

Федеральное бюджетное учреждение науки
«Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии
и микробиологии им. Г.Н. Габричевского»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека

На правах рукописи

Пименова Алена Сергеевна

**Совершенствование молекулярно-генетических методов
лабораторной диагностики дифтерии и коклюша**

03.02.03 - микробиология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, доцент
Борисова Ольга Юрьевна

Москва – 2017

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Актуальность темы исследования.....	5
Степень разработанности темы исследования.....	7
Цель исследования.....	10
Задачи исследования.....	10
Научная новизна.....	11
Теоретическая и практическая значимость.....	13
Методология и методы исследования.....	15
Штаммы микроорганизмов.....	15
Образцы клинического материала.....	19
Микробиологические методы исследования.....	21
Молекулярно-генетические методы исследования.....	25
Серологические методы исследования.....	28
Биоинформационные и статистические методы исследования.....	29
Личное участие автора в получении результатов.....	31
Основные положения диссертации, выносимые на защиту.....	32
Степень достоверности и апробация результатов исследования.....	32
Объем и структура диссертации.....	33
ГЛАВА 1. Обзор литературы.....	35
1.1.Современное состояние лабораторной диагностики коклюшной инфекции.....	35
1.1.1.Микробиологическая характеристика бактерий рода <i>Bordetella</i> , вызывающих коклюш и коклюшеподобные заболевания.....	37
1.1.2. Методы лабораторной диагностики коклюшной инфекции.....	39
1.2.Современное состояние лабораторной диагностики дифтерийной инфекции.....	52
1.2.1.Микробиологическая характеристика бактерий рода <i>Corynebacterium</i> , вызывающих дифтерию и дифтериеподобные	

заболевания.....	55
1.2.2.Методы лабораторной диагностики дифтерийной инфекции.....	59
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	
ГЛАВА 2. Совершенствование генодиагностики коклюша.....	67
2.1.Оптимизация метода ускоренной диагностики коклюша на основе изотермической амплификации (LAMP).....	67
2.2.Оценка аналитической надежности разработанного метода.....	70
2.3.Оценка валидности разработанного метода.....	74
2.4.Результаты применения разработанного метода для обследования больных на разных сроках от начала заболевания, при различных формах клинического течения и на фоне антибиотикотерапии, а также детей в возрасте до 1 года	79
2.5.Результаты применения разработанного метода для обследования контактных лиц в эпидемических очагах и в организованных коллективах с длительно кашляющими детьми.....	82
2.6.Результаты применения разработанного метода для обследования семейных очагов коклюшной инфекции.....	87
ГЛАВА 3. Разработка метода генодиагностики дифтерийной инфекции на основе изотермической амплификации (LAMP)	94
3.1.Разработка метода ускоренной генодиагностики для выявления ДНК возбудителя дифтерии.....	94
3.2.Оценка аналитической чувствительности разработанного метода генодиагностики.....	99
3.3.Оценка аналитической специфичности разработанного метода генодиагностики.....	101
3.4.Апробация метода генодиагностики в модельных экспериментах на иммитантах клинических образцов.....	102
ГЛАВА 4. Разработка метода генодиагностики дифтерийной инфекции на основе мультиплексной ПЦР.....	105

4.1.Разработка метода генодиагностики в мультиплексном формате для выявления ДНК возбудителя дифтерии.....	105
4.2.Оценка аналитической специфичности разработанных вариантов метода генодиагностики.....	115
4.3.Результаты апробации метода генодиагностики на иммитантах клинических образцов.....	120
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	125
ВЫВОДЫ.....	138
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	140
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	141
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	142
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	143

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Коклюш и дифтерия являются воздушно-капельными бактериальными инфекциями, управляемыми средствами массовой иммунизации, введение которой в Российской Федерации (РФ) с 1959 года привело к значительному улучшению эпидемиологической обстановки и показало социально-экономическую значимость вакцинопрофилактики для поддержания санитарно-эпидемиологического благополучия по этим инфекциям в нашей стране [68, 69, 73, 82, 106, 112, 129, 130].

С 1990-х годов в странах с высоким уровнем охвата профилактическими прививками регистрируется подъем заболеваемости коклюшем [147, 148, 216], что связано с недостатками вакцинации ацеллюлярными вакцинами, изменением генотипических свойств возбудителя, а также широким внедрением молекулярно-генетических методов для идентификации *B.pertussis* [148, 149, 216, 217]. С 2012 года в России заболеваемость коклюшем стабилизировалась на уровне 3,0 - 5,0 на 100 тыс. населения [118]. Вместе с тем в 2016 году отмечался рост заболеваемости: регистрировались высокая заболеваемость среди детей до 1 года и локальные вспышки с формированием очагов разной интенсивности в организованных детских коллективах [7, 8, 97]. Кроме того, в последние годы в структуре заболеваемости увеличивается удельный вес стертых и легких форм болезни среди детей старшей возрастной группы и взрослых [6, 9, 20, 93, 97, 98, 196, 242], а также участились случаи выявления бактерионосителей среди практически здоровых людей [179, 196, 247].

Несмотря на успехи вакцинопрофилактики, дифтерия по-прежнему является серьезной проблемой общественного здравоохранения в странах с недостаточным уровнем иммунизации. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и Центров по контролю и профилактике заболеваний США (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) в Иране, Непале, Пакистане, Индии, Индонезии, Гане, Бразилии, Гаити, Доминиканской Республике дифтерия по сей день остается эндемичным заболеванием [145, 146], регистрируются локальные

вспышки в Таиланде, Лаосе и странах Африки [135]. А также в странах Европы появились сообщения о случаях заболевания дифтерией среди мигрантов и туристов, посетивших эндемичные по этой инфекции территории [135]. В России за последние 16 лет (2001 - 2016 гг.) показатели заболеваемости снизились в 63 раза (с 0,63 до 0,0007 случаев на 100 тыс. населения) [131]. Однако актуальность проблемы дифтерии в условиях спорадической заболеваемости по сей день сохраняется [68, 69, 73, 120, 121, 129, 130], так как существует бактерионосительство, эпидемический процесс протекает среди привитого населения, а также утрачивается опыт клинического и бактериологического распознавания дифтерии [131]. При этом в условиях единичных случаев заболеваний ведущая роль в распространении инфекции отводится бактерионосителям токсигенных коринебактерий, поскольку они являются резервуаром возбудителя и поддерживают его существование как биологического вида.

Поэтому, учитывая, что в последние годы увеличивается доля неиммунных лиц среди населения за счет отказа от вакцинации, заболеваемость коклюшем и дифтерией может стать серьезной проблемой здравоохранения.

До сих пор не разработаны методы генодиагностики, которые с наименьшими финансовыми и трудозатратами позволят идентифицировать возбудителей дифтерии и коклюша. При коклюшной инфекции с 2004 года используется комплекс трех методов (бактериологический, серологический и молекулярно-генетический), применение которых определяется сроком развития заболевания. Наиболее эффективным среди этих методов является молекулярно-генетический, позволяющий выявить фрагмент / фрагменты генома *B.pertussis*, в том числе геномов нескольких видов бордетелл методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени, начиная с 1-й по 4-ю недели заболевания. Вместе с тем применение тест-систем в формате ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) сопряжено с рядом недостатков: высокая стоимость исследования и квалификация персонала, необходимость в приобретении дорогостоящего оборудования и иногда возникающие сложности при

интерпретации полученных результатов, что требует проведения повторного исследования. Разработка альтернативных более простых и надежных методов и тест-систем, направленных на выявление ДНК *B.pertussis*, остается перспективным направлением по улучшению диагностики коклюша, так как снижение стоимости самого исследования экономически целесообразно для региональных лабораторий с разными системами финансирования. Поэтому вопрос о выборе того или иного метода генодиагностики коклюша, в том числе при обследовании пациентов с диагностической целью, а также контактных лиц в очагах, остается открытым. В лабораторной диагностике дифтерии применяется только бактериологический метод, и методы генодиагностики до сих пор не используются.

Следовательно, разработка методов своевременной и быстрой идентификации этих возбудителей, как с диагностической целью, так и с профилактической в случае дифтерии, несомненно, будет способствовать быстрому выявлению больных и бактерионосителей, назначению своевременной терапии, а также поддержанию санитарно-эпидемиологического благополучия по этим инфекциям.

Степень разработанности темы исследования

За последние 40 лет достигнуты значительные успехи в совершенствовании методов идентификации патогенных микроорганизмов. На смену серологическим методам диагностики, позволяющим выявлять специфические антитела или поверхностные антигены, пришли методы определения их генетических детерминант. Разработка молекулярно-генетических технологий открыла новые перспективы и возможности в проведении эпидемиологического надзора за инфекционными заболеваниями.

Отечественными и зарубежными исследователями предложены разные методы амплификации нуклеиновых кислот (nested-ПЦР, ПЦР в режиме реального времени), с помощью которых возможно проводить идентификацию различных участков генома *B.pertussis*: гена коклюшного токсина (КТ) [140, 162,

172, 194, 225, 226], аденилатциклазного токсина (АЦТ) [154], порина [185, 186], повторяющихся последовательностей хромосомы [76, 138, 159, 165, 190, 235, 236]. На территории РФ зарегистрирован лишь один набор реагентов для выявления и дифференциации ДНК возбудителей коклюша, паракоклюша и бронхисептикоза методом ПЦР «АмплиСенс® *Bordetella* multi-FL» [101, 102]. Вместе с тем до сих пор нет международной унифицированной молекулярно-генетической тест-системы, существуют различия в выборе генов-мишеней и систем для их детектирования, трудности достоверной дифференциации нескольких видов бордетелл, обусловленной высокой гомологией геномов, что в итоге препятствует стандартизации и созданию единой концепции диагностики коклюша с помощью амплификационных технологий.

Лабораторная диагностика дифтерии в нашей стране до сих пор базируется только на бактериологических исследованиях. Она создавалась на протяжении десятилетий несколькими поколениями микробиологов, среди которых ведущая роль принадлежит сотрудникам МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского. Однако основным и определяющим недостатком этого метода является его продолжительность, которая составляет минимум три дня в случае положительного результата и пять дней – в случае отрицательного. Кроме того, проведение этих исследований сопряжено с использованием большого числа питательных сред и реагентов, в том числе биологического происхождения, что увеличивает стоимость анализа. Правильность проведения исследования в значительной степени зависит от качественной постановки всех тестов, что в практических условиях вызывает большие сложности. Предпринятые попытки разработки молекулярно-генетических тест-систем для ПЦР, ПЦР в режиме реального времени, мультиплекс-ПЦР, в том числе с дифференциацией *C.ulcerans* и *C.pseudotuberculosis*, направлены на определение токсигенных свойств у коринебактерий, выделенных в чистой культуре [136, 203, 207, 211, 212, 213, 215, 227, 228, 233]. Единичные разработки амплификационных технологий, основанные на выявлении специфических фрагментов генома *C.diphtheriae* непосредственно в патологическом материале [134, 135, 144, 191, 215, 227],

требуют дальнейшего развития, а предложенные наборы реагентов представлены только экспериментальными моделями.

За последние 20 лет сотрудниками ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского были предложены два варианта молекулярно-генетической диагностики дифтерии. В конце 1990-х годов разработан способ на основе метода ПЦР с электрофоретической детекцией, позволяющий в клиническом материале от больных в течение 5 - 6 часов выявить фрагмент гена *tox* размером 340 п.н. с дифференциацией НТТН-штаммов *C.diphtheriae*, содержащих делецию нуклеотида G в гене дифтерийного токсина (ДТ) [38, 64]. В 2000-х годах совместно с сотрудниками ФБУН ГНЦ ПМБ (пос. Оболенск) был разработан мультиплексный вариант ПЦР, позволяющий выявить фрагменты генов *tox* и *amy* с возможностью одновременного определения токсигенности и биовара возбудителя дифтерии [12, 15, 88, 141]. Вместе с тем методы генодиагностики, с помощью которых стало возможным определять в биологическом материале специфические фрагменты генома *C.diphtheriae*, далеки от совершенства и требуют дальнейшей доработки.

В течение последних 10 лет перспективным направлением является разработка технологий на основе изотермической амплификации, в частности метод петлеобразующей изотермической амплификации (loop-mediated isothermal amplification, LAMP), который обладает высокой чувствительностью, специфичностью и амплификационной эффективностью за счет использования нескольких пар праймеров на один фрагмент генома и биологических особенностей Bst ДНК-полимеразы и не требует использования дорогостоящего оборудования [209]. Этот метод применен и для диагностики коклюша [143, 174, 209, 210]. Однако предложенный зарубежными учеными вариант апробирован только на штаммах *B.pertussis*, а во время проведения испытаний на ограниченном количестве клинических образцов регистрировались ложноположительные результаты. Кроме того, способ предусматривал использование дорогостоящих реагентов, что представляет определенные ограничения для широкого применения. В 2009 году коллективом авторов ФБУН

МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского разработан способ ускоренной генодиагностики коклюша на основе изотермической амплификации (LAMP), позволяющий выявить ДНК *B.pertussis* в клиническом материале в течение 9 - 10 часов от начала исследования с эффективностью 84,9 % [12, 13, 14, 87]. Применение зарубежными исследователями технологии LAMP для идентификации возбудителя дифтерии было проведено только на чистых культурах *C.diphtheriae* [213].

Таким образом, имеющиеся на сегодняшний день и применяемые в практическом здравоохранении методы генодиагностики коклюша и дифтерии требуют совершенствования, так как не в полной мере отвечают всем необходимым требованиям. Они достаточно дороги, что ограничивает их использование в лабораториях разного уровня финансирования, требуют высокой квалификации персонала или длительного времени для получения результата. Внедрение современных технологий, таких как изотермическая амплификация (LAMP), в диагностический процесс позволит повысить эффективность, ускорить и удешевить проведение исследования. Использование мультиплексных технологий расширит возможности выявления *C.ulcerans*, вызывающего дифтериеподобные заболевания, а также позволит проводить мониторинг генотипических свойств циркулирующих *C.diphtheriae* на более высоком уровне.

Цель исследования – совершенствование и апробация молекулярно-генетических методов лабораторной диагностики дифтерии и коклюша, основанных на технологиях амплификации нуклеиновых кислот.

Задачи исследования:

1. Оптимизировать метод ускоренной генодиагностики на основе изотермической амплификации (LAMP) для выявления ДНК возбудителя коклюша в клиническом материале.
2. Апробировать разработанный метод лабораторной диагностики коклюша при обследовании больных на разных сроках от начала заболевания, с

различными формами клинического течения и на фоне антибиотикотерапии, в частности детей в возрасте до 1 года в реальных клинических условиях.

3. Апробировать разработанный метод генодиагностики коклюша при обследовании контактных лиц в эпидемических очагах и в организованных коллективах с длительно кашляющими детьми.
4. Разработать способ ускоренной генодиагностики на основе изотермической амплификации (LAMP) для выявления ДНК возбудителя дифтерийной инфекции в клиническом материале.
5. Разработать способ генодиагностики для выявления нуклеотидных последовательностей генов дифтерийного токсина, репрессора дифтерийного токсина, амилазы и РНК-полимеразы *C.diphtheriae* методом ПЦР в формате мультиплекс.
6. Провести апробацию и определить возможности разработанных способов генодиагностики дифтерийной инфекции в модельных экспериментах на *C.diphtheriae* и других представителях рода *Corynebacterium* с использованием коллекционных и свежевыделенных штаммов микроорганизмов, вызывающих заболевания дыхательных путей, и на иммитантах клинических образцов.

Научная новизна

Оптимизирован ускоренный метод генодиагностики, основанный на изотермической амплификации (LAMP), позволяющий выявлять ДНК возбудителя *B.pertussis* в клиническом материале от больного. Метод показал высокую эффективность: диагностическая чувствительность составила 99,6 %, диагностическая специфичность – 98,7 %, индекс точности (диагностическая эффективность) – 99,4 % (патент на изобретение РФ № 2542396 от 21.01.2015 г.).

Разработанный метод генодиагностики коклюша позволил обнаружить ДНК *B.pertussis* у 17,9 % обследованных контактных лиц в трех эпидемических очагах и у 5,2 % человек в организованных коллективах с длительно кашляющими

детьми. Среди контактных взрослых в семейных очагах выявлено 47,5 % больных стертыми и легкими формами коклюша и в 27,5 % случаях обнаружено бактерионосительство *B.pertussis*, которое в зависимости от длительности контакта в 72,7 % случаев сопровождалось наличием специфических противокклюшных антител разных классов.

