1) 2 было зарегистрировано в Акмолинской области [13].

Как уже упоминалось выше, эпидемический процесс при риккетсиозах, являющихся природно-очаговыми зоонозами, является «лишь проекцией эпизоотической активности природных очагов» [2]. Большинство видов риккетсий сначала были выявлены у членистоногих, лишь позже - были идентифицированы у людей [14].

Наряду с эндемичными территориями в регионах, где никогда не была зарегистрирована заболеваемость риккетсиозами или случаи заражения людей риккетсиями не выявлялись десятилетиями, выявляется циркуляция патогенных видов *Rickettsia* в локальных популяциях клещей, блох и диких животных.

Возбудитель североазиатского клещевого риккетсиоза (*R. sibirica*) (Архангельский, 1961 по [11]), патогенные *Rickettsia raoultii* и *R. slovaca* обнаружены в Алматинской области [11, 17]. *Rickettsia raoultii* также была идентифицирована у клещей *Dermacentor spp.* и *Ixodes spp.* еще в трех областях: Кызылординской, Карагандинской и Восточно-Казахстанской [11, 17-19].

В Карагандинской области при генетическом исследовании *Rickettsia raoultii* в клещах *Dermacentor niveus* были идентифицированы генотипы *RpA4* и *DnS14*, в клещах *Dermacentor marginatus* – *R. raoultii* генотипа *RpA4*. В Восточно-Казахстанской области в клещах *D. marginatus* также была выявлена *R. raoultii* генотипа *RpA4*. Патогенная роль этих риккетсий пока не доказана. Однако, по наблюдениям *D. Raoult* (неопубликованные данные) у клеща, укусившего пациента с клинической картиной, идентичной картине пациента с инфекцией *R. slovaca*, был выявлен штамм *Rickettsia sp. RpA4* [18, 20].

На территории Алматинской области были выявлены две новые формы риккетсий: «*Candidatus R. yembekshikazakhstanensis*» и «генотип *R. talgarensis*». [11]. В этом же регионе у клещей *Haemaphysalis punctata* была обнаружена *Rickettsia aeschlimannii* [11, 17, 18].

Клинические признаки заражения *Rickettsia aeschlimannii* схожи с признаками средиземноморской пятнистой лихорадки, вызываемой *Rickettsia conorii*

[10, 21]. По данным Рудакова с соавт. (2003), клещи, собранные в западных, северных и центральных регионах Казахстана, инфицированы видами *R. conorii subsp. caspia*, *R. raoultii* и *R. aeschlimannii* [11, 19]. *R. conorii subsp. caspia* является возбудителем астраханской лихорадки, риккетсиоза группы пятнистой лихорадки, эндемичного для Астрахани (Россия, 1970 г.) [22].

В 2017 году *Rickettsia asebonensis* и *Rickettsia felis*/«*Candidatus Rickettsia senegalensis*» были обнаружены у блох, собранных в Алматинской области. Выявлена высокая распространенность *Rickettsia asebonensis* в местной популяции блох больших песчанок *Xenopsylla gerbilli*, что по мнению исследователей, является свидетельством эндемичности вида (Сансызбаев, Нурмаханов, 2017) [23, 24]. *Rickettsia felis* - патоген, вызывающий у людей кошачий блошиный сыпной тиф, также известный как переносимая блохами пятнистая лихорадка [25].

Все специалисты сходятся во мнении, что заболеваемость риккетсиозами во всем мире из-за трудностей диагностики, вероятно, сильно недооценена, и это - серьезная проблема в области здравоохранения. Сложность предварительной клинической диагностики в неспецифичности симптомов (устойчивая высокая температура, сильная головная боль, миалгия, артралгия, сыпь, воспаление регионарных лимфоузлов, недомогание), общих со многими лихорадочными заболеваниями со схожей эпидемиологией.

Риккетсии очень трудно выделить из образцов пациентов даже в специализированных лабораториях. Из-за привередливости микроорганизмов, культивирование этих бактерий затруднено и требует высокоспециализированных лабораторных условий, где специалисты владеют методами культивирования клеточных линий, необходимыми для их размножения *in vitro* [4, 6, 8, 26, 27, 28].

Поэтому в диагностике риккетсиозов особое значение имеют такие лабораторные методы анализа, как иммунологические, основанные на выявлении антигенов и антител, и молекулярно-генетические. Наиболее широко используются иммунологические методы, как более простые, доступные для большинства лабораторий: РПГА, РСК, ИФА (ELISA), МИФ (IFA). Непрямая иммунофлуоресценция (МИФ, IFA) часто в англоязычной литературе упоминается как золотой стандарт. Методы достаточно чувствительные, но много и проблем.

Основная проблема – ретроспективность анализов, направленных на выявление специфичных антител. При риккетсиозах иммуноглобулины IgG начинаются выра-

батываться через 4-10 дней, а при инфекции, вызванной *Rickettsia africae*, сероконверсия может быть отсрочена до 25 и более дней.

Идентификация вида риккетсий затрудняется из-за перекрестных реакций внутри групп *Rickettsia*. Определение *IgM*, как показателя острого процесса, проблематично в связи низкой специфичностью иммуноглобулинов этого класса, как результат – перекрестные реакции с антигенами протеев, легионелл и др. микробов, ложноположительный результат может быть и при наличии ревматоидного фактора (аутоантитела обычно класса *IgM*) при аутоиммунной активности.

Кроме того, при использовании методов в поисках антител необходима информация об эндемичности территории по риккетсиозам, должны быть определены пороговые значения титра антител (диагностические титры). Это объясняется возникновением фоновых титров антител на эндемичной территории, без учета которых можно получить ложноположительные результаты [5, 7, 28-31].

Зависимость от серологических тестов, полезных только на сравнительно поздних стадиях риккетсиозных инфекций, в течение длительного периода привела к недостаточной диагностике, как следствие к неадекватной терапии, к неполной документированности заболеваемости и смертности. Сейчас идет смена парадигмы лабораторной диагностики риккетсиозов, все чаще используется сочетание ИФА (ELISA) и генетических методов на основе амплификации нуклеиновых кислот (чаще ПЦР), направленных на раннее выявление инфекций.

Обнаружение и идентификация *Rickettsia spp.* в основном опирается на распознавание таких генов, как 16S рРНК (*rrs*), гены, кодирующие липопротеин 17 кДа (*htr*), цитратсинтазу (*gltA*), а также гены белков семейства автотранспортеров: протективных белков внешней мембраны *rOmpA* и *rOmpB* (*sca5*), двух представителей «поверхностных клеточных антигенов» (*sca - surface cell antigen*) - *sca4* и *sca1*. Наиболее широко используемые гены *gltA* и *ompB* присутствует во всех *Rickettsia spp.*, тогда как ген *ompA* специфичен для риккетсий группы клещевых пятнистых лихорадок (*SFG Rickettsiae*) за исключением некоторых видов, например, *Rickettsia helvetica* (Roux et al. 1996) [29, 32, 33-39].