Разработан способ ускоренной генодиагностики на основе изотермической амплификации (LAMP), позволяющий обнаружить ДНК возбудителя дифтерийной инфекции в клиническом материале от больного в течение 4 - 4,5 часов от начала исследования; аналитическая чувствительность метода составила $2,3 \times 10^3$ ГЭ / мл, аналитическая специфичность – 100 % (патент на изобретение РФ № 2623149 от 22.06.2017 г.).

Предложена новая комбинация ДНК-мишеней (нуклеотидные последовательности генов дифтерийного токсина, репрессора дифтерийного токсина, амилазы и РНК-полимеразы), что позволяет в одной мультиплексной ПЦР выявить генетические детерминанты, определяющие биотип и токсигенность возбудителя дифтерии, а также дифференцировать *C.diphtheriae* от других клинически значимых представителей рода *Corynebacterium*.

Разработан способ идентификации *C.diphtheriae*, *C.ulcerans* и *Corynebacterium spp.* на основе метода ПЦР в формате мультиплекс, посредством которого проводится дифференциация токсигенных и нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* биоваров *gravis* и *mitis*, НТТН-штаммов *C.diphtheriae*, содержащих в гене *tox* делецию нуклеотида G в позиции 55 или мобильный генетический IS-1 элемент, токсигенных и нетоксигенных штаммов *C.ulcerans* и других представителей рода *Corynebacterium*.

С целью использования в практическом здравоохранении разработан способ выявления ДНК токсигенных штаммов *C.diphtheriae* биоваров *gravis* и *mitis* и *C.ulcerans* на основе метода ПЦР в формате мультиплекс в клиническом материале от больного; аналитическая чувствительность метода составила $2,3 \times 10^3$ ГЭ / мл, аналитическая специфичность – 100 %.

Теоретическая и практическая значимость

Результаты применения разработанных методов генодиагностики коклюша и дифтерии обосновывают использование высокотехнологичных и ускоренных амплификационных технологий в лабораторной диагностике этих инфекций с целью оказания квалифицированной медицинской помощи населению.

Предложенные методы генодиагностики определили новые методологические подходы обследования пациентов для выявления бактерионосителей, являющихся резервуаром возбудителей этих социально-значимых вакциноуправляемых инфекций, а также для дальнейшего изучения механизмов и продолжительности бактерионосительства.

Оптимизированный способ генодиагностики на основе изотермической амплификации (LAMP) позволяет в течение 4 - 5 часов обследовать больных с подозрением на коклюш, что будет способствовать быстрому лабораторному подтверждению диагноза независимо от сроков заболевания, формы клинического течения и антибиотикотерапии, в частности у детей в возрасте до 1 года.

Показана возможность применения молекулярно-генетических методов, в том числе и разработанного, для обследования контактных в эпидемических очагах коклюша, а также в организованных коллективах с длительно кашляющими лицами с целью выявления в максимально сжатые сроки заболевших и установления причин длительного кашля среди детей и взрослых.

Разработанные способы генодиагностики дифтерии обосновывают возможности использования молекулярно-генетических технологий при обследовании пациентов как с диагностической целью, так и с профилактической, а также контактных лиц в очагах, что будет способствовать сокращению времени выдачи ответа до одного рабочего дня.

В Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-ОБОЛЕНСК» Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (ФБУН ГНЦ ПМБ) депонировано 60 штаммов микроорганизмов: восемнадцать

штаммов *C.diphtheriae* (B-7813; B-7815; B-7816; B-7817; B-7970; B-7071; B-7972; B-7073; B-7974; B-7975; B-7976; B-7977; B-7978; B-7979; B-7980; B-7981; B-7991; B-7992), одиннадцать штаммов *C.ulcerans* (B-7818; B-7819; B-7982; B-7983; B-7984; B-7985; B-7986; B-7987; B-7988; B-7989; B-7990), тринадцать штаммов микроорганизмов рода *Corynebacterium* (B-7820; B-7993; B-7994; B-7995; B-7996; B-7997; B-7998; B-7999; B-8000; B-8001; B-8002; B-8003; B-8004), десять штаммов *B.pertussis* (B-7392; B-7393; B-7394; B-8011; B-8012; B-8013; B-8014; B-8015; B-8016; B-8017), шесть штаммов *B.parapertussis* (B-7821; B-8006; B-8007; B-8008; B-8009; B-8010) и два штамма *B.bronchiseptica* (B-7822; B-8005). Задепонированные типовые штаммы можно использовать для проведения внешнего контроля качества бактериологических исследований по выделению и идентификации бактерий *C.diphtheriae* и *Bordetella spp.*, а также научных исследований при изучении биологических свойств возбудителей в системе эпидемиологического надзора за дифтерийной и коклюшной инфекциями, а также микробного пейзажа микрофлоры ротоглотки у больных с патологией верхних дыхательных путей и у практически здоровых людей.

Создана рабочая коллекция образцов ДНК микроорганизмов рода *Corynebacterium* и рода *Bordetella* с целью дальнейшего изучения их внутривидового и межвидового генетического полиморфизма.

В рамках работы Референс-центра по мониторингу за возбудителями кори, краснухи, эпидемического паротита, коклюша и дифтерии на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора) результаты исследований были представлены в информационном материале при проведении региональных семинаров по лабораторной диагностике дифтерии и коклюша (2012 г., Екатеринбург; 2013 г., Хабаровск; 2014 г., Горно-Алтайск; 2015 г. и 2016 г., Москва; 2015 г. и 2016 г., Ростов-на-Дону; 2016 г., Ярославль; 2016 г., Санкт-Петербург; 2016 г., Ставрополь; 2016 г., Калининград; 2017 г., Нижний Новгород;

2017 г., Новосибирск).

Методология и методы исследования

Методология настоящего исследования спланирована согласно поставленной цели. Предметом исследования является разработка методов генодиагностики дифтерии и коклюша на основе технологий амплификации нуклеиновых кислот. Анализ научной литературы, посвященной созданию и применению методов генодиагностики при выявлении возбудителей бактериальных воздушно-капельных инфекций, проведен на основе формально-логических методов. Планирование и проведение исследований осуществлялось на основе общенаучных и специфических методов: микробиологических, молекулярно-генетических, биоинформационных и методов статистической обработки результатов.

Штаммы микроорганизмов

В работе использованы типовые коллекционные (Таблица 1) и свежевыделенные (Таблицы 2, 3, 4) штаммы микроорганизмов. Объем проведенных исследований представлен в таблице 5.

Таблица 1 – Коллекционные штаммы микроорганизмов, использованные в работе

№	Вид микроорганизма и номер штамма	Коллекция
1.	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> 665	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ – ОБОЛЕНСК» ФБУН ГНЦ ПМБ
2.	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> 6765	
3.	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> 178-01	
4.	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> 145-12	
5.	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> 2-15	
6.	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> 14-15	
7.	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> PW 8	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов ФГБУ «НЦЭСМП» МЗ РФ
8.	<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i> «Соколов»	

Продолжение таблицы 1

№	Вид микроорганизма и номер штамма	Коллекция
9.	<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i> 43-13	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ – ОБОЛЕНСК» ФБУН ГНЦ ПМБ
10.	<i>Corynebacterium ulcerans</i> 675	
11.	<i>Corynebacterium ulcerans</i> 258-03	
12.	<i>Corynebacterium ulcerans</i> 105-00	
13.	<i>Corynebacterium xerosis</i> 1911	
14.	<i>Corynebacterium xerosis</i> ATCC 373	American Type Culture Collection
15.	<i>Corynebacterium renale</i> ATCC 19412	
16.	<i>Corynebacterium minutissimum</i> ATCC 23348	
17.	<i>Corynebacterium jeikeium</i> ATCC 43734	
18.	<i>Bordetella pertussis</i> 703	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов ФГБУ «НЦЭСМП» МЗ РФ
19.	<i>Bordetella parapertussis</i> 402	
20.	<i>Bordetella pertussis</i> 39	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ – ОБОЛЕНСК» ФБУН ГНЦ ПМБ
21.	<i>Bordetella pertussis</i> 143	
22.	<i>Bordetella pertussis</i> 688	
23.	<i>Bordetella pertussis</i> 796	
24.	<i>Bordetella pertussis</i> ST-3	
25.	<i>Bordetella pertussis</i> ST-5	
26.	<i>Bordetella pertussis</i> ST-8	
27.	<i>Bordetella parapertussis</i> 386	
28.	<i>Bordetella bronchiseptica</i> 9	
29.	<i>Staphylococcus aureus</i> Wood-46	
30.	<i>Streptococcus pyogenes</i> Dick I	
31.	<i>Bordetella bronchiseptica</i> NCTC 8344	National Collection of Type Cultures
32.	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i> NCTC 5055	

Продолжение таблицы 1

№	Вид микроорганизма и номер штамма	Коллекция
33.	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	American Type Culture Collection
34.	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	
35.	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	

Таблица 2 – Штаммы микроорганизмов, выделенные из клинического материала от пациентов с подозрением на коклюш и дифтерию *

№	Вид микроорганизма	Количество выделенных штаммов	Показания к обследованию
1.	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	195	С диагностической и профилактической целями
2.	<i>Corynebacterium ulcerans</i>	9	
3.	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	2	
4.	<i>Bordetella pertussis</i>	187	С диагностической целью
5.	<i>Bordetella parapertussis</i>	15	
6.	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	1	
	ИТОГО	409	

Примечание: * Штаммы микроорганизмов получены в период 2012 - 2016 гг. из бактериологических лабораторий лечебно-профилактических организаций (ЛПО) и Федеральных бюджетных учреждений здравоохранения «Центр гигиены и эпидемиологии» (ФБУЗ ЦГиЭ) в субъектах РФ в соответствии с письмом Роспотребнадзора от 19.06.2012 г. № 01/6830-12-32 «Об организации исследований культур возбудителей дифтерии и коклюша»

Таблица 3 – Штаммы микроорганизмов рода *Corynebacterium*, выделенные из клинического материала от пациентов с различными формами хронического тонзиллита и патологией полости носа *

№	Вид микроорганизма	Количество выделенных штаммов
1.	<i>Corynebacterium accolens</i>	1
2.	<i>Corynebacterium afermentas subsp. lipophilum</i>	3
3.	<i>Corynebacterium amycolatum</i>	5
4.	<i>Corynebacterium aurimucosum</i>	10
5.	<i>Corynebacterium coyleae</i>	1
6.	<i>Corynebacterium durum</i>	3
7.	<i>Corynebacterium imitans</i>	1

Продолжение таблицы 3

№	Вид микроорганизма	Количество выделенных штаммов
8.	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	1
9.	<i>Corynebacterium maris</i>	1
10.	<i>Corynebacterium minutissimum</i>	4
11.	<i>Corynebacterium mucifaciens</i>	1
12.	<i>Corynebacterium paurometabolum</i>	1
13.	<i>Corynebacterium propinquum</i>	2
14.	<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	9
15.	<i>Corynebacterium simulans</i>	1
16.	<i>Corynebacterium tuberculostearicum</i>	11
17.	<i>Corynebacterium urealyticum</i>	2
18.	<i>Corynebacterium xerosis</i>	1
	ИТОГО	58

Примечание: * Штаммы микроорганизмов выделены в период 2013 - 2014 гг. от 79 пациентов, которые были планово госпитализированы в Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Научно-исследовательский клинический институт оториноларингологии им. Л.И. Свержевского» Департамента здравоохранения города Москвы (ГБУЗ НИКИО им. Л.И. Свержевского ДЗМ)

Таблица 4 – Штаммы микроорганизмов других родов, выделенные из клинического материала от пациентов с различными формами хронического тонзиллита и патологией полости носа*

№	Вид микроорганизма	Количество выделенных штаммов
1.	<i>Actinomyces viscosus</i>	1
2.	<i>Candida albicans</i>	2
3.	<i>Haemophilus influenzae</i>	1
4.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
5.	<i>Staphylococcus aureus</i>	20
6.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10
7.	<i>Staphylococcus hominis</i>	1
8.	<i>Streptococcus mitis</i>	9
9.	<i>Streptococcus oralis</i>	2

Продолжение таблицы 4

№	Вид микроорганизма	Количество выделенных штаммов
10.	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	15
11.	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2
12.	<i>Streptococcus pyogenes</i>	25
13.	<i>Streptococcus salivarius</i>	12
	ИТОГО	101

Примечание: * Штаммы микроорганизмов выделены в период 2013 - 2014 гг. от 79 пациентов, госпитализированных в плановом порядке в ГБУЗ НИКИО им. Л.И. Свержевского ДЗМ

Таблица 5 – Объем проведенных исследований

Вид исследования			Число исследований
Бактериологические исследования			567
Методом MALDI-TOF MS			159
Молекулярно-генетические методы	Метод петлеобразующей изотермической амплификации (LAMP)		1544
	Метод ПЦР	ПЦР в классическом формате	412
		ПЦР в формате мультиплекс	1660
		ПЦР в режиме реального времени	809
	Секвенирование ПЦР-фрагментов	ПЦР-фрагмент гена <i>16SrRNA</i>	159
		ПЦР-фрагмент гена <i>groB</i>	58

Образцы клинического материала

Клинический материал, полученный при обследовании больных с подозрением на коклюш и контактных лиц в очагах коклюшной инфекции

Количество клинических образцов, полученных при обследовании больных с подозрением на коклюш и контактных лиц в очагах, представлено в таблице 6.

Клинический материал брали двумя сухими стерильными одноразовыми зондами-тампонами (COPAN, Италия) с задней стенки ротоглотки, не касаясь щек и языка и предварительно аккуратно прижав язык пациента индивидуальным шпателем. Рабочие части зондов с вязкими тампонами помещали в одну

пробирку типа эппендорф с 0,5 мл физиологического раствора и отламывали их концы. Транспортирование и хранение исследуемого материала осуществляли в соответствии с методическими рекомендациями МР 3.1.2.0072-13 «Диагностика коклюша и паракоклюша» [26].

Таблица 6 – Количество клинических образцов, полученных при обследовании больных с подозрением на коклюш и контактных лиц в очагах коклюшной инфекции и организованных коллективах с длительно кашляющими лицами

№	Обследуемый контингент	Количество образцов	Учреждение
1.	Больные с подозрением на коклюш	339	Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Инфекционная клиническая больница № 1 Департамента здравоохранения города Москвы» (ГБУЗ «ИКБ № 1 ДЗМ»)
2.	Здоровые женщины по уходу за больным коклюшем ребенком	40	ГБУЗ «ИКБ № 1 ДЗМ»
3.	Контактные лица из очагов коклюшной инфекции и организованных коллективов с длительно кашляющими детьми*	430	8 образовательных учреждений г. Москвы и Московской области
	ИТОГО	809	

Примечание: * Учащиеся 1 - 9 и 11-х классов, работники образования различных категорий (административно-управленческий персонал, педагогические работники, медицинские работники, работники столовой, технический и обслуживающий персонал)

Клинический материал, полученный при обследовании больных с различными формами хронического тонзиллита и патологией полости носа

Обследовано 79 пациентов с различными формами хронического тонзиллита и патологией полости носа, поступивших в ГБУЗ НИКИО им. Л.И. Свержевского ДЗМ на плановую госпитализацию в период с сентября 2013 года по апрель 2014 года, среди которых было 38 (48,1 %) женщин и 41 (51,9 %) мужчин. Число больных в возрасте 15-19 лет составило 11 (13,9 %) человек, 20-29 лет – 29 (36,7 %), 30-39 лет – 26 (32,9 %), 40-49 лет – 8 (10,1 %), 50-59 лет – 4

(5,1 %) и 60-69 лет – 1 (1,3 %). Хронический тонзиллит диагностирован у 62 (78,5 %) больных, из которых у 60 (96,8 %) была токсико-аллергическая форма I степени. У остальных 17 (21,5 %) пациентов выявлена патология полости носа. При этом среди них у 10 (58,8 %) больных был верифицирован диагноз «Гипертрофический ринит».

Процедуру по забору материала из зева от пациентов проводили натошак, до орошения или полоскания горла двумя сухими стерильными одноразовыми зондами-тампонами (COPAN, Италия). Тампоны с клиническим материалом доставляли в лабораторию диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора в течение 2 часов после его взятия. Транспортирование осуществлялось в сумках-термосах при температуре 37 °С.

Далее патологический материал с одного тампона засекали на питательные среды с целью последующей идентификации, а с другого – смывали в 0,5 мл физиологического раствора для выделения ДНК.

Микробиологические методы исследования

Идентификация микроорганизмов видов *C.diphtheriae*, *C.ulcerans* и *C.pseudotuberculosis*

Выделение штаммов *C.diphtheriae*, *C.ulcerans* и *C.pseudotuberculosis* проводили согласно методическим указаниям «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции»: МУ 4.2.698-98 и МУК 4.2.3065-13 [52, 53].

Посев исследуемого материала осуществляли на дифференциально-диагностическую среду – кровяно-теллуритовый агар (КТА) на основе 2 % агара (ГРМ-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) или СПА (ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ, Махачкала)) с добавлением 7 % ККРС (ООО «ЛейТран», Москва) и 0,02 % теллурита калия (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск). Затем чашки инкубировали при температуре 37 °С в течение 24 - 48 часов. Идентификацию микроорганизмов проводили по культурально-морфологическим, токсигенным и биохимическим свойствам.

Культурально-морфологические свойства выросших колоний оценивали с помощью стереоскопического микроскопа SteREO Discovery V12 (Carl Zeiss, Германия) (объектив PlanApo S 1,0× FWD 60 mm; окуляр PI 10 x 23 Br foc).

Токсигенные свойства штаммов *C.diphtheriae*, *C.ulcerans* и *C.pseudotuberculosis* определяли в реакции преципитации (РП) в агаре по Фельдману с использованием Коринетоксагара (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с добавлением 20 % сыворотки крупного рогатого скота (СКРС) (ООО «ЛейТран», Москва) и дисков, пропитанных дифтерийным антитоксином (НПО «Диагностические системы», Нижний Новгород). Приготовление чашек, постановку пробы на токсигенность и учет результатов осуществляли в соответствии с [52, 53].

С целью определения цистиной активности (проба Пизу) испытуемые культуры засеивали в среду Пизу (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск). Постановку пробы Пизу и учет результатов осуществляли в соответствии с [52, 53].

Биохимические свойства (уреазная, сахаролитическая и нитратредуктазная активности) выделенных культур изучали на средах, приготовленных в лабораторных условиях, по изложенным в [52, 53] методикам, или с помощью биохимической тест-системы «ДС-ДИФ-КОРИНЕ» (НПО «Диагностические системы», Нижний Новгород) в соответствии с инструкцией производителя.

Идентификация микроорганизмов видов *B.pertussis*, *B.parapertussis* и *B.bronchiseptica*

Выделение штаммов *B.pertussis*, *B.parapertussis* и *B.bronchiseptica* проводили согласно методическим рекомендациям МР 3.1.2.0072-13 «Диагностика коклюша и паракоклюша» и «Инструкции по бактериологическому и серологическому исследованиям при коклюше и паракоклюше (для бактериологических лабораторий санитарно-эпидемиологических станций и больниц)» (1983 г.) [26, 30].

Исследуемый материал засеивали на чашки Петри с плотными питательными средами: КУА (Филиал «Медгамал» ФГБУ «НИИЭМ Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ, Москва) или Бордетелагар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск). Посевы инкубировали

при температуре 37 °С в течение 48 - 72 часов. Идентификацию микроорганизмов проводили по культурально-морфологическим, тинкториальным, биохимическим и серологическим (до 2013 г.) свойствам.

Культурально-морфологические свойства выросших колоний оценивали с помощью стереоскопического микроскопа SteREO Discovery V12 (Carl Zeiss, Германия) (объектив PlanApo S 1,0× FWD 60 mm; окуляр PI 10 x 23 Br foc).

Тинкториальные свойства изучали путем окраски по Граму, которую проводили согласно инструкции производителя (ЗАО «ЭКОлаб», Россия). Окрашенные мазки просматривали с использованием светового микроскопа Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Германия) под иммерсией (объектив EC Plan-NEOFLUAR 100 x 1,3; окуляр PI 10 × 23 Br foc).

Биохимическую активность штаммов *B.pertussis*, *B.parapertussis* и *B.bronchiseptica* оценивали путем определения их способности продуцировать ферменты оксидазу, тирозиназу, уреазу, а также редуцировать нитраты в нитриты и ассимилировать цитраты на среде Симмонса. Оксидазную активность у выделенных культур определяли с помощью готовых к применению коммерческих полосок и реактива «MIKROLATEST® OXItest» (Erba Lachema, Чехия) в соответствии с инструкцией производителя. Тирозиназную активность определяли путем посева испытуемой культуры в пробирку на скошенную поверхность простого питательного ГРМ-агара (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с 0,1 % тирозина (AppliChem GmbH, Германия). Учет результатов осуществляли в соответствии с [26, 30]. Уреазную и нитратредуктазную активности выделенных культур изучали на средах, приготовленных в лабораторных условиях, по изложенным в [26, 30] методикам. С целью определения способности ассимилировать цитраты испытуемую культуру засеивали в пробирку на скошенную поверхность цитратного агара Симмонса (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск). Учет результатов осуществляли в соответствии с [26, 30].

Серологические свойства выделенных культур (до 2013 г.) изучали путем постановки реакции агглютинации на предметном стекле со специфическими монорецепторными сыворотками к факторам 1, 2, 3 и 14 (Филиал «Медгамал»

ФГБУ «НИИЭМ Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ, Москва) в соответствии с инструкцией производителя.

Идентификация микроорганизмов, выделенных при обследовании больных с различными формами хронического тонзиллита и патологией полости носа

Исследуемый материал с тампона, полученный при обследовании больных, засекали на кровяной агар (КА) на основе ГРМ-агара (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с добавлением 10 % крови крупного рогатого скота (ККРС) (ООО «ЛейТран», Москва) по методу Gould и инкубировали при температуре 37 °С в течение 24 - 120 часов. Идентификацию выделенных микроорганизмов осуществляли согласно Приказу Минздрава СССР от 22.04.1985 г. № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» и с помощью масс-спектрометрии.

Идентификация микроорганизмов, колонизирующих ротоглотку человека, методом MALDI-TOF MS

Видовую идентификацию микроорганизмов, выделенных из клинического материала от пациентов с различными формами хронического тонзиллита и патологией полости носа, проводили методом времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией / ионизацией (MALDI-TOF MS) с использованием автоматического анализатора бактериологического VITEK[®] MS (bioMérieux, Франция).

Приготовление образцов для масс-спектрометрии осуществляли следующим образом: бактериальную культуру вносили в пробирку типа эппендорф и суспендировали в 300 мкл деионизованной воды; далее прогревали в микротермостате при 95 °С в течение 25 мин., затем охлаждали и добавляли 900 мкл 96 % этилового спирта; полученную смесь тщательно перемешивали на микроцентрифуге-вортексе, после чего центрифугировали в течение 2 мин. при 11 300 g. Далее одноразовым наконечником с аэрозольным барьером аккуратно отбирали полученный супернатант и подсушивали осадок; добавляли 25 мкл 70 % муравьиной кислоты, тщательно перемешивали пипетированием и инкубировали

при комнатной температуре в течение 3 мин.; добавляли 25 мкл N-ацетонитрила, повторно тщательно перемешивали пипетированием и центрифугировали в течение 2 мин. при 11 300 g.

Подготовленные образцы вносили в лунку MSP-чипа. Сразу после высыхания капли сверху наносили 1 мкл матрицы. Дожидались высыхания раствора матрицы и помещали MSP-чип в прибор. Анализ масс-спектров проводили в автоматическом режиме.

Молекулярно-генетические методы исследования

Выделение хромосомной ДНК из бактерий

Выделение хромосомной ДНК проводили кипячением [70] из 24-часовых бактериальных культур *C.diphtheriae*, *C.ulcerans*, *C.pseudotuberculosis* и 24 - 72-часовых культур *Corynebacterium spp.*, выращенных на КА; из 24 - 72-часовых культур *Actinomyces spp.*, *Candida spp.*, *Haemophilus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Staphylococcus spp.* и *Streptococcus spp.*, выращенных на КА; из 24-часовых культур *B.bronchiseptica*, 48-часовых культур *B.parapertussis* и 72-часовых культур *B.pertussis*, выращенных на КУА (Филиал «Медгамал» ФГБУ «НИИЭМ Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ, Москва) или Бордетеллагаре (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с добавлением 10 % ККРС (ООО «ЛейТран», Москва).

В 150 мкл деионизованной воды суспензировали полную микробиологическую петлю культуры. Полученную суспензию инкубировали 20 мин. при 95 °С, после чего осаждали центрифугированием при 9 600 g в течение 5 мин. Выделенную ДНК хранили в замороженном виде при минус 20 °С.

При проведении модельных экспериментов для оценки аналитической чувствительности разработанных методов генодиагностики дифтерийной инфекции выделение ДНК из 24-часовой бактериальной культуры контрольного токсигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis* № 665 (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) осуществляли с помощью трех различных коммерческих наборов реагентов: «АмплиПрайм[®] ДНК-сорб-АМ» (ООО «НекстБио», Москва), «АмплиПрайм[®] РИБО-преп» (ООО «НекстБио», Москва) и «К-СОРБ» (СИНТОЛ,

Москва). Работу проводили в соответствии с инструкцией по применению. Пробы очищенных ДНК хранили в замороженном виде при минус 20 °С.

Выделение ДНК из клинического материала

Закрытую пробирку типа эппендорф с 0,5 мл физиологического раствора и рабочими частями зондов с вязкими тампонами перемешивали на вортексе в течение 5 мин. и центрифугировали при 5 000 g в течение 5 сек. Медицинским пинцетом, предварительно прожженным в пламени горелки, аккуратными движениями вынимали тампоны, после чего осаждали смывы центрифугированием при 6 700 g в течение 10 мин. Наконечником с аэрозольным барьером удаляли основной объем супернатанта, оставляя в пробирке полученный осадок и 100 мкл надосадочной жидкости, из чего в последующем и выделяли ДНК.

Выделение ДНК из клинического материала проводили с помощью коммерческих наборов реагентов «ДНК-сорб-В» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва) (2013 г.) или «АмплиПрайм® ДНК-сорб-АМ» (ООО «НекстБио», Москва) (2014 - 2016 гг.) в соответствии с инструкцией по применению.

Пробы очищенных ДНК хранили в замороженном виде при минус 20 °С. С целью длительного хранения препарата надосадочную жидкость, не захватывая сорбент, переносили в стерильную пробирку.

Метод ПЦР для выявления фрагментов гена *rpoB* и гена *16SrRNA* у микроорганизмов рода *Corynebacterium*

Видовую идентификацию микроорганизмов рода *Corynebacterium*, выделенных из клинического материала от пациентов с различными формами хронического тонзиллита и патологией полости носа, проводили путем амплификации фрагментов генов *rpoB* и *16SrRNA* в соответствии с опубликованными протоколами [195].

Реакционная смесь для ПЦР содержала 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 0,1 мкМ прямого и обратного праймеров, 200 mM каждого dNTP и 1 ед. Taq ДНК-полимеразы (Thermo Fisher Scientific, Литва). Амплификацию

проводили с 1 мкл препарата ДНК в общем объеме реакционной смеси 25 мкл с использованием амплификатора «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология», Москва). В качестве положительного контроля амплификации использовали ДНК токсигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis* № 665 (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск).

Очистку ПЦР-продуктов и их секвенирование проводили на базе ООО НПО «Литех» (Москва, Россия) (<http://www.lytech.ru/>) и ЗАО «Евроген» (Москва, Россия) (<http://evrogen.ru/>).

Метод ПЦР для выявления фрагментов гена *tox* у нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* с целью идентификации нетоксигенных токснесущих штаммов

Выявление фрагментов гена *tox* у нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* проводили в соответствии с опубликованным протоколом [211].

Реакционная смесь для ПЦР содержала 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 0,1 мкМ прямого и обратного праймеров, 200 mM каждого dNTP и 1 ед. Taq ДНК-полимеразы (Thermo Fisher Scientific, Литва). Амплификацию проводили с 1 мкл препарата ДНК в общем объеме реакционной смеси 27 мкл с использованием амплификатора «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология», Москва). В качестве положительного контроля амплификации использовали ДНК токсигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis* № 665 (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск).

Детекция продуктов амплификации методом горизонтального электрофореза

Детекцию продуктов амплификации осуществляли методом горизонтального электрофореза в агарозном геле (Lonza, США) в 50x TAE-буфере (Thermo Fisher Scientific, Литва) в камере SUB-CELL[®] GT (Bio-Rad Laboratories, США) с применением источника питания Power Supply Model 2002 / 2.0 (Bio-Rad Laboratories, США). Для определения длины амплифицированных фрагментов использовали маркер молекулярных весов ДНК GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Литва).

ПЦР-продукты смешивали с 6x DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, Литва) и 10 000x SYBR Green I (Lumiprobe GMBH, Германия), после чего образцы

помещали в лунки 1,5 % агарозного геля и подвергали действию постоянного электрического тока. Электрофорез проводили при напряжении 160 V в течение 60 мин. Продукты амплификации визуализировали с помощью гельдокументирующей системы Quantum-ST4-1100/26M (Vilber Lourmat, Франция).

Метод ПЦР-РВ с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

Выявление и дифференциацию специфических фрагментов генома возбудителей коклюша, паракоклюша и бронхисептикоза в клиническом материале, полученном от пациентов с подозрением на коклюш и от контактных лиц из очагов, осуществляли методом ПЦР-РВ с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации с использованием набора реагентов «АмплиСенс® *Bordetella* multi-FL» / «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва) в соответствии с инструкцией по его применению.

Амплификацию осуществляли с помощью прибора Rotor-Gene Q 5 plex HRM (QIAGEN GmbH, Германия). На этапе амплификации в одной пробирке одновременно проходило четыре реакции: амплификация консервативного участка гена *ptxA*, кодирующего КТ, представленного в геномах *B.pertussis*, *B.parapertussis* и *B.bronchiseptica*, амплификация специфических участков в геномах *B.pertussis* и *B.bronchiseptica*, а также амплификация последовательности внутреннего контрольного образца (ВКО). Анализ и интерпретацию результатов проводили с помощью программного обеспечения прибора Rotor-Gene Q 5 plex HRM (QIAGEN GmbH, Германия).

Серологические методы исследования

Уровень специфических противокклюшных антител классов IgA, IgM и IgG к КТ и ФГА в сыворотке крови человека определяли методом ИФА с помощью коммерческой тест-системы «RIDASCREEN® *Bordetella* IgA, IgG, IgM» (R-Biopharm AG, Германия) согласно инструкции по применению.

Биоинформационные и статистические методы исследования

Подбор специфичных олигонуклеотидных праймеров для идентификации *C.diphtheriae* методом ПЦР в формате мультиплекс и методом LAMP, а также вычисление их температуры отжига проводили с помощью программ PerlPrimer 1.1.21 и Geneious 4.8.5., соответственно. Предварительную проверку специфичности праймеров выполняли с помощью программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Результаты секвенирования, полученные в формате хроматограмм, обрабатывали с использованием программы Geneious 4.8.5 для дальнейшего сопоставления с опубликованными нуклеотидными последовательностями генов в международной базе данных EMBL / GenBank на сайте Национального центра биотехнологической информации США, NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью пакета программ SPSS 19.0. Для признаков, имеющих распределение, отличное от нормального, данные представлены в виде медианы. Статистическая значимость различий качественных признаков в независимых сравниваемых группах оценивалась при помощи критерия хи-квадрат Пирсона [21, 89]. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Расчет показателей, характеризующих валидность диагностического теста (чувствительность и специфичность, прогностическая ценность положительного результата и прогностическая ценность отрицательного результата, индекс точности (диагностическая эффективность), отношение правдоподобия положительного результата и отношение правдоподобия отрицательного результата), проводили по стандартным формулам в соответствии с [21, 24, 89, 94].

- Под чувствительностью (Se) понимают способность теста определять заболевание у человека, в действительности его имеющего [21, 94]. Следует отметить, что на ранних стадиях диагностического поиска с целью сужения его рамок рекомендовано применять тесты, обладающие высокой

чувствительностью.

- Способность диагностического теста определять отсутствие заболевания у человека называют специфичностью (Sp) [21, 94]. Высокоспецифичные тесты позволяют исключить здоровых лиц из популяции с предполагаемой патологией, но способны пропустить случаи с атипичным или легким течением болезни.
- Индексом точности (Ac) или диагностической эффективностью называется показатель, который отражает долю истинных результатов среди всех результатов, полученных с помощью диагностического теста [24, 94].
- Прогностическая ценность положительного результата (PV^+ – вероятность получения у больного человека положительного результата) и прогностическая ценность отрицательного результата (PV^- – вероятность получения ошибочного отрицательного результата) позволяют оценить, насколько достоверно заключение о наличии / отсутствии заболевания у пациентов при уже известном результате лабораторного теста [21, 94]. Следует отметить тот факт, что на прогностическую ценность теста влияет распространенность заболевания в популяции.
- Используя отношения правдоподобия (LR^+ и LR^-), также можно получить информацию о прогностической ценности результатов диагностического теста. Данный критерий показывает отношение вероятности получения определенного результата у больного человека к вероятности такого же результата у здорового [21, 94]. Преимущество отношений правдоподобия состоит в том, что они отражают одновременно и чувствительность, и специфичность теста. Чем больше значение LR^+ , тем сильнее связь между положительным результатом исследования и заболеванием.