На территории Казахстана лабораторная диагностика риккетсиозов опирается, в основном, на серологические методы, направленные на выявление антител лишь к определенным видам: РПГА (*Rickettsia prowazekii*), РСК (*R. sibirica*, *R. prowazekii*), ИФА (*IgG*, *IgM* к возбудителям иксодовых клещевых боррелиозов). Метод ПЦР используется лишь для выявления возбудителей лихорадки Ку и клещевого боррелиоза [12]. Нет направленного, обоснованного обследования пациентов с учетом полиэтиологичности риккетсиозов в стране.

Лабораторная диагностика лишь ретроспективная. Большинство случаев риккетсиозов, скорее всего, остаются недокументированными, как следствие – неадекватное лечение, возможная инвалидизация, возможность летального исхода. Дмитриевский А.М. с соавт. отмечает ряд субъективных проблем, отражающихся на эффективности мониторинга риккетсиозов: государственный эпид-

надзор существует только за сыпным тифом (серологические обследования лихорадящих больных), отсутствие полноценного контроля риккетсиозов даже на эндемичных территориях [10]. Одним из решений проблем, связанных с ситуацией по эффективности мониторинга риккетсиозов, точнее с отсутствием мониторинга, является широкое внедрение в клиническую практику современных методов диагностики, основанных на МАНК (методы амплификации нуклеиновых кислот), в частности ПЦР.

Целью данного исследования являлось конструирование экспериментальных серий ПЦР тест-систем для детекции риккетсиозов, проведения контрольных испытаний для отработки оптимальных условий с целью достижения максимальной чувствительности и специфичности препарата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы материалы научных публикаций из онлайн ресурсов Web of Science, Scopus, Web of PubMed, BMC, Medline, e-Library, Google Scholar, ProMed, WHO и др., база данных GeneBank NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) и материалы собственных исследований на основе действующих директивных документов, методических руководств и рекомендаций.

Для конструирования ПЦР тест-систем для детекции фрагментов ДНК возбудителей риккетсиозов проведен анализ нуклеотидных последовательностей гена цитратсинтазы риккетсий (*gltA*): *R. prowazekii* (cp004888), *R. sibirica* (JX945526), *R. asiatica* (aB297810). В международной базе данных GenBank были выбраны нуклеотидные последовательности маркерных генов риккетсий для анализа и конструирования праймеров и на их основе проведен дизайн специфических праймеров. Разработка праймеров осуществлялась с помощью программы PrimerQuest (<http://eu.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index>) при установке следующих параметров: длина ампликона выбиралась в пределах от 150 до 450 букв; длина праймера – в пределах 17–25 букв; CG-состав задавался в пределах 40–60 %; Tm - (59–65 °C); C или G на 3'-конце праймера. Остальные параметры PrimerQuest использовались по умолчанию. Из нескольких (до 6) пар праймеров, сгенерированных программой PrimerQuest, была выбрана одна пара после предварительной проверки на специфичность с помощью программного обеспечения «BLAST» предложенных вариантов. Компьютерная программа «MPprimer 1.4» была использована для подбора совместимости пар праймеров с разработанным зондом.

Далее проводили синтез праймеров на колонках объемом 50 нмоль производства компании Biosearch Technologies, Inc. (США), содержащих носитель в виде пористых стеклянных гранул (CPG - controlled pore glass) с прикрепленным к ним 3'-концевым нуклеотидом (амидитом). Синтез осуществлялся стандартным фосфоамидитным методом с применением автоматического синтезатора ДНК/РНК «Н6» (K&A Laborgeraete GbR, Германия). Для синтеза применялись фосфоамидиты производства компании Glen Research Corporation (США) и реагенты компании emp BIOTECH (Германия). Полученные праймеры, прикрепленные к носителю извлекались из коло-

нок и помещались в пробирки с завинчивающейся крышкой. В пробирку добавляли 750 мкл концентрированного раствора гидроксида аммония и инкубировали 2 часа при температуре 90 °С для освобождения праймеров от носителя. Далее проводилась гель-фильтрация полученных растворов праймеров на колонках Centri•Pure N10 (emp BIOTECH GmbH, Германия) для очистки продукта от побочных примесей. Очищенные водные растворы праймеров концентрировались с помощью прибора CentriVar (Labconco, США) до сухого состояния, а затем вновь растворялись в деионизированной воде до концентрации 100 мкМ. Концентрация раствора праймеров измерялась на приборе NanoDrop 2000С (Thermo Scientific, США). Зонд риккетсии содержит на 5'-конце флуорофор красителя FAM, а на 3'-конце гаситель флуоресценции BHQ1. Зонд внутреннего контроля GAPDH содержит на 5'-конце флуорофор красителя JOE, а на 3'-конце гаситель флуоресценции BHQ1.

Полимеразную цепную реакцию выполняли на амплификаторах Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), QuanStudio (Applied Biosystems, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При конструировании ПЦР тест-систем реального времени материалом для исследования служили отобранные и синтезированные праймеры и зонды к видоспецифическим маркерным участкам в геномах возбудителей риккетсиоза. Отобраны и синтезированы праймеры R17K-F2 и R17K-R для детекции маркерного гена (*gltA*) возбудителей риккетсиозов и к ним выбран и синтезирован зонд для ПЦР-РВ. Синтез олигонуклеотидов проведен стандартным фосфоамидитным методом с применением автоматического синтезатора ДНК/РНК «Н6» (K&A Laborgeraete

Таблица 2. Программа амплификации с праймерами R17K F/R для идентификации риккетсий

№	Этап	Температура	Время	Количество циклов
1	Предварительная денатурация	95°C	2 мин.	1
2	Денатурация	95°C	10 сек.	5
	Отжиг	60°C	45 сек.	
3	Денатурация	95°C	10 сек.	45
	Отжиг	60°C	45 сек. (детекция флуоресцентного сигнала Green)	

Таблица 3. Приготовление реакционной смеси для ПЦР-РВ для детекции риккетсиозов

Компоненты	Объем на 1 реакцию, мкл	Объем на N реакций, мкл
R17K-F	1,0	1,0 × N
R17K-R	1,0	1,0 × N
Зонд для ОТ-ПЦР-РВ	0,5	0,5 × N
Master Mix	5,0	5,0 × N
Деионизированная вода	12,5	12,5 × N
Объем исследуемой ДНК	5,0	-
Общий объем	25,0	-

GbR, Германия). Синтезированные праймеры были очищены от побочных примесей методом гель-фильтрации на колонках Centri•Pure N10 (emp BIOTECH GmbH, Германия), концентрированы с помощью прибора CentriVar (Labconco, США). Концентрация раствора праймеров, зондов и положительных контролей к ним измерялась на приборе NanoPhotometer® P-300 (Implen GmbH, Германия). Разработан положительный контроль на основе рекомбинантной плазмиды со вставкой специфического фрагмента целевого гена *gltA*.