Аналитическую надежность диагностического теста устанавливали в соответствии с [23] посредством определения следующих показателей: аналитическая чувствительность, аналитическая специфичность, сходимость и воспроизводимость результатов.

Согласованность мнений двух испытателей, осуществляющих

исследование, относительно наличия / отсутствия изучаемого качественного критерия оценивали по каппе Кохена.

Личное участие автора в получении результатов

Автором разработан дизайн научного исследования, проведен аналитический обзор литературы и выполнен весь объем бактериологических и молекулярно-генетических исследований. Подбор специфичных олигонуклеотидных праймеров для идентификации *C.diphtheriae* ПЦР в формате мультиплекс проведен совместно с заведующим лабораторией молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов ФБУН ГНЦ ПМБ, к.б.н. Воложанцевым Н.В. Масс-спектрометрические исследования, конструирование праймеров для идентификации *C.diphtheriae* ПЦР в формате мультиплекс и методом LAMP проведены совместно с д.м.н., профессором Ефимовым Б.А., к.м.н. Чаплиным А.В. и д.м.н., профессором Кафарской Л.И. на кафедре микробиологии и вирусологии педиатрического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России). Апробацию ускоренного метода лабораторной диагностики коклюшной инфекции проводили на базе ГБУЗ «ИКБ № 1 ДЗМ» совместно с врачами-инфекционистами клинического отдела ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора – к.м.н. Петровой М.С., д.м.н. Поповой О.П. и Вороновой И.С. Серологические исследования выполнены совместно со старшим научным сотрудником лаборатории кокковых инфекций ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, к.м.н. Скирдой Т.А. Апробация разработанного метода лабораторной диагностики коклюша при обследовании контактных в очагах коклюшной инфекции выполнена совместно с эпидемиологами лаборатории профилактики кори и коклюша ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора – д.м.н. Цвиркун О.В. и к.м.н. Басовым А.А. Обследование

больных с тонзиллярной патологией проводили на базе ГБУЗ НИКИО им. Л.И. Свержевского ДЗМ совместно с д.м.н., доцентом Гуровым А.В. и к.м.н. Товмасын А.С. Автор провел статистическую обработку и анализ полученных данных, сформулировал выводы, практические рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Оптимизированный метод ускоренной генодиагностики на основе изотермической амплификации (LAMP) позволяет выявить ДНК *B.pertussis* в клиническом материале в течение 4 - 5 часов. Метод эффективен при обследовании больных на разных сроках от начала заболевания, с различной тяжестью клинического течения, на фоне проводимой антибиотикотерапии и при обследовании контактных в очагах коклюшной инфекции.
2. Разработанный способ ускоренной генодиагностики дифтерийной инфекции на основе изотермической амплификации (LAMP) позволяет выявить ДНК возбудителя дифтерии в клиническом материале в течение 4 - 4,5 часов от начала исследования.
3. Разработаны два варианта генодиагностики в мультиплексном формате ПЦР, позволяющие одномоментно дифференцировать ДНК токсигенных и нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* двух биоваров и токсигенных штаммов *C.ulcerans*.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

О достоверности полученных результатов свидетельствует достаточный объем выборки исследованных штаммов микроорганизмов родов *Bordetella* и *Corynebacterium* и образцов клинического материала, а также большой объем проведенных исследований. Изучено 409 штаммов, выделенных из клинического материала от пациентов с подозрением на коклюш и дифтерию в лабораториях ЛПО и ФБУЗ ЦГиЭ в субъектах РФ; 159 штаммов, выделенных от больных с

тонзиллярной патологией и патологией полости носа, госпитализированных в ГБУЗ НИКИО им. Л.И. Свержевского ДЗМ; 809 клинических образцов, полученных от больных коклюшем и от контактных из эпидемических очагов коклюшной инфекции и организованных коллективов с длительно кашляющими детьми. В работе применяли современные методы исследования (бактериологические, молекулярно-генетические и масс-спектрометрические), которые характеризуются высокой чувствительностью, специфичностью, поддерживаются программным обеспечением, позволяющим проводить биоинформационный и статистический анализ данных, с использованием сертифицированного и поверенного оборудования.

Диссертация апробирована на объединенном заседании секций Ученого Совета ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора «Медицинская биотехнология» и «Эпидемиология, микробиология, клиника инфекционных заболеваний» (протокол № 4 от 13 июня 2017 г.).

Материалы диссертационной работы доложены и представлены на 7 научных конференциях: Научно-практической конференции «Диагностика и профилактика инфекционных заболеваний» (Новосибирск, 2013); XII конгрессе детских инфекционистов России «Актуальные вопросы инфекционной патологии и вакцинопрофилактики» (Москва, 2013); VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2014» (Москва, 2014); VI Ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням (Москва, 2014); VI Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Актуальные проблемы эпидемиологии и профилактической медицины» (Ставрополь, 2014); XIX Всероссийской научно-практической конференции по медицинской микробиологии и клинической микологии (Санкт-Петербург, 2016); II Национальном конгрессе бактериологов (Санкт-Петербург, 2016).

Объем и структура диссертации

Материалы диссертационной работы изложены на 176 страницах

машинописного текста и иллюстрированы 27 таблицами, 26 рисунками. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 4 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка литературы, включающего 253 источника, из которых 145 – отечественных, 108 – зарубежных авторов.

ГЛАВА 1. Обзор литературы

1.1. Современное состояние лабораторной диагностики коклюшной инфекции

Коклюш – инфекционное заболевание человека, вызываемое бактериями *Bordetella pertussis* и сопровождающееся характерным спазматическим кашлем, затяжным течением и поражением дыхательной, сердечно-сосудистой и нервной систем [6, 54, 81, 93, 98, 115, 167]. Передача инфекции происходит воздушно-капельным путем и возможна только при тесном и длительном контакте с больным или бактерионосителем [25, 104]. Индекс контагиозности составляет 0,7 - 1,0 [25].

Несмотря на успехи вакцинопрофилактики, коклюш продолжает оставаться серьезной проблемой общественного здравоохранения и причиной детской заболеваемости и летальности во всем мире. По данным ВОЗ ежегодно заболевает коклюшем около 50 миллионов человек в мире и умирает около 300 тысяч детей, в основном в возрасте до 1 года [252]. В течение последних 10 лет высокая заболеваемость регистрируется в странах с высоким уровнем охвата профилактическими прививками – Австрия, Норвегия, Польша, Нидерланды, Великобритания, Австралия, Япония и США [147, 148, 216, 217, 234]. Рост заболеваемости объясняется целым рядом факторов, среди которых: недостатки вакцинации ацеллюлярными вакцинами, адаптация возбудителя под селективным давлением иммунизации [148], а также улучшение диагностики за счет широкого применения молекулярно-генетических методов [149, 216, 217]. Кроме того, были показаны возможности по применению генодиагностики для одновременной детекции *B.pertussis* и возбудителей других воздушно-капельных инфекций [216, 220, 230].

Массовая специфическая вакцинопрофилактика коклюша в РФ привела к значительному улучшению эпидемиологической обстановки и показала ее социально-экономическую значимость для поддержания санитарно-эпидемиологического благополучия по этой инфекции в нашей стране [82, 106,

112].

По данным отечественных исследователей [40, 49, 50, 55, 95, 107, 106, 108, 109, 132, 133], в России в течение последних 30 лет было отмечено несколько периодов активизации эпидемического процесса коклюшной инфекции. Так, в 1980-е годы охват детей в возрасте до 1 года вакцинацией против коклюша значительно снизился (до 30 - 35 %) по причине роста числа медицинских отводов [50, 95, 108, 109]. Число непривитых в структуре заболевших возросло с 25 % (1970-е годы) до 65,4 % (в 1980-е годы), что привело к подъему заболеваемости [8, 95]. В 1990-е годы охват прививками против коклюша детей в возрасте до 1 года не превышал 78 % и сохранялся высокий уровень заболеваемости – показатель заболеваемости (ПЗ) составил 32,8 на 100 тыс. населения [8, 95]. Этот период также характеризовался перераспределением значимости возрастных групп в структуре заболевших: заболеваемость сместилась с возрастной группы детей до 2 лет на организованных детей 3 - 6 лет. При этом среди детей 4 - 12 месяцев регистрировалось увеличение среднетяжелых и тяжелых клинических форм коклюша – с 65 % до 84 % [109]. Ежегодно фиксировали от 2 до 10 случаев летальных исходов [8]. В 1990-е годы зарегистрировано 69 случаев смерти от коклюша [8].

Благодаря достижению в 2003 году высокого охвата (95 %) вакцинацией и ревакцинацией АКДС-вакциной детей и последующему его поддержанию, заболеваемость коклюшем в РФ в течение последних пяти лет стабилизировалась (ПЗ составил 3,0 - 5,0 на 100 тыс. населения) [118]. Во внутригодовой динамике наблюдается сглаживание цикличности, что свидетельствует о снижении роли сезонных факторов в поддержании эпидемического процесса коклюша. Восприимчивость к данной инфекции сохраняется высокой у детей до 1 года, не привитых, а также утративших иммунитет с возрастом [4, 20, 92, 93, 109, 113, 164]. Ежегодно регистрируются локальные вспышки с формированием очагов разной интенсивности в семьях и организованных детских коллективах [7, 8, 90]. В очагах коклюшной инфекции прививки контактным лицам не проводятся, а противоэпидемические мероприятия в соответствии с санитарно-

эпидемиологическими правилами СП 3.1.2.3162-14 «Профилактика коклюша» [104] сводятся к медицинскому наблюдению и выявлению кашляющих детей для проведения бактериологического или молекулярно-генетического обследования с диагностической целью [26, 30, 104]. Следует отметить тот факт, что источником инфекции, как правило, являются подростки или взрослые, у которых коклюш протекает в легкой или стертой форме [75, 96, 97, 221, 229, 248]. При этом среди практически здоровых людей, по данным российских и зарубежных исследователей, участились случаи выявления бактерионосителей возбудителя коклюша [179, 196, 247].

1.1.1. Микробиологическая характеристика бактерий рода *Bordetella*, вызывающих коклюш и коклюшеподобные заболевания

Бактерии *B.pertussis* впервые удалось выделить в 1906 году бельгийскими учеными J. Bordet и O. Gengou из мокроты больного, собранной в конце приступа спазматического кашля при культивировании на обогащенной питательной среде [31].

Возбудитель коклюша относится к роду *Bordetella* (семейство *Alcaligenaceae*, порядок *Burkholderiales*, класс *Betaproteobacteria*), который включает восемь видов: *B.pertussis*, *B.parapertussis*, *B.bronchiseptica*, *B.avium*, *B.hinzii*, *B.holmesii*, *B.trematum* и *B.petrii* [157, 177, 238, 239, 246, 249]. Помимо выше перечисленных микроорганизмов в XXI веке были открыты еще четыре вида, пока не включенные в классификацию: *B.ansorpii*, *B.bronchialis*, *B.flabilis* и *B.sputigena* [180, 240]. Микробиологическая дифференциация бактерий рода *Bordetella*, являющихся возбудителями респираторных заболеваний человека и теплокровных животных, в настоящее время представляет определенную сложность, которая обусловлена слабой биохимической активностью данных патогенов, а также высокой гомологией их геномов.

Микроорганизмы рода *Bordetella* представляют собой мелкие (0,2 - 0,5 x 0,5 - 2,0 мкм) грамотрицательные палочки, которые имеют нежную капсулу, располагаются поодиночке, парами или короткими цепочками. Некоторые виды

обладают подвижностью. Все представители данного рода являются неспорообразующими аэробами. Наряду с этим они неоднородны по культуральным и биохимическим свойствам. Бордетеллы относятся к медленно растущим микроорганизмам и требовательны к условиям культивирования: им необходимы 130 - 150 мг % аминного азота, кровь, дрожжевой экстракт, никотиновая кислота, аминокислоты (цистин, пролин, метионин, серин, глютамин и др.). При этом бактерии вида *B.pertussis* считаются наиболее прихотливыми.

Классической средой для роста микроорганизмов рода *Bordetella* является среда Борде-Жангу с добавлением 10 - 15 % дефибринированной крови. Позднее были предложены синтетические и полусинтетические среды, в частности КУА и Бордетелагар. На плотных питательных средах бактерии *B.pertussis* образуют гладкие, влажные, выпуклые, круглые, четко контурированные, блестящие мелкие колонии (1 - 2 мм) серого цвета с жемчужным, серебристым или беловатым оттенком (при росте на КУА) или серовато-кремового / серовато-белого цвета (при росте на Бордетелагаре), легко снимающиеся с поверхности среды, рост которых наблюдается, как правило, через 48 - 72 часа, но в некоторых случаях может затянуться до пяти суток. Наряду с этим средняя скорость роста на агаровых средах для *B.parapertussis* и *B.bronchiseptica* составляет 24 - 48 и 18 - 24 часов, соответственно.

Бактерии *B.pertussis* характеризуются большим количеством факторов патогенности, которые подразделяются на токсины и адгезины. К токсинам относят КТ, АЦТ, трахеальный цитотоксин (ТЦТ), дермонекротический токсин (ДНТ), липополисахаридный эндотоксин (ЛПС); к адгезинам – филаментозный гемагглютинин (ФГА), агглютиногены, фимбрии, белок наружной мембраны пертактин, белки BrkA и BrkB. КТ является важнейшим фактором патогенности *B.pertussis*, действие которого вызывает основные патоморфологические изменения в эукариотических клетках макроорганизма, за счет чего ему и отводится ключевая роль в патогенезе заболевания [137, 139, 152, 171, 184, 185, 196]. Также в ходе многочисленных исследований, проводимых более чем в 30 странах мира, было установлено, что возбудитель коклюша подвержен

генотипической изменчивости. К настоящему времени описан полиморфизм 16 генов. При этом наиболее выраженные изменения были выявлены в структуре 6 генов: *ptxA*, *ptxC*, *ptxP*, *prn*, *fim2*, *fim3* и *tcfA* [10, 19, 65, 142, 178, 184, 185, 234].

1.1.2. Методы лабораторной диагностики коклюшной инфекции

В связи с трудностью клинического распознавания коклюша на этапе оказания амбулаторно-поликлинической помощи населению, проблема лабораторной диагностики приобрела особую значимость в современных условиях. В последние годы в структуре заболеваемости увеличивается доля легких и стертых форм клинического течения среди детей старшей возрастной группы и взрослых, а также форм коклюша, смешанных с вирусно-бактериальными респираторными инфекциями, что значительно затрудняет диагностику, особенно на ранних стадиях развития болезни [6, 9, 20, 93, 97, 98, 196, 242]. При постановке диагноза учитываются характерные клинические проявления заболевания, данные эпидемиологического анамнеза, а также результаты лабораторных исследований [25, 91, 104]. Случаи бактерионосительства *B.pertussis* устанавливают на основании выделения культуры возбудителя коклюша или его ДНК. Бактерионосителями являются практически здоровые лица, активно выделяющие возбудителя инфекционного заболевания [104].

В соответствии с действующими нормативными документами [26, 30, 104], лабораторное обследование лиц с подозрением на коклюш проводят либо с диагностической целью, либо по эпидемическим показаниям для своевременного выявления больных. На исследование направляют каждого ребенка, кашляющего в течение семи дней и более, а также каждого взрослого при подозрении на коклюш и / или при наличии контакта с больным коклюшем, работающих в организациях / учреждениях открытого / закрытого типа с временным / постоянным пребыванием детей. Согласно действующим санитарно-эпидемиологическим правилам [104] лабораторная диагностика коклюша проводится с помощью бактериологического, серологического и молекулярно-

генетического методов исследования, выбор которых определяется сроком заболевания. Бактериологическое исследование осуществляют в течение первых 2 - 3-х недель от начала заболевания. Молекулярно-генетический метод исследования с помощью ПЦР наиболее эффективен на 1 - 4-й неделях от начала заболевания. Серологическую диагностику коклюша методом ИФА применяют, начиная с 3-й недели заболевания, для определения уровня специфических противокклюшных антител классов IgA, IgM, IgG.

Вместе с тем следует отметить, что разработке методов лабораторной диагностики коклюшной инфекции уделяется пристальное внимание, как в нашей стране, так и за рубежом. Анализ литературных данных показал этапность создания методов лабораторной диагностики, которая осуществлялась в двух направлениях:

- обнаружение возбудителя или его ДНК / антигенов в исследуемом биологическом материале, полученном от пациентов;
- выявление специфических антител к возбудителю коклюша в исследуемых биологических жидкостях (сыворотке крови человека, слюне).

Первое направление лабораторной диагностики представлено группой прямых методов, к которой относят бактериологический, молекулярно-генетический и экспресс-методы (РНИФ, РКОА, ИФА).

Второе направление включает в себя группу непрямых методов и представлено многочисленными иммунологическими реакциями: реакция связывания комплемента (РСК), РА, реакция пассивной гемагглютинации (РПГА), РНГА, реакция латекс-микроагглютинации, ИФА.

Бактериологический метод считается «золотым стандартом» в лабораторной диагностике коклюшной инфекции. Данный метод предусматривает выделение возбудителя заболевания из патологического материала при его посеве на селективные плотные питательные среды, дальнейшее культивирование с целью накопления чистой культуры микроорганизма и проведение идентификации по культурально-

морфологическим, тинкториальным, биохимическим и антигенным свойствам. Однако бактериологическое исследование имеет целый ряд недостатков [29, 123]. Во-первых, низкая эффективность выделения *B.pertussis* в практических условиях, которая не превышает 10 % - 20 %, что обусловлено как биологическими особенностями самого возбудителя (требователен к качеству питательных сред и условиям культивирования) [111, 123], так и недостатками на преаналитическом этапе исследования (допускаемые медицинскими работниками ошибки технического характера при заборе патологического материала, несоблюдение условий и правил транспортирования клинического материала). Во-вторых, само исследование требует продолжительного времени (от 5 до 8 дней) и высокой квалификации персонала. В-третьих, так как бактерии *B.pertussis* биохимически малоактивны, то возникают сложности на этапе идентификации микроорганизма при изучении его ферментативных свойств. Кроме того, сероидентификацию (серотипирование) коклюшного микроба в современных условиях провести невозможно по причине отсутствия с 2013 года производства коммерческих наборов с диагностическими агглютинирующими сыворотками. Наряду с этим, результативность этой диагностики зависит и от сроков обследования пациентов от начала заболевания и приема антибактериальных препаратов до обследования [250]. Поэтому применение бактериологического исследования ограничено его использованием в период спазматического кашля (2 - 3-я недели болезни) и до начала приема антибактериальных препаратов. Но, несмотря на перечисленные недостатки, бактериологический метод позволяет проводить мониторинг штаммов возбудителя коклюша с оценкой их фенотипических, в том числе определение чувствительности к антибиотикам, и молекулярно-генетических свойств при осуществлении эпидемиологического надзора за коклюшной инфекцией.

Как было отмечено выше, правильность проведения преаналитического этапа исследования существенно влияет на результативность лабораторной диагностики и, в большей мере, именно бактериологической. Поскольку *B.pertussis* колонизирует клетки реснитчатого эпителия верхних и нижних

дыхательных путей, то материал для бактериологического посева забирается с участка респираторного тракта, выстланного цилиарным эпителием. Таким образом, в качестве исследуемого объекта выступает осаждающаяся при кашле на задней стенке ротоглотки слизь из верхних дыхательных путей.

В России забор материала для бактериологического исследования производится двумя заднеглочными тампонами – сухим и влажным [26, 30, 104]. Это объясняется тем, что при взятии материала с помощью сухого тампона происходит стимулирование и усиление кашля, что, в свою очередь, повышает вероятность содержания жизнеспособного коклюшного микроба на влажном тампоне. Клинический материал с сухого тампона засевают на селективную питательную среду у «постели больного», а с влажного – после доставки его в лабораторию. Реже применяется метод «кашлевых пластинок», который используется только при проведении обследования с диагностической целью и при наличии кашля у пациента.

Согласно рекомендациям ВОЗ и CDC материалом для исследования является мазок со слизистой нижнего носового хода, для взятия которого используется назофарингеальный тампон, или носоглоточный аспират [149, 251]. На наш взгляд, такой способ забора материала является технически более сложным и наиболее травматичен для детей раннего возраста. Отечественными исследователями было проведено сравнение эффективности бактериологического метода в зависимости от способа взятия материала с помощью назофарингеального и заднеглочного тампонов [5]. Анализ показал, что использование только одного из способов взятия материала уменьшает высеваемость *B.pertussis* на 8,3 %, а одновременное применение обоих способов – повышает эффективность бактериологического метода, но приводит к увеличению стоимости исследования.

Следует отметить тот факт, что большое значение имеют сроки и температурный режим транспортировки исследуемого материала в лабораторию с момента его взятия. Оптимальным считается доставка биологических проб в течение 2 - 4 часов с поддержанием температуры на уровне 37 °С [26, 30]. При

несоблюдении условий транспортирования процент положительных результатов бактериологического исследования существенно снижается за счет утраты коклюшным микробом жизнеспособности [205]. Вопрос о целесообразности использования транспортных сред на этапе доставки патологического материала в лабораторию в настоящее время остается открытым.

В соответствии с действующим законодательством РФ с целью культивирования и выделения коклюшного микроба допускается использование любых питательных сред (как отечественного, так и зарубежного производства), прошедших официальную регистрацию и разрешенных к применению на территории России, приготовление которых осуществляется строго в соответствии с инструкцией производителя. В настоящее время в РФ основными питательными средами для выделения и культивирования бактерий *B.pertussis* являются Бордетелагар и КУА (казеиново-угольный агар), а в других странах – среда Regan-Lowe (угольно-красный агар) [168, 218].

С целью улучшения качества питательных сред допускается применение дополнительных факторов роста. Самым оптимальным считается добавление стерильной дефибринированной крови (бараньей или крупного рогатого скота) [169]. Также следует отметить, что по данным различных авторов [51, 168, 170], для повышения эффективности бактериологического метода в качестве ингибитора посторонней микрофлоры целесообразно использовать цефалексин, поскольку добавление регламентированного нормативными документами количества пенициллина подавляет рост *B.pertussis* в низких концентрациях. В частности, Н.Н. Курова и соавт. [51] показали, что при включении в питательную среду таких факторов роста, как СКРС (5 %) и среда № 199 (1 %), и использовании цефалексина в качестве ингибитора посторонней микрофлоры, эффективность бактериологического метода увеличивается в 7 раз.

Другими методами прямой диагностики коклюша являются **экспресс-методы**, которые позволяют в течение нескольких часов выявить поверхностные антигены *B.pertussis* в изучаемом материале. На данный момент отечественными исследователями было предложено несколько способов экспресс-диагностики

возбудителя коклюша, в основе которых лежит либо РНИФ, либо РКОА, либо ИФА.

Так, в конце 1980-х годов Н.Ф. Амфитеатрова и соавт. [2, 3] разработали непрямой иммунофлюоресцентный метод (НИФ) выявления коклюшных микробов в материале с задней стенки ротоглотки, который был рекомендован для использования в практическом здравоохранении не только с целью экспресс-диагностики коклюша, но и для идентификации выделенных в процессе бактериологического исследования подозрительных культур. Также в качестве исследуемого материала использовали смывы 5 - 7 суточных первичных посевов со среды выращивания при отрицательных результатах бактериологического обследования. Предложенный метод позволял получить окончательный результат уже через 5 часов от начала исследования и показал высокую эффективность при обследовании пациентов с различным вакцинальным статусом, на разных сроках болезни и на фоне приема антибактериальных препаратов [105]. Наряду с этим, данный способ имел некоторые недостатки: является трудоемким, а также был рекомендован к применению только в рамках комплексного обследования больных коклюшем, которое предполагало обязательное проведение бактериологического исследования. НИФ метод предусматривал визуальную оценку полученных в ходе исследования результатов. Опытный препарат просматривали в люминесцентном микроскопе не менее чем в 50 полях зрения. При наличии в образце трех и более бактериальных клеток с ярким изумрудно-зеленым свечением по периферии результат считали положительным. Если в препарате с отрицательным контрольным образцом выявляли аналогично светящиеся микробные клетки, то результат считали отрицательным. Таким образом, при проведении данного исследования была велика вероятность того, что у специалиста могли возникнуть сложности на этапе интерпретации результатов.

Через 15 лет О.С. Калиногорская и соавт. [32, 85] предложили метод ранней диагностики коклюша на основе РНИФ, с помощью которого в изучаемом субстрате одновременно выявляли поверхностные антигены *B.pertussis* и

специфические секреторные IgA. В качестве материала для исследования рекомендовано было использовать браш-биоптаты слизистой с задней стенки ротоглотки (гортанно-глоточные смывы), так как при получении образцов данным способом количество содержащихся в них эпителиальных клеток достигает 1 000 000 в 1 мл. С помощью экспресс-диагностики коклюша на основе РНИФ уже через 2 - 2,5 часа от начала исследования удавалось получить окончательный результат. Так же, как и у предыдущего метода, показана высокая эффективность при обследовании пациентов с различным вакцинальным статусом, на разных сроках болезни и на фоне антибиотикотерапии. Помимо этого, предлагаемый способ позволял оценить не только морфофункциональное состояние слизистой ротоглотки, но и течение коклюша у детей [33, 36]. Однако аналитическая чувствительность этого метода варьирует в широком диапазоне, а проведение многочисленных манипуляций, выполняемых в определенной последовательности, в свою очередь, увеличивает вероятность совершения ошибок, связанных с человеческим фактором. На заключительном этапе исследования, во время просмотра опытного препарата в люминесцентном микроскопе, осуществляется его комплексная оценка с учетом таких показателей как яркость, цвет и локализация специфической флюоресценции, а также количество адгезированных на эпителиоцитах микробных клеток в поле зрения. Поскольку интерпретация результатов основывается на визуальной оценке интенсивности свечения с использованием четырехплюсовой системы, то к выполнению данного исследования следует допускать лишь высококвалифицированных специалистов.

В это же время Е.В. Гореликова и соавт. [22, 110] в качестве экспресс-метода лабораторной диагностики коклюша предложили способ определения антигенов микроба *B.pertussis* в биологическом материале, применяя РКОА с диагностическим коагглютинационным реагентом (КОА-реагент). В качестве материала для исследования использовался смыв с заднеглоточного тампона, которым собиралась слизь с задней стенки ротоглотки. Также разработанный метод можно применять с целью идентификации выделенных в процессе

бактериологического исследования подозрительных культур. Способ получения коклюшного диагностического препарата, используемого в РКОА, предложен В.Н. Сперанской и соавт. [86]. КОА-реагент содержит взвесь инаktivированных стафилококковых клеток, на которых к белку А фиксированы специфические Ig, позволяющие связывать гомологичный антиген. При использовании этого метода результат анализа получали в течение 1 - 3 минут от начала исследования. В биологическом материале с помощью предлагаемого способа выявляются антигены как жизнеспособных, так и нежизнеспособных коклюшных микробов. В связи с чем, РКОА целесообразно использовать у больных, которые на момент проведения обследования принимают антибактериальные препараты. За счет образования видимых агглютинатов, формирующихся из клеточной основы (стафилококковых клеток) диагностического реагента в присутствии гомологичного антигена, обеспечивается визуализация результатов реакции, оценка которых проводится с использованием четырехплюсовой системы. При этом аналитическая чувствительность метода варьирует в широком диапазоне, а авторы изобретения рекомендуют использовать РКОА при диагностике коклюша в качестве дополнительного метода.

Следующим этапом развития идентификации возбудителя было применение ИФА для выявления антигенов *B.pertussis* в клиническом материале.

В 1990-х годах была создана тест-система на основе метода ИФА для обнаружения КТ в носоглоточной слизи [37]. У детей с коклюшем собирали патологический материал с помощью носоглоточного тампона, который затем погружали в пробирку с жидкой средой обогащения и культивировали в течение 48 часов и далее ставили ИФА. Предложенная методика позволяла в течение трех рабочих дней получить результат анализа и сократить, по сравнению с бактериологическим методом, продолжительность исследования в два раза.

Через 10 лет Н.Н. Курова и соавт. [51] разработали тест-систему ИФА для экспресс-диагностики возбудителя коклюша. Биологический материал собирали с задней стенки ротоглотки с помощью заднеглоточного тампона. В качестве исследуемого субстрата использовали смыв с тампона. Применение

разработанной тест-системы дает возможность в течение одного рабочего дня получить лабораторное подтверждение диагноза «Коклюш» при обследовании больных на ранних сроках заболевания. Однако диагностическая чувствительность этой тест-системы для обнаружения антигенов коклюшного микроба в патологическом материале составила 72,4 %. Также исследователям не удалось разработать технологию производства набора реагентов и, как следствие, внедрить в практическое здравоохранение эту методику.

За рубежом применение иммунологических методов, позволяющих идентифицировать *B.pertussis* путем выявления его корпускулярных антигенов в изучаемом материале, широкого распространения при диагностике коклюша не получило. При этом их использование в настоящее время допускается только в качестве дополнительных способов верификации диагноза [199, 217, 237].

Вышеперечисленные экспресс-методы в настоящее время используются только в научных целях. Их применение в практическом здравоохранении затруднительно, так как реагенты, необходимые для проведения этих исследований, не зарегистрированы как изделия медицинского назначения.

Серологические методы лабораторной диагностики коклюшной инфекции основываются на определении уровня специфических антител (IgM, IgA, IgG) к определенным антигенам / группам антигенов *B.pertussis*.

РА, РПГА и РНГА позволяют выявить в биологическом материале антитела, индуцированные корпускулярными антигенами *B.pertussis*. Эти реакции длительное время использовались для оценки постинфекционного и поствакцинального иммунитета. Основным и определяющим их недостатком является низкая чувствительность. При этом в этих реакциях выявляется только суммарная популяция антител. В настоящее время в большинстве стран мира эти методы признаны устаревшими. В РФ используются для оценки поствакцинального иммунитета в рамках проведения серологического мониторинга состояния коллективного иммунитета к коклюшной инфекции [83].

В 1980-е годы широкое распространение получил ИФА для выявления антител к возбудителю коклюша [166, 202, 243]. Во многих странах мира

разработаны и сконструированы различные варианты тест-систем ИФА, основанные на раздельном или одновременном выявлении в исследуемом материале антител классов IgM, IgA и IgG [158, 165, 219]. В качестве антигенов используются различные компоненты коклюшного микроба: дезинтегрированные химическим, физическим или механическим способами бактериальные клетки [243], комплексы антигенов [28, 166] или отдельные антигены (КТ, ФГА, пертактин, фибриальные белки, ЛПС) возбудителя [28, 166, 202]. Оценку уровня сывороточных антител проводят однократно [224] или двукратно при исследовании парных сывороток, взятых с интервалом в 10 - 14 дней [104].

Как правило, определение уровня антител методом ИФА осуществляют в сыворотке крови человека. В некоторых случаях исследуемым материалом является слюна больного. Чувствительность и специфичность ИФА, основанного на выявлении антител класса IgG к КТ в слюне, составили 79,7 % и 96,6 % соответственно [188]. При этом определение уровня антител класса IgA к КТ и ФГА в слюне больного имеет низкое диагностическое значение [253].

В настоящее время использование ИФА для выявления антител IgA, IgG, IgM в сыворотке крови в практическом здравоохранении РФ позволяет подтвердить диагноз коклюша при легких и стертых формах заболевания, информативно для непривитых детей старше 1 года и взрослых [5, 100]. При этом недостатками серологической диагностики является то, что этот метод используется в основном ретроспективно (с 3-й недели заболевания), существует сложность интерпретации диагноза на основе полученных данных у привитых и детей первого полугодия жизни, у которых на ранних сроках болезни результаты серодиагностики могут быть отрицательными и лишь обследование в динамике (на 4 - 5-й неделях болезни) может подтвердить диагноз [25, 99]. Кроме того, на данный момент отсутствуют зарегистрированные отечественные ИФА тест-системы.

Молекулярно-генетические методы лабораторной диагностики коклюша стали применяться в различных странах мира с конца 1980-х годов [140, 154, 159, 162, 165, 172, 194, 226, 235]. По данным многочисленных источников,

чувствительность метода ПЦР при обнаружении ДНК *B.pertussis* в исследуемом материале варьирует от 73 % до 100 % [156, 183, 187]. При этом унифицированной ПЦР тест-системы для диагностики коклюша на сегодняшний день не существует, так как различия в выборе генов-мишеней и систем для их детектирования препятствуют стандартизации метода и созданию единой концепции диагностики коклюша с помощью амплификационных технологий. Тем не менее, применение методов генодиагностики обеспечивает быструю и раннюю диагностику коклюша и эффективно как у пациентов с различными формами клинического течения болезни, так и у пациентов, обследование которых проводится через три недели после начала кашля и / или на фоне антибиотикотерапии и не зависит от вакцинального статуса.