Были проведены серии экспериментов по разработке параметров ПЦР с использованием отобранных специфических праймеров, а также по проверке их эффективности. Для проведения оптимизации оценивалась совместимость праймеров, зондов и разработанных положительных контролей. Были проведены лабораторные испытания специфичности и чувствительности опытных образцов ПЦР тест-систем для диагностики риккетсиозов. Полимеразную цепную реакцию выполняли на амплификаторах Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), QuanStudio (Applied Biosystems, США) с использованием канала Green для детекции флуоресценции. Оптимальные параметры амплификации (концентрации компонентов реакционной смеси, температура отжига праймеров, количество циклов амплификации и т.д.) подбирались эмпирическим путем.

При проверке эффективности праймеров задавали стандартные параметры термоциклирования, которые были оптимизированы в ходе серии опытов. На этапе предварительной денатурации (расплетение двойной спирали ДНК). Денатурация этапа циклирования для фрагментов проводится не более 10 сек при 95°C. Температура отжига обычно варьируется от 60°C. Экспериментально были подобраны оптимальные условия ПЦР с отобран-

ными праймерами и зондами (Таблица 2). Пороговым (после которого результат амплификации не учитывается) был определен 40-й цикл ($Ct \leq 40$). Амплификация проводилась в объеме 25 мкл. Оптимизированный состав реакционной смеси приведен в таблице 3.

В соответствии протоколом время проведения ПЦР составляет около 1 часа. Общее время анализа с учетом этапа подготовки проб зависит от количества исследуемых образцов, подготовленности кадров, не должно превышать 2-2,5 часов. ДНК из использованных в экспериментах образцов выделяли с помощью «Комплекта реагентов для экстракции РНК/ДНК из клинического материала «АмплиПрайм РНК-сорб-В»» (производитель ООО «Некст-Био», Россия), QIAamp RNA/DNA Mini Kit (QIAGEN, Promega, США). Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрическим методом на спектрофотометре NanoDrop 1000. Для определения чувствительности ПЦР с отобранными праймерами R17K F/R предварительно было проведено серия десятикратных разведений разработанного положительного плазмидного контроля для выявления ДНК риккетсий с получением концентраций от 100 pg до 100 ag:

Исходная концентрация: 1 ng/ μ L

Разведение 1:10 (10 раз) для получения конечной концентрации 100 pg/ μ L.

Разведение 1:10 (10 раз) для получения конечной концентрации 10 pg/ μ L.

Разведение 1:10 (10 раз) для получения конечной кон-

центрации 1 pg/ μ L.

Разведение 1:10 (10 раз) для получения конечной концентрации 100 fg/ μ L.

Разведение 1:10 (10 раз) для получения конечной концентрации 10 fg/ μ L.

Разведение 1:10 (10 раз) для получения конечной концентрации 1 fg/ μ L.

Разведение 1:10 (10 раз) для получения конечной концентрации 100 ag/ μ L.

Результаты ПЦР РВ по определению чувствительности праймеров для выявления возбудителей риккетсиозов представлены на рисунке 1 и в таблице 4.

По результатам ПЦР, опытный образец тест-системы для детекции риккетсий выявляет ДНК в концентрации 10 fg, что является достаточным уровнем чувствительности для диагностики риккетсиозов.

Была проведена серия экспериментов с целью оценки специфичности и чувствительности ПЦР тест-системы для диагностики риккетсиозов. Специфичность была проверена в ПЦР с использованием образца ДНК *Rickettsia* и нецелевых видов *Francisella tularensis*, *B. mellitensis* и *P. vulgaris*. Результаты представлены на рисунке 2 и в таблице 5.

Согласно рисунку 2 и таблице 5 отобранные праймеры для детекции возбудителей риккетсиозов выявляли лишь целевые последовательности, реакции с ДНК *Francisella tularensis*, *B. mellitensis* и *P. Vulgaris* давали отрицательные

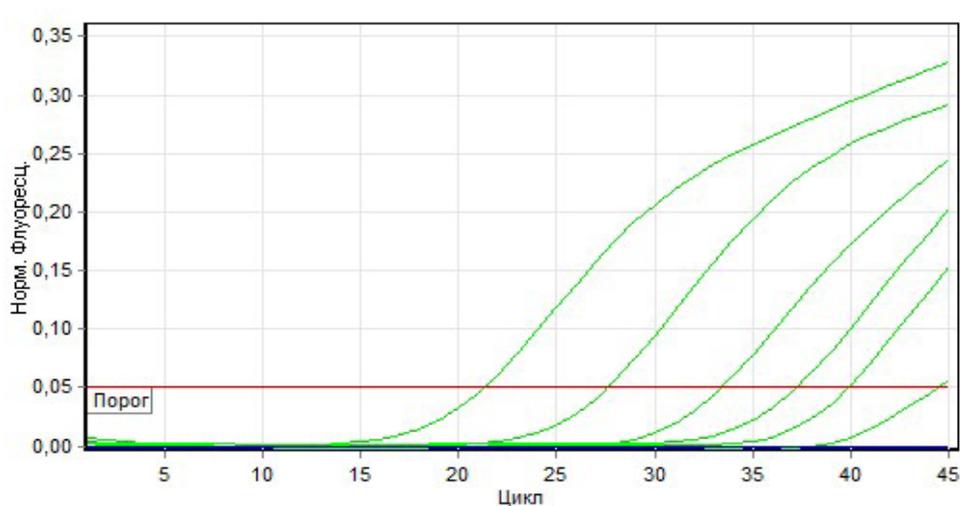


Рисунок 1. Кривые амплификации маркерного локуса плазмидного положительного котнтроля риккетсий *gltA*: результаты контроля чувствительности ПЦР РВ с праймерами R17K F/R

Таблица 4. Результаты контроля чувствительности ПЦР РВ с праймерами R17K F/R

Имя	Тип	СТ	Сред. Ст
100pg	Отрицательный. контроль	21,31	21,31
10pg	Образец	27,62	27,62
1pg	Образец	33,43	33,43
100fg	Образец	37,21	37,21
10fg	Образец	39,88	39,88
1fg	Образец	44,43	44,43
100ag	Образец	Отриц.	Отриц.
К-	Отрицательный контроль	Отриц.	Отриц.

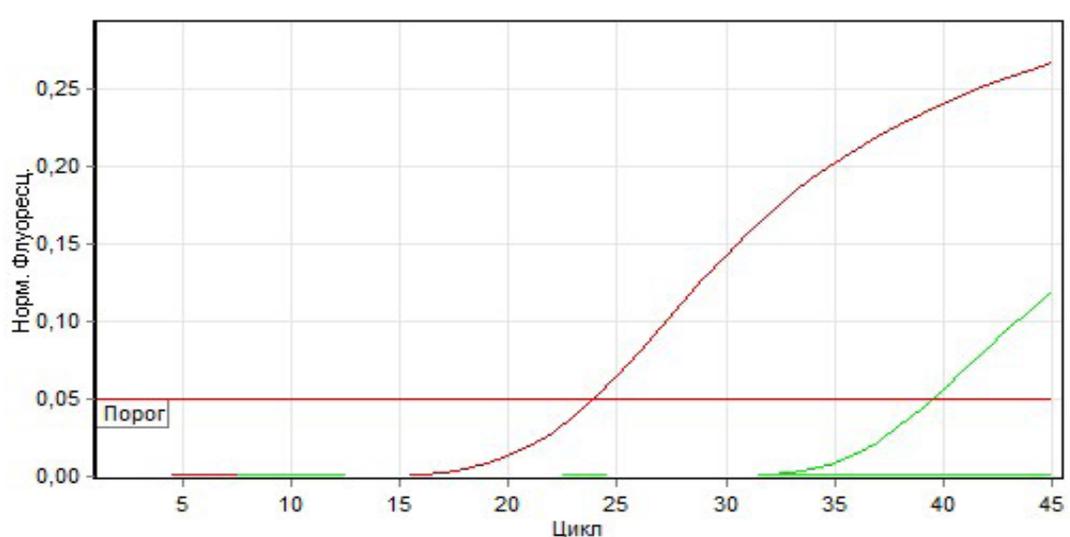


Рисунок 2. Кривые амплификации маркерного локуса ДНК риккетсий *gltA*: красная линия – амплификация плазмидного контроля, зеленая линия – ДНК риккетсий

Таблица 5. Оценка специфичности результатов ПЦР РВ с тест-системой для выявления ДНК риккетсий

Имя	Тип	СТ	Сред. Ст
ДНК <i>Rickettsia</i>	Образец	39,46	39,46
ДНК <i>Francisella tularensis</i>	Образец	Отриц.	Отриц.
ДНК <i>B. mellitensis</i>	Образец	Отриц.	Отриц.
ДНК <i>P. vulgaris</i>	Образец	Отриц.	Отриц.
К-	Отрицательный контроль	Отриц.	Отриц.
К+	Положительный контроль	23,88	23,88

Таблица 6. Компоненты ПЦР тест-системы для детекции гена *gltA* риккетсиозов

Компонент	Объем в мкл	Назначение
Primer «R17K-F» (forward)	100	Детекция видоспецифического гена <i>gltA</i>
Primer «R17K-R» (reverse)	100	
Probe «R17K-P»	50	Детекция видоспецифического гена <i>gltA</i>
5x qPCR Mastermix	500	Содержит ДНК-полимеразу, MgCl ₂ , дНТФ и др. реагенты
Деионизированная вода	1000	Растворитель
Положительный контроль (ПК)	100	Содержит pDNA риккетсиозов
Отрицательный контроль (ОК)	100	Деионизированная вода

Таблица 7. Результаты ПЦР с экспериментальным набором «Rickettsia qPCR» для выявления генов возбудителей риккетсии.

Образцы	Ген	№	«Rickettsia qPCR»
			FAM/Green (СТ)
ОКО		1	Отрицательный
Образец		2	35,56
Образец		3	35,32
К-		4	Отрицательный
К+		5	18,05

Информация о тесте

Название Теста	Тест 2024-08-07 (Тест-система qPCR Rickettsia)
Начало Теста	07.08.2024 14:59:43
Тест Закончен	07.08.2024 16:52:10
Оператор	Думан
Замечания	
Тест. выполнен программой версии	Rotor-Gene 1.8.17.5
Подпись Теста	Подпись Теста правильна.
Уровень сигнала Green	5,
Уровень сигнала Yellow	5,

Профиль

Цикл	Параметры
Удерж. темп-ры @ 50°c, 5 мин. 0 сек.	
Удерж. темп-ры 2 @ 95°c, 5 мин. 0 сек.	
Сycling (10 повторов)	Step 1 @ 95°c, Удерж. темп-ры 10 сек.
	Step 2 @ 60°c, Удерж. темп-ры 20 сек.
	Step 3 @ 72°c, Удерж. темп-ры 10 сек.
Сycling 2 (40 повторов)	Step 1 @ 95°c, Удерж. темп-ры 20 сек.
	Step 2 @ 60°c, Удерж. темп-ры 40 сек., Детекция в Циклирование A([Green][1][1],[Yellow][2][2])
	Step 3 @ 72°c, Удерж. темп-ры 20 сек.

Параметры количеств. анализа

Порог	0,030
Исключить циклы до	1,000
Станд. кривая импортирована	Нет
График станд. (1)	N/A
График станд. (2)	N/A
Начать нормализацию с цикла	1
Корректировка уклона	Да
Порог Фона (NTC)	5%
Порог Эффективности Реакции	0%
Метод нормализации	Динамич. фон нормализация
Цифровой Фильтр	Легкий
Страница образцов	Стр. 1
Импортированные Установки анализа	

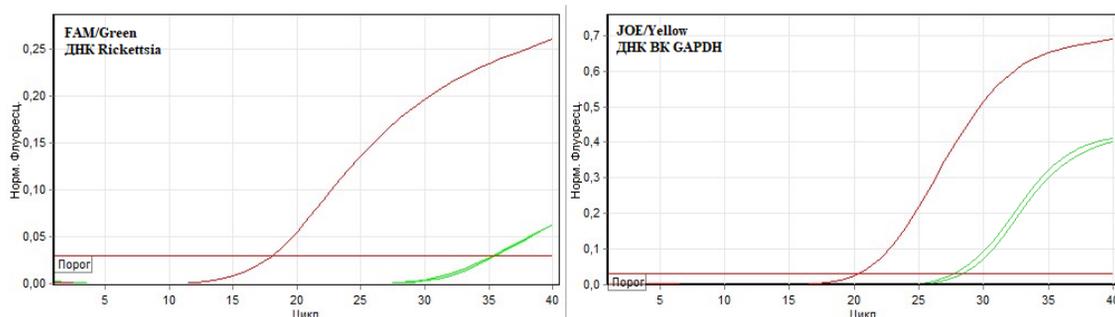


Рисунок 3. Результаты проверки разработанной ПЦР тест-системы.

результаты. Таким образом, была создана эффективная, специфичная с хорошей чувствительностью тест-система для выявления ДНК риккетсий. В таблице 6 представлены компоненты ПЦР тест-систем для выявления риккетсиозов.