В настоящее время предложены разные ПЦР-технологии (nested-ПЦР, ПЦР-PB), с помощью которых возможно проводить идентификацию различных участков генома *B.pertussis*: гена КТ [140, 162, 172, 194, 225, 226], порина [185, 186], АЦТ [154], повторяющихся последовательностей хромосомы [138, 159, 165, 235, 236]. Опыт применения ПЦР для идентификации возбудителей бордетеллез показал, что наиболее точные результаты получают при использовании праймеров, расположенных в промоторной зоне КТ, повторяющихся последовательностях IS481 и IS1001 или гене *суаА* [190]. На данный момент многие исследователи ведут работу по созданию мультиплексных диагностических тест-систем, позволяющих выявлять в биологическом материале и дифференцировать до вида представителей рода *Bordetella* путем одновременной амплификации нескольких специфических ДНК-матриц и последующей их детекцией в режиме реального времени, что увеличивает специфичность исследования [74, 101, 119, 175, 181, 193, 231].

На территории РФ официально зарегистрирован лишь один набор реагентов для выявления и дифференциации ДНК возбудителей коклюша, паракоклюша и бронхисептикоза в биологическом материале методом ПЦР-PB с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Bordetella* multi-FL» [101, 102]. Одной из мишеней в этой тест-системе является область гена *ptxA*,

кодирующего КТ, которая имеется в геномах *B.pertussis*, *B.parapertussis* и *B.bronchiseptica*, вторая мишень – уникальна для *B.pertussis*, третья – имеется только в геноме *B.bronchiseptica*. Также в тесте для учета эффективности всех этапов ПЦР-анализа используется и четвертая мишень – внутренний контроль. При этом вывод о том, что в образце присутствует ДНК *B.parapertussis*, можно сделать при наличии положительного результата амплификации по области гена *ptxA*, кодирующего КТ, и отрицательного по областям, специфичным для геномов *B.pertussis* и *B.bronchiseptica*. Кроме того, результаты ПЦР-исследования по выявлению и идентификации возбудителей коклюша, паракоклюша и бронхисептикоза часто интерпретируются как «Обнаружена ДНК одного из представителей рода *Bordetella*» (многолетние данные, полученные в ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора). В таких случаях для видовой идентификации требовалось повторное взятие клинического материала и выполнение всех этапов ПЦР-исследования, что приводило к увеличению стоимости анализа или было невозможно по причине выписки пациента из стационара.

Также следует учитывать и тот факт, что применение тест-систем в формате ПЦР-РВ сопряжено с необходимостью наличия высокотехнологичного приборного оснащения, что нередко представляет трудности для лабораторий разного уровня финансирования. Поэтому одним из перспективных направлений является разработка тест-систем, направленных на выявление ДНК *B.pertussis*, являющейся наиболее патогенной среди всех бордетелл и вызывающей тяжелые формы заболевания с летальным исходом, использование которых не требует применения дорогостоящего оборудования.

Коллективом авторов ФГБУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ в 2010-х годах была разработана видоспецифичная тест-система на основе ПЦР-РВ, позволяющая выявлять в клинических образцах *B.pertussis*, содержащие интеграции IS481 и IS1002 в опероне вирулентности *bvgAS* [34, 35, 75, 76]. В качестве исследуемого субстрата используется смыв с носоглоточного тампона. С помощью предложенной тест-системы ПЦР-РВ осуществляют диагностику

типичных и атипичных форм коклюша, бактерионосительства и изучают изменения фазового состава популяции возбудителя. Также результаты исследования могут быть полезны для определения тактики лечения заболевания, особенно, в случаях атипичных форм коклюша, затяжного течения и смешанных с коклюшем респираторных инфекций.

В последнее время популярность приобрели технологии на основе изотермической амплификации, одной из которых является LAMP [209]. Метод петлеобразующей изотермической амплификации, обладающий высокой чувствительностью, специфичностью и амплификационной эффективностью, был применен и при диагностике коклюша [143, 174, 209, 210]. Однако предложенный зарубежными исследователями вариант выявления ДНК *B.pertussis* апробирован только на штаммах чистых культур, а во время проведения испытаний на ограниченном количестве клинических образцов были получены ложноположительные результаты. Кроме того, способ предусматривал использование дорогостоящих реагентов, что ограничивало его широкое применение в нашей стране.

Коллективом авторов ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского разработан способ и набор для ускоренной диагностики коклюша [12, 13, 14, 87]. Метод основан на технологии изотермической амплификации и позволяет выявить ДНК *B.pertussis* в клиническом материале без этапа выделения чистой культуры микроорганизма в течение 9 - 10 часов [87]. Разработанный метод включал проведение следующих этапов: взятие клинического материала из ротоглотки больного, выделение ДНК, проведение ПЦР и детекция продуктов амплификации методом электрофореза. При этом пробоподготовка клинического материала заключалась в выполнении нескольких этапов: первичный прогрев образцов при 95 °С в течение 30 мин., обработка лизоцимом при 37 °С ± 2 °С в течение 30 мин. и протеиназой К при 70 °С в течение 2 часов. Выделение ДНК осуществляли с помощью лизирующего раствора при 65 °С в течение 5 мин. с последующей обработкой сорбентом при комнатной температуре в течение 7 мин., отмывочным раствором и элюировании ТЕ-буфером при 65 °С в течение 5 мин. Постановку

ПЦР осуществляли с использованием ПЦР реакционной смеси, включающей 10× ПЦР буфер с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM dNTP, 25 mM MgCl_2 , 5 % DMSO, три пары праймеров (BP - F3 5'-CCGCATACGTGTTGGCA-3' и BP - B3 5'-TGCGTTTTGATGGTGCCT-3', BP - FIP 5'-TTGGATTGCAGTAGCGGGATGTGCATGCGTGCA GATTCGTC-3' и BP - BIP 5'-CGCAAAGTCGCGCGATGGTAACGGATCACACC ATGGCA-3', BP - LF 5'-ACGGAAGAATCGAGGGTTTTGTAC-3' и BP - LB 5'-GT CACCGTCCGGACCGTG-3') и Bst ДНК-полимеразу. Амплификацию проводили при 65 °C в течение 60 мин., затем при 80 °C в течение 2 мин. Детекцию результатов осуществляли с помощью электрофореза ПЦР-продуктов с последующим сопоставлением полученных фрагментов ДНК с ДНК контрольных образцов штамма *B.pertussis*. При наличии специфического светящегося профиля, аналогичного контрольному образцу, образец ДНК регистрировали как содержащий ДНК штамма *B.pertussis*. В процессе дальнейших исследований были выявлены основные недостатки способа: трудоемкость и длительность проведения этапа пробоподготовки, требующего применения большого количества реагентов, что, в свою очередь, увеличивает не только продолжительность самого исследования, но и его стоимость (этап экстракции ДНК из клинического образца по времени занимал 3,5 - 4 часа). Общая продолжительность исследования составляла 9 - 10 часов от начала исследования и эффективность метода не превышала 84,9 %.

В 2017 году, учитывая все биологические особенности возбудителей коклюша, паракоклюша и бронхисептикоза, большим коллективом авторов с нашим участием подготовлен проект новых методических указаний, регламентирующих проведение лабораторной диагностики при этих инфекциях с конкретными алгоритмами выполнения бактериологических, молекулярно-генетических и серологических исследований.

1.2. Современное состояние лабораторной диагностики дифтерийной инфекции

Дифтерия – острая бактериальная инфекция, характеризующаяся развитием

фибринозного воспаления в месте «входных ворот», явлениями общей интоксикации и специфическими признаками поражения сердечно-сосудистой, нервной и выделительной систем [48, 117]. Вызывается грамположительными бактериями *Corynebacterium diphtheriae*, продуцирующими ДТ, и сопровождается высокой летальностью, которая обусловлена возникновением тяжелых осложнений [41, 48, 67, 117]. Источником инфекции является больной или носитель токсигенных коринебактерий [43, 48, 67, 103, 117]. Передача возбудителя происходит, как правило, воздушно-капельным путем от человека к человеку [48, 67, 103, 117].

Несмотря на успехи вакцинопрофилактики, дифтерия по-прежнему является серьезной проблемой общественного здравоохранения и причиной детской смертности в странах с недостаточным уровнем охвата населения профилактическими прививками. По данным ВОЗ и CDC в Индии, Индонезии, Пакистане, Иране, Непале, Гане, Бразилии, Гаити, Доминиканской Республике дифтерия по сей день остается эндемичным заболеванием, течение которого характеризуется многообразием клинических форм и различной локализацией [145, 146]. Также в течение последних пяти лет регистрируются локальные вспышки в Таиланде, Лаосе и странах Африки [135]. Наряду с этим в странах Европы стали появляться сообщения о случаях заболевания дифтерией среди мигрантов и туристов, посетивших эндемичные по этой инфекции территории [135].

Широкая иммунизация детей АКДС-вакциной против дифтерии в России начала проводиться с 1959 года. Достигнутые результаты подтвердили значимость массовой специфической иммунопрофилактики среди населения для поддержания в стране санитарно-эпидемиологического благополучия по этой инфекции [95].

В России в течение последних 30 лет были отмечены два периода усиления эпидемического процесса [67, 68, 69, 71, 72, 73, 116, 117, 129, 130, 131]. Так, с 1978 года появились предвестники первого подъема заболеваемости, пик которого регистрировался в 1984 году (ПЗ составил 0,9 на 100 тыс. населения,

показатель смертности (ПС) – 0,001 на 100 тыс. населения) [67, 117]. Следует отметить тот факт, что, начиная с 1980-х годов, произошло изменение структуры заболевших. Впервые подъем был обусловлен преимущественным заболеванием взрослых, в основном в возрасте 20 - 39 лет [114]. С 1990 года в России начался второй периодический подъем заболеваемости, пик которого пришелся на 1994 год (ПЗ составил 26,8 на 100 тыс. населения, ПС – 0,8 на 100 тыс. населения) [67, 72, 192]. Подъем заболеваемости был обусловлен рядом социальных факторов и недостатками в выполнении профилактических мероприятий. Во-первых, накоплением неиммунных лиц в результате низкого уровня охвата прививками детей раннего возраста и взрослых, в частности и медицинских работников [67, 72, 131, 192]. Во-вторых, миграционными процессами с территориями стран бывшего СССР, неблагополучных по заболеваемости дифтерией [67, 72, 192]. Кроме того, ухудшению эпидситуации по дифтерии способствовал экономический кризис, который привел к ухудшению социальных условий жизни значительной части населения. За период с 1990 по 1996 годы заболело 111 144 человека (35 928 детей, 15 776 подростков и 59 450 взрослых), умерло 3 047 человек (729 детей, 37 подростков и 2 281 взрослых) [131]. В большинстве случаев (95 %) умершие не были привиты против дифтерии [125, 192, 244].

В настоящее время в условиях поддержания высокого уровня привитости (95 % и более) достигнута стабилизация заболеваемости. Регистрируются единичные случаи заболевания и бактерионосительства (ПЗ составляет 0,01 и 0,02 на 100 тыс. населения, соответственно) [131]. При этом не регистрируются как вторичные случаи в очагах, так и летальные исходы [131]. В структуре клинических форм преобладают легкие локализованные формы дифтерии [131].

Однако актуальность проблемы дифтерийной инфекции в условиях единичных случаев заболеваний по сей день сохраняется [68, 69, 73, 120, 121, 129, 130]. Во-первых, утрачивается опыт клинического и бактериологического распознавания дифтерии. Во-вторых, сохраняется резервуар возбудителя в форме бактерионосительства. В-третьих, эпидемический процесс протекает среди привитого населения. При этом продолжают регистрировать случаи заболеваний

как среди непривитых детей, так и среди взрослых (на данный момент около трех миллионов человек не привиты против дифтерии) [131]. Также следует отметить тот факт, что в условиях спорадической заболеваемости главная роль в распространении инфекции отводится бактерионосителям токсигенных коринебактерий, поскольку они являются резервуаром возбудителя и поддерживают его существование как биологического вида.

1.2.1. Микробиологическая характеристика бактерий рода *Corynebacterium*, вызывающих дифтерию и дифтериеподобные заболевания

Бактерии *C.diphtheriae* впервые были обнаружены в полученных от больных срезах дифтерийных пленок и описаны в 1883 году немецким микробиологом Е. Klebs. В 1884 году немецкий врач и микробиолог F. Löffler выделил ее в чистой культуре [48, 117].

Возбудитель дифтерии относится к роду *Corynebacterium* (семейство *Corynebacteriaceae*, подпорядок *Corynebacterineae*, порядок *Actinomycetales* класс *Actinobacteria*), включающему большое количество коринеформных бактерий, являющихся представителями микробиома человека, патогенными и условно-патогенными микроорганизмами, которые выделяются при различных воспалительных патологических состояниях [46, 153, 173, 208, 214].

К патогенным бактериям, вызывающим инфекционные заболевания у человека, относятся *C.diphtheriae*, *C.ulcerans* и *C.pseudotuberculosis* [52, 53, 176, 182, 204, 223]. При этом *C.ulcerans* и *C.pseudotuberculosis* также способны продуцировать токсин, подобный дифтерийному, и являются потенциально опасными не только для человека, но и для животных (крупный и мелкий рогатый скот, лошади, домашние животные) [52, 53]. В первом случае данные микроорганизмы провоцируют развитие дифтериеподобных поражений ротоглотки и мягких тканей, а во втором – гнойно-воспалительных заболеваний. Начиная с 1990-х годов, в зарубежной литературе появились сообщения о выделении *C.ulcerans* от пациентов с ларингитами тяжелого течения при наличии

налетов псевдомембранозного характера [176, 182, 223]. Также участились случаи выделения токсигенных штаммов *C.ulcerans* от домашних кошек [151, 204, 222, 241], вследствие чего в США и странах Европы сформировалось настороженное отношение к этому микроорганизму, и был организован мониторинг за циркуляцией данного возбудителя.

Патогенные для человека коринебактерии являются неподвижными, грамположительными, неспорообразующими факультативными анаэробами; неоднородны по морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам. Микроорганизмы рода *Corynebacterium* представляют собой прямые или слегка изогнутые палочки размером 0,2 - 0,8 х 1,5 - 8,0 мкм с булавовидными утолщениями на концах, для которых характерен ярко выраженный полиморфизм. Клетки *C.diphtheriae* располагаются относительно друг друга в виде римских цифр X, V и «китайских иероглифов». *C.ulcerans* чаще всего имеют овоидную форму клеток, располагающихся, как правило, хаотично или V-образно. *C.pseudotuberculosis* морфологически представляют собой тонкие палочки, которые размещаются относительно друг друга параллельно в виде «частокола». При росте патогенных коринебактерий на селективных дифференциально-диагностических плотных питательных средах формируются непрозрачные матовые приподнятые колонии округлой формы диаметром 1 - 3 мм серо-черной / черной окраски с металлическим оттенком («цвет мокрого асфальта»). Чаще всего бывают мягкой маслянистой консистенции, при прикосновении могут крошиться. Средняя скорость роста на агаровых средах составляет 24 - 48 часов.

По культурально-биохимическим свойствам различают четыре биовара *C.diphtheriae*: *gravis*, *mitis*, *intermedius* и *belfanti*. При этом проводят дифференциацию между биоваром *gravis* и так называемой группой «митисных форм», включающей в себя *mitis*, *intermedius* и *belfanti*, которые не обладают амилазной активностью [53]. С целью выявления различий между *C.diphtheriae* и *C.ulcerans*, *C.pseudotuberculosis* определяют нитратредуктазную и уреазную

активности микроорганизмов [53].

Бактерии *C.diphtheriae* характеризуются большим количеством факторов патогенности, к которым относят ДТ, корд-фактор, факторы адгезии и факторы инвазии (гиалуронидаза, нейроминидаза, ДНК-аза и другие). ДТ является основным фактором патогенности и ему отводится ключевая роль в патогенезе заболевания [48, 117]. При этом его продукция определяется типом встроенного в хромосому бактерии профага.