Разработанная тест-система была апробирована на двух пробах суспензий клещей, предварительное исследование которых коммерческими тест-системами дало положительный результат. Разработанная ПЦР тест-система выявил ДНК риккетсий в двух пробах суспензий клещей. Результаты представлены на рисунке 3 и в таблице 7.

Как видно из рисунка 3, разработанная ПЦР тест-система выявляет ДНК риккетсиозов в образцах суспензии клещей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сконструирована эффективная тест-система для детекции и идентификации ДНК штаммов возбудителя риккетсиозов методом ПЦР в реальном времени. По результатам ПЦР, тест-система для детекции риккетсий выявляет ДНК в концентрации 10 fg, что является достаточным уровнем чувствительности для диагностики риккетсиозов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа была выполнена в рамках НТП «Совершенствование мер обеспечения биологической безопасности в Казахстане: противодействие опасным и особо опасным инфекциям» на 2023-2025 гг., ИРН BR218004/0223.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тарасевич И.В. Современные представления о риккетсиозах // Клиническая микробиология, антимикробная химиотерапия. – 2005. – Т. 7, № 2. – С. 119-129. URL: <https://cmac-journal.ru/en/publication/2005/2/>.
2. Рудаков Н.В. Клещевые трансмиссивные инфекции человека : учебное пособие / Н.В. Рудаков, Р.А. Егембердиева, А.К. Дуйсенова, Л.Б. Сейдулаева. – Омск: ИЦ «Омский научный вестник», 2016. – 192 с. – 500 экз. – С. 181–184. - ISBN 978-5-91306-080-8. URL: <http://oniipi.org/wp-content/uploads/2020/08/>.
3. Seidi S. Distribution of different Rickettsia species in countries of the WHO Eastern Mediterranean (WHO-EMRO) region: An overview / S. Seidi, A.H. Omid, S. Esmaeili // Travel Med Infect Dis. – 2024. – Vol. 58. – P. 102695. doi: 10.1016/j.tmaid.2024.102695.
4. Petri W.A. Overview of Rickettsial and Related Infections // MSD Manual professional version. Reviewed/Revised Jan 2024. URL: <https://www.msdmanuals.com/profes>

sional/infectious-diseases/rickettsiae-and-related-organisms/overview-of-rickettsial-and-related-infections

5. Xu G. A review of the global epidemiology of scrub typhus // *PLoS Negl Trop Dis.* – 2017. – Vol. 11(11). – P. e0006062. doi: 10.1371/journal.pntd.0006062.

6. Kelly D.J. et al. The Past and Present Threat of Rickettsial Diseases to Military Medicine and International Public Health // *Clinical Infectious Diseases.* – 2002. – Vol. 34, Issue 4. – P. 145-169. URL: <https://doi.org/10.1086/339908>.

7. Krishnamoorthi S. et al. Review of Rickettsial Diseases Other Than Scrub Typhus in India // *Trop Med Infect Dis.* – 2023. – Vol. 8(5). – P.280. doi: 10.3390/tropicalmed8050280.

8. Zhang Y.Y. et al. Mapping the global distribution of spotted fever group rickettsiae: a systematic review with modelling analysis // *Lancet Digit Health.* – 2023. – Vol. 5(1). – P. e5-e15. doi: 10.1016/S2589-7500(22)00212-6.

9. Guccione C. et al. Rickettsiales in the WHO European Region: an update from a One Health perspective // *Parasites Vectors.* – 2023. – Vol. 16. – P.41. URL: <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05646-4>.

10. Дмитровский А.М., Егембердиева Р.А. и др. Современные проблемы эпидемиологического надзора за риккетсиозами в Казахстане // *Вестник КазНМУ.* – 2019. – №3. – С. 54-57. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/sovremennye-problemy-epidemiologicheskogo-nadzora-za-rikketsiozami-v-kazahstane> (дата обращения: 04.08.2024).

11. Turebekov N. et al. Prevalence of Rickettsia species in ticks including identification of unknown species in two regions in Kazakhstan // *Parasit Vectors.* – 2019. – Vol. 12(1). – P.197. doi: 10.1186/s13071-019-3440-9.

12. Омашева Г.М. Диагностика риккетсиозов в Казахстане // *Национальные приоритеты России.* – 2014. – №3 (13). – С. 24-26. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/diagnostika-rikketsiozov-v-kazahstane> (дата обращения: 11.08.2024).

13. Форма отчетной документации в области здравоохранения «Отчет об отдельных инфекционных и паразитарных заболеваниях» НПЦ СЭЭМ НЦОЗ МЗ РК согласно Приложения 1 к приказу МЗ РК от 22 декабря 2020 года №ҚР ДСМ-313/2020, 2024.

14. Merhej V. et al. Genotyping, evolution and epidemiological findings of Rickettsia species // *Infect Genet Evol.* – 2014. – Vol. 25. – P. 122-137. doi: 10.1016/j.meegid.2014.03.014.

15. Raoult D. et al. A new tick-transmitted disease due to Rickettsia slovaca // *Lancet.* – 1997. – 350(9071). – P. 112-113. doi: 10.1016/S0140-6736(05)61814-4.

16. Егембердиева Р.А. и др. Нозологическая структура и распространение клещевых инфекций в Казахстане // *Национальные приоритеты России.* – 2016. – №4 (22). – С. 30-33. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/nozologicheskaya-struktura-i-rasprostranenie-kleschevyh-infektsiy-v-kazahstane> (дата обращения: 04.08.2024).

17. Шпынов С.Н. и др. Генотипирование риккетсий пятнистого клеща, обнаруженных в России и Казахстане // *Мед Парзитол (Москва).* – 2003. – Т. (3). – P.20–4. (Россия). URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14564838/>.

18. Shpynov S. et al. Detection of a rickettsia closely related to Rickettsia aeschlimannii, «Rickettsia heilongjiangensis», Rickettsia sp. strain RpA4, and Ehrlichia muris in ticks collected in Russia and Kazakhstan // *J Clin Microbiol.* – 2004. – Vol. 42(5). – P. 2221-2223. doi: 10.1128/JCM.42.5.2221-2223.2004.

19. Егембердиева Р.А. и др. Астраханская пятнистая лихорадка в Казахстане // *Журнал Инфектологии. Приложение.* – СПб.: 2017. – Т.9., №3S. – С. 28-29. URL: <https://journal.niidi.ru/jofin/issue/archive?issuesPage=2#issues>.

20. Самойленко И.Е. и др. Выявление генотипов Rickettsia raoultii в Южном Казахстане // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* – 2016. – № 5 (90). – С. 43-45. URL: <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2016-15-5-43-45>.

21. Bitam I. First detection of Rickettsia aeschlimannii in Hyalomma aegyptium from Algeria / I. Bitam, T. Kernif, Z. Harrat et al. // *Clin Microbiol Infect.* – 2009. – Vol. 15, Issue s2. – P. 253-254. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.02274.x.

22. Sentausa E. et al. Genome sequence of Rickettsia conorii subsp. caspia, the agent of Astrakhan fever // *J Bacteriol.* – 2012. – 194(17). – P. 4763-4764. doi: 10.1128/JB.00992-12.

23. Hay J. et al. Biosurveillance in Central Asia: Successes and Challenges of Tick-Borne Disease Research in Kazakhstan and Kyrgyzstan // *Front Public Health.* – 2016. – Vol. 4. – 4 p. doi: 10.3389/fpubh.2016.00004.

24. Sansyzybayev Y. et al. Survey for Rickettsiae Within Fleas of Great Gerbils, Almaty Oblast, Kazakhstan // *Vector Borne Zoonotic Dis.* – 2017. – Vol. 17(3). – P. 172-178. doi: 10.1089/vbz.2016.2049.

25. Mediannikov O. et al. Candidatus 'Rickettsia senegalensis' in cat fleas in Senegal // *New Microbes New Infect.* – 2014. – Vol. 3. – P. 24-28. doi: 10.1016/j.nmni.2014.10.005.

26. Карташов М.Ю. и др. Высокоэффективная детекция ДНК риккетсий методом ПЦР в реальном времени // *Клиническая лабораторная диагностика.* – 2015. – Т.60, №12. – С. 39-43. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/vysokoeffektivnaya-detektsiya-dnk-rikketsiy-metodom-ptsr-v-realnom-vremeni> (дата обращения: 04.08.2024).

27. Adem P.V. Emerging and re-emerging rickettsial infections // *Seminars in Diagnostic Pathology.* – 2019. – Vol. 36 (3). – P. 146-151. URL: <https://doi.org/10.1053/j.semdp.2019.04.005>.

28. Reller M.E. et al. Optimization and Evaluation of a Multiplex Quantitative PCR Assay for Detection of Nucleic Acids in Human Blood Samples from Patients with Spotted Fever Rickettsiosis, Typhus Rickettsiosis, Scrub Typhus, Monocytic Ehrlichiosis, and Granulocytic Anaplasmosis // *J Clin Microbiol.* – 2020. – Vol. 58(9). – P. e01802-19. doi: 10.1128/JCM.01802-19.

29. Portillo A. et al. Guidelines for the Detection of Rickettsia spp. // *Vector borne and zoonotic diseases, vector borne and zoonotic diseases.* – Vol. 17 (1). – P. 23-32. DOI: 10.1089/vbz.2016.1966.

30. Paris D.H. et al. State of the art of diagnosis of rickettsial diseases: the use of blood specimens for diagnosis of scrub typhus, spotted fever group rickettsiosis, and murine typhus // *Curr Opin Infect Dis.* – 2016. – Vol. 29(5). – P. 433-439. doi: 10.1097/QCO.0000000000000298.

31. Еремеева М.Е.и др. Современные подходы к лабораторной диагностике риккетсиозов // Инфекция и иммунитет. – 2014. – Т. 4, №2. – С. 113-134. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/sovremennye-podhody-k-laboratornoy-diagnostike-rikketsiozov> (дата обращения: 12.08.2024).
32. Ghavami M.B. et al. Emergent spotted fever group rickettsiae infections among hard ticks in Islamic Republic of Iran // *East Mediterr Health J.* – 2024. – Vol. 30(2). – P. 145–155. URL: <https://doi.org/10.26719/emhj.24.030>.
33. Ngwamidiba M. et al. Phylogenetic study of Rickettsia species using sequences of the autotransporter protein-encoding gene sca2 // *Ann N Y Acad Sci.* – 2005. – Vol. 1063. – P. 94-9. doi: 10.1196/annals.1355.015.
34. Ngwamidiba M. et al. Sca1, a previously undescribed paralog from autotransporter protein-encoding genes in Rickettsia species // *BMC Microbiol.* - 2006. – Vol. 6. – P.12. doi: 10.1186/1471-2180-6-12.
35. Prakash J.A. et al. Assessment of a quantitative multiplex 5' nuclease real-time PCR for spotted fever and typhus group rickettsioses and Orientia tsutsugamushi // *Clin Microbiol Infect.* – 2009. – Vol. 15, Suppl 2. – P. 292-3. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.02242.x.
36. Fournier P.E. et al. Phylogenetic analysis of spotted fever group rickettsiae by study of the outer surface protein rOmpA // *Int J Syst Bacteriol.* - 1998. – Vol. 48, № 3. – P. 839-49. doi: 10.1099/00207713-48-3-839.
37. Vitorino L. et al. Characterization of a tandem repeat polymorphism in Rickettsia strains // *J. Med. Microbiol.* – 2005. – Vol. 54. – P. 833–841. URL: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45956-0>.
38. Woelfel R. et al. Diagnostics of tick-borne rickettsioses in Germany: a modern concept for a neglected disease // *Int J Med Microbiol.* – 2008. – Vol. 298. – P.368–374. doi: 10.1016/j.ijmm.2007.11.009.
39. Roux V. et al. Phylogenetic analysis of members of the genus Rickettsia using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (ompB) // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2000. – Vol. 50, №4. – P. 1449-1455. doi: 10.1099/00207713-50-4-1449.