Микроорганизмы вида *C.diphtheriae* подразделяются на токсигенные, нетоксигенные и нетоксигенные токснесущие штаммы (НТТН-штаммы) [11, 77, 78, 84, 150, 200, 201, 245]. Впервые НТТН-штаммы *C.diphtheriae* были выделены в конце 1970-х годов в США с помощью метода ДНК-ДНК гибридизации [39, 59]. Всего идентифицировано 14 штаммов, 12 из которых были выделены в Южной Дакоте, один – на Аляске и один – во Флориде. Штаммы из Южной Дакоты продуцировали энзиматически активный (по данным иммунопреципитации в геле), но нетоксигенный (*in vivo*) аминотерминальный фрагмент ДТ (фрагмент А). Штаммы из Аляски и Флориды не проявляли токсигенных свойств ни *in vitro*, ни *in vivo* [163]. В России НТТН-штаммы *C.diphtheriae* впервые были выделены в 1990-х годах [59, 79]: выявлено четыре штамма, которые несли последовательности, кодирующие А и В субъединицы ДТ, и пять штаммов, несущих последовательность, кодирующую В субъединицу ДТ. В последующем НТТН-штаммы *C.diphtheriae* стали выделять и на территориях стран СНГ [160, 232]. В ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора в течение многих лет проводится скрининг нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* на наличие гена *tox*. Установлено, что интенсивность циркуляции НТТН-штаммов была неравномерна в разные годы, и все они принадлежали к биовару *mitis* [11, 39, 62, 63, 66, 77, 197, 200, 201]. При этом во время эпидемического подъема и его пика (1993 - 1995 гг.) НТТН-штаммы не выделяли. В период же снижения заболеваемости (1996 - 2005 гг.) интенсивность циркуляции НТТН-штаммов возросла и составила 16,8 %, причем наибольшее количество НТТН-штаммов было выделено в конце 1990-х годов. В период спорадического уровня

заболеваемости НТТН-штаммы не регистрировали или регистрировали в незначительном количестве случаев. В 1980-е годы удельный вес таких штаммов составил 2,0 - 4,0 %, в 2006 - 2010 гг. – 2,7 %, а в 2010 - 2015 гг. – 1,28 % [124]. Низкий уровень циркуляции НТТН-штаммов в период спорадической заболеваемости можно объяснить снижением общей циркуляции нетоксигенных штаммов с дальнейшей стабилизацией их уровня распространения. Изучение способности к токсинообразованию НТТН-штаммов на плотных питательных средах в РП в агаре и после четырехкратных пассажей на КА не привело к выявлению ДТ. Создание благоприятных условий для продукции токсина (выращивание в бульоне Мартена с 10 % СКРС) и изучение токсинообразования этих штаммов в течение шести дней в РНГА, позволяющей определять ДТ у слаботоксигенных штаммов *C.diphtheriae*, также, как и в пробах на культуре клеток Vero, иммуноблотинге, ICS-тесте, не привели к положительным результатам [11, 78, 77, 200, 201]. Только в опытах *in vivo* на морских свинках с установлением минимальной некротической дозы (Dnm) при внутрикожном введении различных концентраций микробных клеток удалось выявить у ряда НТТН-штаммов продукцию пептида, обладающего токсическими свойствами [11]. Установлено, что нетоксигенные штаммы *C.diphtheriae*, не несущие ген *tox*, дермoneкротическими свойствами не обладали, в то время как 42,5 % НТТН-штаммов вызывали некроз в коже животных при введении дозы, превышающей в 2 - 4 раза концентрацию микробных клеток контрольного токсигенного штамма [11]. В ходе исследований, выполненных Комбаровым С.Ю. и Мельниковым В.Г. на базе ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора [39, 78], выявлено, что 91,8 % НТТН-штаммов принадлежали к риботипу «Moskva» и 8,2 % – к трем другим близкородственным риботипам – NTTB 1, NTTB 2, NTTB 3.

В дальнейшем Мельниковым В.Г., Мазуровой И.К., Борисовой О.Ю., Комбаровым С.Ю. [77, 78, 201] и Воложанцевым Н.В. с соавт. [47, 245] были установлены механизмы блокирования продукции ДТ у НТТН-штаммов *C.diphtheriae*. Первый механизм отсутствия экспрессии гена *tox* связан с наличием в нем замены нуклеотида в позиции 60 (A → G) и делецией одного из четырех

нуклеотидов G в позиции 52 - 55, приводящей к сдвигу рамки считывания и образованию стоп-кодона в позиции 112, что, в свою очередь, приводит к продукции «усеченного» пептида, состоящего из 37 аминокислот [77, 78, 201]. Второй механизм отсутствия экспрессии гена *tox* обусловлен наличием в его структуре инсерционного (IS) элемента [245], обозначенного нами как IS-1, что приводит к блокированию активности гена. В последние годы (2010 - 2015 гг.) обнаружены НТТН-штаммы *C.diphtheriae* с третьим механизмом отсутствия экспрессии гена *tox*, который обусловлен наличием в его структуре также IS-элемента, но другой локализации [124], и обозначен нами как IS-2.

С помощью мультилокусного секвенирования было установлено, что НТТН-штаммы неоднородны, а сиквенс-тип и механизм отсутствия экспрессии гена *tox* имеют тесную взаимосвязь [124]. Так, НТТН-штаммы *C.diphtheriae* с делецией нуклеотида G в позиции 55 в гене *tox* принадлежали к сиквенс-типу ST40 [124]. При этом НТТН-штаммы *C.diphtheriae* с IS-1 и IS-2 элементами в гене *tox* принадлежали к сиквенс-типам ST53 и ST76, соответственно [124].

1.2.2. Методы лабораторной диагностики дифтерийной инфекции

Диагностика дифтерии носит комплексный характер и предусматривает оценку клинической картины заболевания с учетом данных эпидемиологического анамнеза и результатов лабораторных исследований [1, 41, 42, 60, 198].

В настоящее время в России для лабораторного подтверждения диагноза обязательным является использование бактериологического метода [103]. Другие методы исследования имеют лишь вспомогательное значение [60]. Обследование проводят не только с диагностической или профилактической целью, но и по эпидемическим показаниям [53, 103, 128]. Больных дифтерией или с подозрением на это заболевание, а также всех больных с диагнозами «Ангина с патологическими наложениями», «Ларинготрахеит», «Ларингит», «Круп», «Ретрофарингеальный абсцесс», «Паратонзиллярный абсцесс», «Инфекционный мононуклеоз» направляют на исследование с диагностической целью. Лица, контактировавшие с больным дифтерией, также подлежат обязательному

обследованию, но уже по эпидемическим показаниям. Исследование с профилактической целью проводится при трудоустройстве на работу в специализированные учреждения закрытого типа с временным / постоянным пребыванием детей / взрослых (детские дома, дома ребенка, интернаты психоневрологического профиля для детей и взрослых, противотуберкулезные детские санатории) и при направлении детей и взрослых в эти учреждения.

Особую опасность представляют бактерионосители, имеющие высокий уровень антитоксического иммунитета и являющиеся источниками инфекции для окружающих [43, 44, 45, 48, 67, 117]. Кроме того, существует скрытое бактерионосительство, представляющее потенциал для распространения дифтерийной инфекции, что особенно опасно для непривитых людей [43, 48, 117].

Бактериологический метод считается «золотым стандартом» в лабораторной диагностике дифтерийной инфекции, порядок проведения которого строго регламентирован действующими нормативными и методическими документами: санитарно-эпидемиологическими правилами СП 3.1.2.3109-13 «Профилактика дифтерии» и методическими указаниями МУК 4.2.3065-13 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции» [53, 103].

Система бактериологической диагностики дифтерии в нашей стране создавалась и разрабатывалась на протяжении десятилетий несколькими поколениями микробиологов, среди которых ведущая роль принадлежит сотрудникам МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского. Основной задачей является идентификация возбудителя дифтерии в максимально сжатые сроки (3 - 4 дня от начала исследования) с помощью минимального количества диагностических тестов. Бактериологический метод диагностики дифтерии является эффективным и наиболее точным. При выделении из патологического материала возбудителя заболевания изучаются его токсигенные и биохимические свойства с целью определения у него способности к продукции ДТ и биовара. Тем не менее, основным и определяющим недостатком этого метода является его продолжительность, которая составляет три рабочих дня в случае положительного результата и пять рабочих дней – в случае отрицательного [53].

Также велика вероятность совершения ошибок, связанных с человеческим фактором, поскольку исследование предполагает проведение многочисленных и разноплановых манипуляций различной сложности. Поэтому рекомендуется допускать к данному виду работы только высококвалифицированных специалистов. Результаты, получаемые в ходе бактериологического исследования, также зависят от качества используемых питательных сред и реактивов, условий и сроков их хранения. Кроме того, эффективность метода находится в прямой зависимости от своевременного и правильного взятия патологического материала у обследуемого и соблюдения сроков доставки его в микробиологическую лабораторию [16, 53].

Забор материала для исследования производится с помощью двух отдельных стерильных сухих тампонов из зева и носа [103]. Клинический материал с обоих тампонов после доставки в лабораторию засевают на одну чашку Петри с плотной питательной средой, разделив ее пополам для посева патологического отделяемого из носа и зева. При дифтерии других локализаций (кожа, наружный слуховой проход, гениталии, конъюнктива глаз и др.) помимо материала из пораженных участков, у обследуемого также забирают и материал из зева и носа. Объясняется это тем, что велика вероятность попадания возбудителя инфекции на кожу именно со слизистых ротоглотки и носоглотки, на поверхности которых он в основном и локализуется [53].

Во многих странах мира для первичного посева используют кровяные теллуритовые среды: КТА на различных агаровых основах, среда Клауберг II и среда Hoyle. В России, как правило, применяют КТА, в основном на основе ГРМ-агара, или Коринебакагар [53]. При этом в зарубежных странах, согласно рекомендациям ВОЗ [251], материал забирается двумя тампонами из зева и двумя тампонами из носа. После чего осуществляется посев патологического материала с тампонов на чашки с КТА и кровяными средами (используется четыре чашки с плотными питательными средами). Таким образом, с одной стороны, увеличивается расход питательных сред и, соответственно, стоимость исследования, а, с другой стороны, идентифицировать колонии, подозрительные

на дифтерийные, на чашках с КА не представляется возможным.

Дальнейшая идентификация возбудителя дифтерии в нашей стране строится сначала на определении продукции ДТ путем постановки пробы на токсигенность и цистиназной активности в пробе Пизу с последующей оценкой биохимической активности путем определения способности ферментировать глюкозу, сахарозу и крахмал [53]. Применение отечественной схемы лабораторной диагностики дифтерийной инфекции позволяет выявить возбудителя дифтерии на третьи сутки от начала исследования. Руководство ВОЗ [251] по лабораторной диагностике дифтерийной инфекции регламентирует проведение микроскопии, выделение чистой культуры возбудителя, последующую постановку пробы на токсигенность, определение цистиназной активности на среде Тинсдаля, ферментацию глюкозы, сахарозы, крахмала, мальтозы и трегалозы, что удлиняет сроки выдачи ответа на 1 - 2 дня, по сравнению с отечественной схемой диагностики. Следовательно, разработанная в России система бактериологической диагностики дифтерийной инфекции является наиболее оптимальной.

Серологические методы индикации возбудителя дифтерийной инфекции также применялись в лабораторной диагностике дифтерии с целью выявления главного фактора патогенности – ДТ. Первым предложенным методом сероидентификации возбудителя была РНАт [48]. Однако данная реакция была трехкомпонентная и трудоемкая, чувствительность которой зависела от правильного и четкого выбора гемагглютинирующих единиц антитоксических антител, необходимых для нейтрализации токсина.

Разработка методов иммунохимического анализа и возможность получения моноклональных антител к определенному эпитопу дифтерийного токсина позволило на новом уровне подойти к совершенствованию диагностики дифтерии путем применения ИФА и РНГА [27, 48, 56, 57, 58]. При определении ДТ с помощью ИФА применялся твердофазный вариант с использованием моноклональных антител к СООН-концевому участку В-фрагмента ДТ, иммобилизованных на полистироле, и поликлональных антитоксических противодифтерийных антител, меченных ферментом пероксидазой хрена [27, 57,

58]. Данный метод позволял выявлять ДТ в концентрации 4 - 8 нг / мл или не менее 0,002 Lf / мл. Кроме того, метод давал возможность выявлять ДТ в бульоне при культивировании патологического материала без этапа выделения чистой культуры. РНГА предполагала использование эритроцитарного дифтерийного антительного диагностикума [56]. ИФА и РНГА по чувствительности и специфичности значительно превосходили РНАт, и предполагалось использовать их как для ускоренного выявления ДТ в материале от больных и бактерионосителей при обследовании с профилактической целью и по эпидпоказаниям, так и для изучения степени токсинообразования штаммов *C.diphtheriae* [11, 39, 56]. Однако данные методы сероидентификации возбудителя дифтерийной инфекции не использовались в практическом здравоохранении.

В настоящее время применение серологических методов лабораторной диагностики с диагностической целью не целесообразно. В некоторых случаях диагноз может быть подтвержден четырехкратным и более увеличением уровня антител в парных сыворотках крови, если больному не вводили противодифтерийную антитоксическую сыворотку с лечебной целью, а их исходный уровень был низким [41, 42].

Развитие **молекулярных методов** генодиагностики дифтерии также прошло значительный путь от ДНК-ДНК гибридизации до ПЦР-РВ и изотермической амплификации. В 1990-х годах за рубежом появились первые научные статьи, посвященные вопросу о возможности использования методов генодиагностики для выявления токсигенных *C.diphtheriae*.

В 1991 году M.J. Pallen [211] впервые применил метод ПЦР с целью выявления гена *tox* у *C.diphtheriae*. После этого ПЦР в классическом варианте стала широко использоваться для проведения аналогичных экспериментов как отечественными, так и зарубежными учеными [80, 136, 155, 203, 207, 212, 122]. Однако все эти работы были направлены на определение токсигенных свойств у *C.diphtheriae*, выделенных в чистой культуре, поэтому использование молекулярно-генетических методов на тот момент не позволило сократить время проведения исследования и обнаружить возбудителя дифтерии в клиническом

образце.

В конце 1990-х годов коллективом авторов МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского был разработан способ ПЦР-диагностики дифтерии с электрофоретической детекцией продуктов амплификации, дающий возможность в клиническом материале в течение 5 - 6 часов выявить фрагмент гена *tox* размером 340 п.н. [17, 38, 60, 64]. Разработанный метод ПЦР позволял осуществлять ускоренную лабораторную диагностику при обследовании больных с подозрением на дифтерию с целью своевременной постановки диагноза и проведения лечебных мероприятий, выявления контактных лиц и бактерионосителей в очагах инфекции, а также для идентификации НТТН-штаммов *C.diphtheriae* и изучения их значимости в эпидпроцессе дифтерийной инфекции. Этот метод позволял дифференцировать НТТН-штаммы *C.diphtheriae*, содержащие делецию нуклеотида G в позиции 55 в гене *tox*.

Одновременно в ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора был предложен набор реагентов для выявления ДНК токсигенных штаммов *C.diphtheriae* в клиническом материале «АмплиСенс® *Corynebacterium diphtheriae* - EPh», позволяющий выявить фрагмент гена *tox* размером 360 п.н. Тем не менее, применение этого набора не позволяло дифференцировать ген *tox* у токсигенных штаммов *C.diphtheriae* от «молчащего» гена *tox* у НТТН-штаммов *C.diphtheriae*. Кроме того, этот набор реагентов в данный момент снят с производства.

С 2000-х годов развитие ПЦР-диагностики дифтерийной инфекции пошло в направлении разработки ПЦР-РВ [144, 227, 228]. Вместе с тем с помощью предложенных вариантов ПЦР выявление гена, кодирующего ДТ, также осуществлялось в чистой культуре коринебактерий. Только в двух работах [191] предприняты попытки выявления гена *tox* с помощью ПЦР-РВ на ограниченном числе иммитантов и клинических образцов.

С развитием молекулярно-генетических технологий перспективным направлением в лабораторной диагностике инфекционных заболеваний становится создание мультиплексных методов, позволяющих одновременно в одной пробирке проводить идентификацию фрагментов ДНК нескольких

возбудителей или выявить несколько фрагментов ДНК одного инфекционного агента. Для ПЦР-диагностики дифтерии стали создавать мультиплексные варианты ПЦР, которые позволяют выявлять не только ген ДТ у *C.diphtheriae* и *C.ulcerans*, но и дифференцировать эти микроорганизмы между собой [18, 215, 233]. На данный момент разработано два варианта, один из которых дифференцирует токсигенные и нетоксигенные штаммы *C.diphtheriae*, а другой дополнительно дифференцирует *C.ulcerans* и *C.pseudotuberculosis*. Вместе с тем ни одна из предложенных технологий не позволяет дифференцировать НТТН-штаммы *C.diphtheriae* и идентифицировать биовар возбудителя дифтерии.

В ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского совместно с сотрудниками ФБУН ГНЦ ПМБ (пос. Оболенск) на основе мультиплексной амплификационной технологии была разработана методика обследования больных с подозрением на дифтерию, позволяющая одновременно выявить две генетические детерминанты – фрагмент гена *tox*, кодирующего ДТ, и фрагмент гена *amy*, кодирующего продукцию амилазы, что дает возможность определить токсигенность и биовар возбудителя дифтерии [12, 15, 88, 141]. При этом предложенный вариант не позволял выявлять нетоксигенные штаммы *C.diphtheriae* биовара *mitis* и дифференцировать НТТН-штаммы *C.diphtheriae*.