REFERENCES

1. Tarasevich I.V. Sovremennye predstavleniya o rickettsiozah // *Klinicheskaya mikrobiologiya, antimikrobnaya himioterapiya.* – 2005. – Vol. 7, № 2. – P.119 –129. URL: <https://cmac-journal.ru/en/publication/2005/2/>.
2. Rudakov N.V. Kleshcheshchevye transmissivnye infekcii cheloveka : uchebnoe posobie / Rudakov, N.V., Yegemberdiyeva, R.A., Duisenova, A.K., Seidulayeva, L.B.. – Omsk: IC “Omsk Scientific Bulletin”, 2016. – 192 p. – P. 181–184. – ISBN 978-5-91306-080-8. URL: <http://oniipi.org/wp-content/uploads/2020/08/>.
3. Seidi S. et al. Distribution of different Rickettsia species in countries of the WHO Eastern Mediterranean (WHO-EMRO) region: An overview maecili // *Travel Med Infect Dis.* – 2024. – 58:102695. doi: 10.1016/j.tmaid.2024.102695.
4. Petri W.A. Overview of Rickettsial and Related Infections // *MSD Manual professional version.* Reviewed/Revised Jan 2024. URL: <https://www.msdmanuals.com/professional/infectious-diseases/rickettsiae-and-related-organisms/overview-of-rickettsial-and-related-infections>
5. Xu G. et al. A review of the global epidemiology of scrub typhus // *PLoS Negl Trop Dis.* – 2017. – 11(11):e0006062. doi: 10.1371/journal.pntd.0006062.
6. Kelly D.J. et al. The Past and Present Threat of Rickettsial Diseases to Military Medicine and International Public Health // *Clinical Infectious Diseases.* – 2002. – Vol. 34. – Issue Supplement_4. – P. S145–S169. URL: <https://doi.org/10.1086/339908>.
7. Krishnamoorthi S. et al. Review of Rickettsial Diseases Other Than Scrub Typhus in India // *Trop Med Infect Dis.* – 2023. – Vol. 8(5). – P. 280. doi: 10.3390/tropicalmed8050280.
8. Zhang Y.Y. et al. Mapping the global distribution of spotted fever group rickettsiae: a systematic review with modelling analysis // *Lancet Digit Health.* – 2023. – Vol.5(1). – P. e5– e15. doi: 10.1016/S2589-7500(22)00212-6.
9. Guccione C. et al. Rickettsiales in the WHO European Region: an update from a One Health perspective // *Parasites Vectors.* – 2023. – Vol.16. – P.41. URL: <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05646-4>.
10. Dmitrovskiy A.M. et al. Sovremennye problemy epidemiologicheskogo nadzora za rickettsiozami v Kazahstane // *Vestnik KazNMU.* – 2019. – № 3. – P. 54-57. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/sovremennye-problemy-epidemiologicheskogo-nadzora-za-rikketsiozami-v-kazahstane> (date of access: 08/04/2024).
11. Turebekov N. et al. Prevalence of Rickettsia species in ticks including identification of unknown species in two regions in Kazakhstan // *Parasit Vectors.* – 2019. – Vol.12(1). –197 p. doi: 10.1186/s13071-019-3440-9.
12. Omasheva G.M. Diagnostika rickettsiozov v Kazahstane // *Nacional'nye priority Rossii.* – 2014. – № 3 (13). – P. 24–26. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/diagnostika-rikketsiozov-v-kazahstane> (date of access: 11.08.2024).
13. Forma otchetnoj dokumentacii v oblasti zdavoohraneniya «Otchet ob otdel'nyh infekcionnyh i parazitarnyh zabollevaniyah» NPC SEEM NCOZ MZ RK soglasno Prilozheniya 1 k prikazu MZ RK ot 22 dekabrya 2020 goda №KQR DSM-313/2020, 2024.
14. Merhej V. et al. Genotyping, evolution and epidemiological findings of Rickettsia species // *Infect Genet Evol.* – 2014. – Vol. 25. – P. 122–137. doi: 10.1016/j.meegid.2014.03.014.
15. Raoult D. et al. A new tick-transmitted disease due to Rickettsia slovaca // *Lancet.* – 1997. – 350(9071). – P. 112–113. doi: 10.1016/S0140-6736(05)61814-4.
16. Egemberdieva R.A. i dr. Nozologicheskaya struktura i rasprostranenie kleshchevyh infekcij v Kazahstane // *Nacional'nye priority Rossii.* – 2016. – №4 (22). – P. 30–33. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/nozologicheskaya-struktura-i-rasprostranenie-kleshchevyh-infektsiy-v-kazahstane> (date of access: 04.08.2024).
17. SHpynov S.N. i dr. Genotipirovanie rickettsij pyatnistogo kleshcha, obnaruzhennyh v Rossii i Kazahstane // *Med Parazitol (Moskva)* – 2003. – Vol.3. – P.20-4. (Russian). URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14564838/>.

18. Shpynov S. et al. Detection of a rickettsia closely related to *Rickettsia aeschlimannii*, «*Rickettsia heilongjiangensis*,» *Rickettsia* sp. strain RpA4, and *Ehrlichia muris* in ticks collected in Russia and Kazakhstan // *J Clin Microbiol.* – 2004. – Vol. 42(5). – P. 2221–2223. doi: 10.1128/JCM.42.5.2221-2223.2004.
19. Egemberdieva R.A. i dr. Astrahanskaya pyatnistaya lihoradka v Kazahstane // *ZHurnal Infektologii. Prilozhnie.* – SPb.: 2017. – Vol. 9., № 3S. – P. 28–29. URL: <https://journal.niidi.ru/jofin/issue/archive?issuesPage=2#issues>.
20. Samojlenko I.E. i dr. Vyyavlenie genotipov *Rickettsia raoultii* v YUzhnom Kazahstane // *Epidemiologiya i vakcinoprofilaktika.* – 2016. – Vol.15(5). – P.43-45. (In Russ.) <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2016-15-5-43-45>
21. Bitam I. et al. First detection of *Rickettsia aeschlimannii* in *Hyalomma aegyptium* from Algeria // *Clin Microbiol Infect.* – 2009. – Vol. 15, Issue s2. – P. 253–254. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.02274.x.
22. Sentausa E. et al. Genome sequence of *Rickettsia conorii* subsp. *caspia*, the agent of Astrakhan fever // *J Bacteriol.* – 2012. – 194(17). – P. 4763–4764. doi: 10.1128/JB.00992-12.
23. Hay J. et al. Biosurveillance in Central Asia: Successes and Challenges of Tick-Borne Disease Research in Kazakhstan and Kyrgyzstan // *Front Public Health.* – 2016. – Vol. 4. – P.4. doi: 10.3389/fpubh.2016.00004.
24. Sansyzybayev Y. et al. Survey for *Rickettsiae* Within Fleas of Great Gerbils, Almaty Oblast, Kazakhstan // *Vector Borne Zoonotic Dis.* – 2017. – Vol. 17(3). – P. 172–178. doi: 10.1089/vbz.2016.2049.
25. Mediannikov O. et al. Candidatus ‘*Rickettsia senegalensis*’ in cat fleas in Senegal // *New Microbes New Infect.* – 2014. – Vol. 3. – P. 24–28. doi: 10.1016/j.nmni.2014.10.005.
26. Kartashov M.YU. i dr. Vysokoeffektivnaya detekciya DNK rickettsij metodom PCR v real’nom vremeni // *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* – 2015. – Vol. 60, № 12. – P. 39–43. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/vysokoeffektivnaya-detektsiya-dnk-rickettsiy-metodom-ptsr-v-real-nom-vremeni> (date of access: 04.08.2024).
27. Adem P.V. Emerging and re-emerging rickettsial infections // *Seminars in Diagnostic Pathology.* – 2019. – Vol. 36 (3). – P. 146–151. URL: <https://doi.org/10.1053/j.semdp.2019.04.005>.
28. Reller M.E. et al. Optimization and Evaluation of a Multiplex Quantitative PCR Assay for Detection of Nucleic Acids in Human Blood Samples from Patients with Spotted Fever Rickettsiosis, Typhus Rickettsiosis, Scrub Typhus, Monocytic Ehrlichiosis, and Granulocytic Anaplasmosis // *J Clin Microbiol.* – 2020. – Vol. 58(9). – P.e01802-19. doi: 10.1128/JCM.01802-19.
29. Portillo A. et al. Guidelines for the Detection of *Rickettsia* spp. // *Vector borne and zoonotic diseases, vector borne and zoonotic diseases.* – Vol. 17 (1). – P. 23–32. DOI: 10.1089/vbz.2016.1966.
30. Paris D.H. et al. State of the art of diagnosis of rickettsial diseases: the use of blood specimens for diagnosis of scrub typhus, spotted fever group rickettsiosis, and murine typhus // *Curr Opin Infect Dis.* – 2016. – Vol. 29(5). – P. 433–439. doi: 10.1097/QCO.000000000000298.
31. Eremeeva M.E. i dr. Sovremennye podhody k laboratornoj diagnostike rickettsiozov // *Infekciya i immunitet.* – 2014. – Vol. 4, №. 2. – P. 113–134. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/sovremennye-podhody-k-laboratornoy-diagnostike-rickettsiozov> (date of access: 08/12/2024).
32. Ghavami M.B. et al. Emergent spotted fever group rickettsiae infections among hard ticks in Islamic Republic of Iran // *East Mediterr Health J.* – 2024. – Vol. 30(2). – P. 145–155. URL: <https://doi.org/10.26719/emhj.24.030>.
33. Ngwamidiba M. et al. Phylogenetic study of *Rickettsia* species using sequences of the autotransporter protein-encoding gene *sca2* // *Ann N Y Acad Sci.* – 2005. – Vol.1063. – P. 94-9. doi: 10.1196/annals.1355.015.
34. Ngwamidiba M. et al. *Sca1*, a previously undescribed paralog from autotransporter protein-encoding genes in *Rickettsia* species // *BMC Microbiol.* - 2006. – Vol. 6. – 12 p. doi: 10.1186/1471-2180-6-12.
35. Prakash J.A. et al. Assessment of a quantitative multiplex 5’ nuclease real-time PCR for spotted fever and typhus group rickettsioses and *Orientia tsutsugamushi* // *Clin Microbiol Infect.* – 2009. – Vol. 15, Suppl 2. – P. 292-3. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.02242.x.
36. Fournier P.E., et al. Phylogenetic analysis of spotted fever group rickettsiae by study of the outer surface protein rOmpA // *Int J Syst Bacteriol.* – 1998. – Vol. 48, Pt 3. – P. 839-49. doi: 10.1099/00207713-48-3-839.
37. Vitorino L. Characterization of a tandem repeat polymorphism in *Rickettsia* strains / L. Vitorino, S.R. De, F. Baccellar et al. // *J. Med. Microbiol.* – 2005. – Vol. 54. – P. 833–841. URL: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45956-0>.
38. Woelfel R., et al. Diagnostics of tick-borne rickettsioses in Germany: a modern concept for a neglected disease // *Int J Med Microbiol.* – 2008. – Vol. 298. – P.368–374. doi: 10.1016/j.ijmm.2007.11.009.
39. Roux V., et al. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (*ompB*) // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2000. – Vol. 50, Pt 4. – P. 1449-1455. doi: 10.1099/00207713-50-4-1449.

ӘОК: 616.993

РИККЕТСИОЗДЫ ГЕНДІК ДИАГНОСТИКАЛАУҒА АРНАЛҒАН ПТР ТЕСТ ЖҮЙЕСІН ҚҰРУ

Есімсейт Д. Т., Абделиев Б. З., Қасенова А. Қ., Абдирасилова А. А., Туребеков Н.А., Жұмаділова З. Б., Ковалева Г. Г., Токмурзиева Г. Ж., Рябушко Е.А., Омарова С.К., Рысбекова А. К.

«М. Айкимбаев атындағы аса қауіпті инфекциялар ұлттық ғылыми орталығы». ЖШС
Корреспондент автор: *rysbekova23@mail.ru

ТҮЙІН

Елдің биологиялық қауіпсіздігін қамтамасыз ету үшін биотехнологияның басым бағыттарын дамыту, патогендік биологиялық агенттерді анықтаудың кемелдендірілген құралдарын жасау қажет. Әлемде ең кең тараған зооноздық қоздырғыштардың бірі болып табылатын Rickettsia тектес бактериялар - денсаулық сақтау ұйымдарының күрделі мәселесі болып қала береді. Риккетсиоздар мониторингінің тиімділігіне қатысты жағдайға байланысты проблемаларды шешудің бірі клиникалық практикаға нуклеин қышқылдарын күшейту әдістеріне негізделген диагностиканың заманауи әдістерін, атап айтқанда ПТР кеңінен енгізу болып табылады. Жұмыста риккетсияны анықтауға арналған эксперименттік жиынтықтар сериясының сынақ нәтижелері келтірілген.

Мақсаты. Препараттың максималды сезімталдығы мен ерекшелігіне қол жеткізу мақсатында оңтайлы жағдайларды пысықтау үшін риккетсиоздарды анықтауға, бақылау сынақтарын жүргізуге арналған ПТР тест-жүйелерінің эксперименттік серияларын әзірлеу және жобалау.

Кілттік сөздер: риккетсиоздар, ПТР тест жүйесі, праймерлер, ген аймақтары, молекулалық-генетикалық әдіс, автотонды жағдайлар, генотип.

UDC: 616.993

DESIGNING A PCR TEST SYSTEM FOR THE GENETIC DIAGNOSIS OF RICKETTSIOSES

Yessimseit D.T., Abdeliyev B.Z., Kassenova A.K., Abdirassilova A.A., Turebekov N.A., Zhumadilova Z.B., Kovaleva G.G., Tokmurziyeva G.Zh., Ryabushko E.A., Umarova S.K., Rysbekova A.K.

«National Scientific Center of Especially Dangerous Infections named after M.Aikimbayev»
Corresponding author: *rysbekova23@mail.ru

ANNOTATION

To ensure the biological safety of the country, it is necessary to develop priority areas of biotechnology, create advanced means of detecting pathogenic biological agents. Rickettsia bacteria, one of the most widespread zoonotic pathogens worldwide, continues to be a serious problem for public health. One of the solutions to the problems related to the situation of the effectiveness of rickettsiosis monitoring is the widespread introduction into clinical practice of modern diagnostic methods based on nucleic acid amplification (MANC) methods, in particular PCR. The paper presents the test results of experimental series of rickettsia detection kits.

Purpose. Development and construction of experimental series of PCR test systems for the detection of rickettsioses, conducting control tests to work out optimal conditions in order to achieve maximum sensitivity and specificity of the drug.

Keywords: rickettsioses, PCR test system, primers, gene regions, molecular genetic method, autochthonous cases, genotype.