В 2000 году была разработана амплификация в изотермических условиях, LAMP [209], модифицированные варианты которой предложены для выявления ДНК большого числа возбудителей инфекционных заболеваний. В 2008 году в международной базе данных NCBI / GenBank опубликовали нуклеотидную последовательность гена ДТ размером 300 п.н., на которую можно ориентироваться при конструировании праймеров для изотермической амплификации при выявлении ДНК *C.diphtheriae* [213]. Зарубежными исследователями предложен способ выявления ДНК *C.diphtheriae* методом LAMP с применением набора, включающего три пары праймеров на фрагмент гена *tox* [213]. Вместе с тем этот метод был апробирован только на чистых культурах *C.diphtheriae*, не были определены возможности для выявления НТТН-штаммов *C.diphtheriae* с различными дефектами гена *tox*, а также при работе с клиническим

материалом. Кроме того, способ предполагал использование дорогостоящих реагентов, что ограничивает его широкое применение в нашей стране.

Резюме. Таким образом, разработка схем лабораторной диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций прошла путь от микроскопических, бактериологических, серологических до высокотехнологичных молекулярно-генетических методов. При коклюшной инфекции только в последние три года используется комплекс трех методов – бактериология, серология и ПЦР. Вместе с тем вопрос о выборе того или иного метода генодиагностики коклюша с оценкой целесообразности и эффективности его применения при обследовании пациентов с диагностической целью, а также контактных в очагах коклюшной инфекции, остается открытым. Согласно действующим нормативно-методическим документам [53, 103] лабораторная диагностика дифтерийной инфекции в РФ до сих пор базируется только на бактериологических исследованиях. Молекулярно-генетические методы, с помощью которых стало возможным выявлять в биологическом материале специфические фрагменты генома *C.diphtheriae*, далеки от совершенства и требуют дальнейшего развития. В связи с этим разработка и внедрение молекулярно-генетических технологий амплификации нуклеиновых кислот позволят с новых позиций подойти к совершенствованию лабораторной диагностики коклюша и дифтерии, что расширит возможности практических лабораторий по выявлению возбудителей этих инфекций.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 2. Совершенствование генодиагностики коклюша

2.1. Оптимизация метода ускоренной диагностики коклюша на основе изотермической амплификации (LAMP)

Одной из перспективных технологий в настоящее время является использование изотермической амплификации (LAMP), обладающей высокой чувствительностью и специфичностью, а также высокой амплификационной эффективностью [209, 210]. На основе этой технологии в ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора был разработан способ диагностики коклюша, который позволял выявить ДНК возбудителя в течение 9 - 10 часов от начала исследования в клиническом материале [87].

Нами проведена оптимизация ранее предложенного способа [87] и разработан ускоренный метод генодиагностики коклюшной инфекции на основе LAMP, который включает проведение следующих этапов: 1 – взятие клинического материала с задней стенки ротоглотки; 2 – пробоподготовка образца; 3 – выделение ДНК сорбционным методом; 4 – проведение амплификации при изотермических условиях; 5 – детекция продуктов амплификации методом горизонтального электрофореза в агарозном геле.

Взятие клинического материала производили в соответствии с [26, 104] двумя сухими стерильными одноразовыми зондами-тампонами с задней стенки ротоглотки. Рабочие части зондов помещали в одну пробирку типа эппендорф с 0,5 мл физиологического раствора.

Пробоподготовку образца проводили путем смыва клинического материала с тампона в физиологический раствор по методике, изложенной в разделе диссертационной работе «Материалы и методы».

Выделение ДНК осуществляли сорбционным методом с помощью коммерческих наборов реагентов в соответствии с инструкцией по применению.

Приготовление реакционной смеси проводили путем смешивания двух смесей: смеси № 1 и смеси № 2.

Состав смеси № 1: 10x реакционный буфер для ПЦР, 2 mM смесь нуклеотидов (dNTP), 25 mM MgCl₂, раствор Betaine и три пары праймеров (BP - F3 5'-CCGCATACGTGTTGGCA-3' и BP - B3 5'-TGCGTTTTGATGGTGCCT-3', BP - FIP 5'-TTGGATTGCAGTAGCGGGATGTGCATGCGTGCAGATTCGTC-3' и BP - BIP 5'-CGCAAAGTCGCGCGATGGTAACGGATCACACCATGGCA-3', BP - LF 5'-ACGGAAGAATCGAGGGTTTTGTAC-3' и BP - LB 5'-GTCACCGTCCGGACCGTG-3') [174].

Состав смеси № 2: рабочее разведение (1:9) Bst ДНК-полимеразы в буферном растворе.

В смесь № 1 вносили пробы ДНК (по 8 мкл) и минеральное масло. Затем прогревали в течение 5 мин. и охлаждали в течение 1 мин. После чего в каждую пробу вносили смесь № 2, перемешивали на вортексе и осаждали капли кратковременным центрифугированием. В качестве положительного контроля амплификации использовали ДНК штамма *B. pertussis* № 143.

Амплификацию в изотермическом режиме проводили или в программируемом твердотельном термостате «Гном», или в амплификаторе «Терцик» при следующих условиях: 65 °C – 60 мин., 80 °C – 2 мин.

Детекцию продуктов амплификации осуществляли методом горизонтального электрофореза в 50x ТАЕ-буфере в 2 % агарозном геле при 160 V в течение 40 мин. Дифференциацию проводили путем сравнения электрофоретической подвижности полученных фрагментов ДНК с подвижностью контрольного образца ДНК штамма *B. pertussis*. Если у исследуемого ДНК-образца имелись специфические светящиеся профили, аналогичные профилю контрольного штамма *B. pertussis* № 143, то данные образцы регистрировались, как содержащие ДНК штамма *B. pertussis* (Рисунок 1).

На способ и набор ускоренной генодиагностики коклюша получен патент на изобретение РФ № 2542396 от 21.01.2015 г.

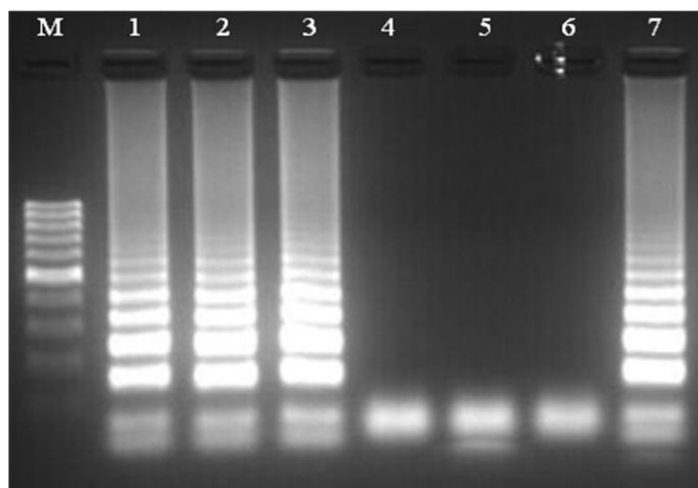


Рисунок 1 – Электрофореграмма продуктов изотермической амплификации: ДНК штаммов *B.pertussis* (пример)

Примечание: М – маркер молекулярных весов ДНК GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific; 1, 2, 3 – ДНК штаммов *B.pertussis*; 4, 5 – отрицательные образцы; 6 – отрицательный контроль (ПЦР-смесь); 7 – положительный контроль (ДНК штамма *B.pertussis* № 143)

С целью применения разработанного способа в качестве диагностического теста «у постели больного» нами проведена апробация методики детекции продуктов амплификации с помощью интеркалирующего красителя на ограниченном количестве проб клинического материала от больных с диагнозом «Коклюш». Для этого в каждую пробу вносили по 10 мкл 10 000х SYBR Green I. Результаты амплификации оценивали визуально по изменению цвета содержимого пробирки. Положительными считали те пробы, в которых регистрировали светло-зеленое окрашивание, отрицательные образцы имели светло-оранжевое окрашивание (Рисунок 2). Применение данной технологии позволяет сократить продолжительность исследования еще на 1 час.

Следовательно, разработан способ ускоренной генодиагностики коклюша, позволяющий выявлять ДНК *B.pertussis* в течение 4 - 5 часов от начала исследования в клиническом материале. Применение разработанного способа в практическом здравоохранении будет способствовать быстрому лабораторному подтверждению диагноза «Коклюш».

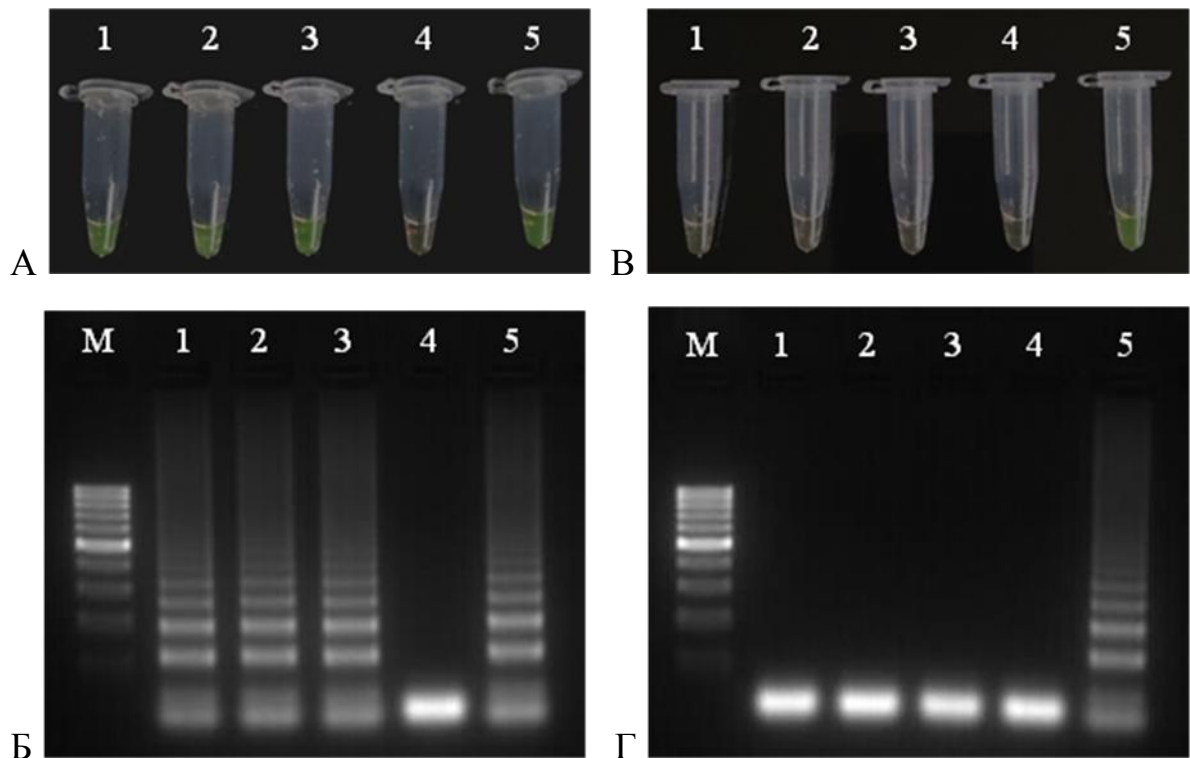


Рисунок 2 – Выявление ДНК *B.pertussis* методом LAMP: детекция продуктов амплификации с помощью интеркалирующего красителя (А, В) и методом горизонтального электрофореза в агарозном геле (Б, Г) (пример)

Примечание: М – маркер молекулярных весов ДНК GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific

А, Б: 1 - 3 – ДНК штаммов *B.pertussis*; 4 – отрицательный контроль (ПЦР-смесь); 5 – положительный контроль (ДНК штамма *B.pertussis* № 143)

В, Г: 1, 2 – ДНК штаммов *B.parapertussis*; 3 – ДНК штамма *B.bronchiseptica*; 4 – отрицательный контроль (ПЦР-смесь); 5 – положительный контроль (ДНК штамма *B.pertussis* № 143)

2.2. Оценка аналитической надежности разработанного метода

С целью оценки аналитической чувствительности разработанного способа готовили три линейки последовательных разведений бактериальной культуры типового контрольного штамма *B.pertussis* № 143: $5 \times 10^9 - 10^1$ м.к. в 1 мл. Далее из 100 мкл каждого разведения суспензии выделяли ДНК. Параллельно с этим, для определения общего количества жизнеспособных микроорганизмов в 1 мл бактериальной взвеси, из каждого разведения производили высеив 100 мкл на чашки Петри с Бордетеллагаром. Засеянные чашки инкубировали при 37 °С. Через 72 и 96 часов подсчитывали число выросших колоний (КОЕ / мл) (Таблица 7).

Выделение ДНК из исследуемого материала осуществляли с помощью коммерческого набора «АмплиПрайм® ДНК-сорб-АМ». Аналитическая

чувствительность составила 10^2 ГЭ / мл.

Таблица 7 – Схема приготовления разведений и учет КОЕ / мл типового штамма *B.pertussis* № 143

Разведение	Количество м.к. в 1 мл взвеси бактериальной культуры по стандарту мутности (5 МЕ)	Число колониеобразующих единиц в 1 мл взвеси бактериальной культуры (КОЕ / мл)
– 1	5×10^9	Не поддается подсчету
– 2	5×10^8	Не поддается подсчету
– 3	5×10^7	Не поддается подсчету
– 4	5×10^6	Не поддается подсчету
– 5	5×10^5	$1,1 \times 10^3$
– 6	5×10^4	$5,3 \times 10^2$
– 7	5×10^3	$2,7 \times 10^2$
– 8	10^3	6×10^1
– 9	10^2	Рост не наблюдался
– 10	10^1	Рост не наблюдался

Оценка аналитической специфичности разработанного способа генодиагностики возбудителя коклюша проведена на типовых коллекционных и свежевыделенных штаммах представителей рода *Bordetella* и микроорганизмов других родов (Таблицы 1, 2, 3, 4). Установлено, что во всех изученных образцах положительные сигналы не регистрировались.

Аналитическую надежность диагностического теста оценивали также по частоте совпадения обнаружения ДНК *B.pertussis* в многочисленных пробах одного и того же однородного образца согласно [23], определяя таким образом сходимость и воспроизводимость методики.

Однородный образец (как положительный, так и отрицательный) готовили в лабораторных условиях: в 1 мл 0,9 % раствора хлорида натрия (рН 7,0) суспендировали полную микробиологическую петлю бактериальной культуры. В качестве положительного контрольного образца использовали типовой штамм *B.pertussis* № 688, в качестве отрицательного – *S.aureus* Wood-46. Затем из положительного контрольного материала готовили 10 одинаковых проб,

содержащих по 100 мкл бактериальной взвеси. Аналогичная процедура была выполнена и с отрицательным контрольным образцом. Исследование по выявлению специфических фрагментов генома *B.pertussis* в изучаемом материале методом LAMP проводили в соответствии с методикой, описанной выше. На этапе проведения амплификации каждую пробу тестировали в трех повторах. Порядок проведения эксперимента по оценке аналитической надежности диагностического теста (сходимость и воспроизводимость результатов) представлен на рисунке 3.

Сходимость методики определяли в условиях, при которых результаты ПЦР-анализа 60 проб получены при использовании одного и того же метода в одной и той же лаборатории одним и тем же оператором с использованием одной и той же партии реактивов, одного и того же оборудования в пределах короткого промежутка времени (пяти рабочих дней). По итогам проведенных исследований в 10 пробах с положительным контрольным материалом, каждая из которых тестировалась в трех повторах, ДНК *B.pertussis* была детектирована в 100 % случаев. Наряду с этим, в 10 пробах с отрицательным контрольным материалом, каждая из которых также тестировалась в трех повторах, в 100 % случаев был получен отрицательный результат.

Воспроизводимость методики внутри одной лаборатории определяли на многочисленных пробах одного и того же однородного образца, тестирование которых проводили одним и тем же методом разными операторами с использованием разных партий реактивов и различного оборудования в различные рабочие дни. Проведена оценка согласия между независимыми результатами исследований двух испытателей. При этом между участниками эксперимента наблюдалось полное согласие относительно правильности интерпретации результатов при визуализации фрагментов амплифицированной ДНК в агарозном геле (критерий каппа Кохена, $K = 1$). Таким образом, обоими исследователями были получены идентичные результаты, аналогичные тем, которые представлены при определении сходимости методики и описаны выше.

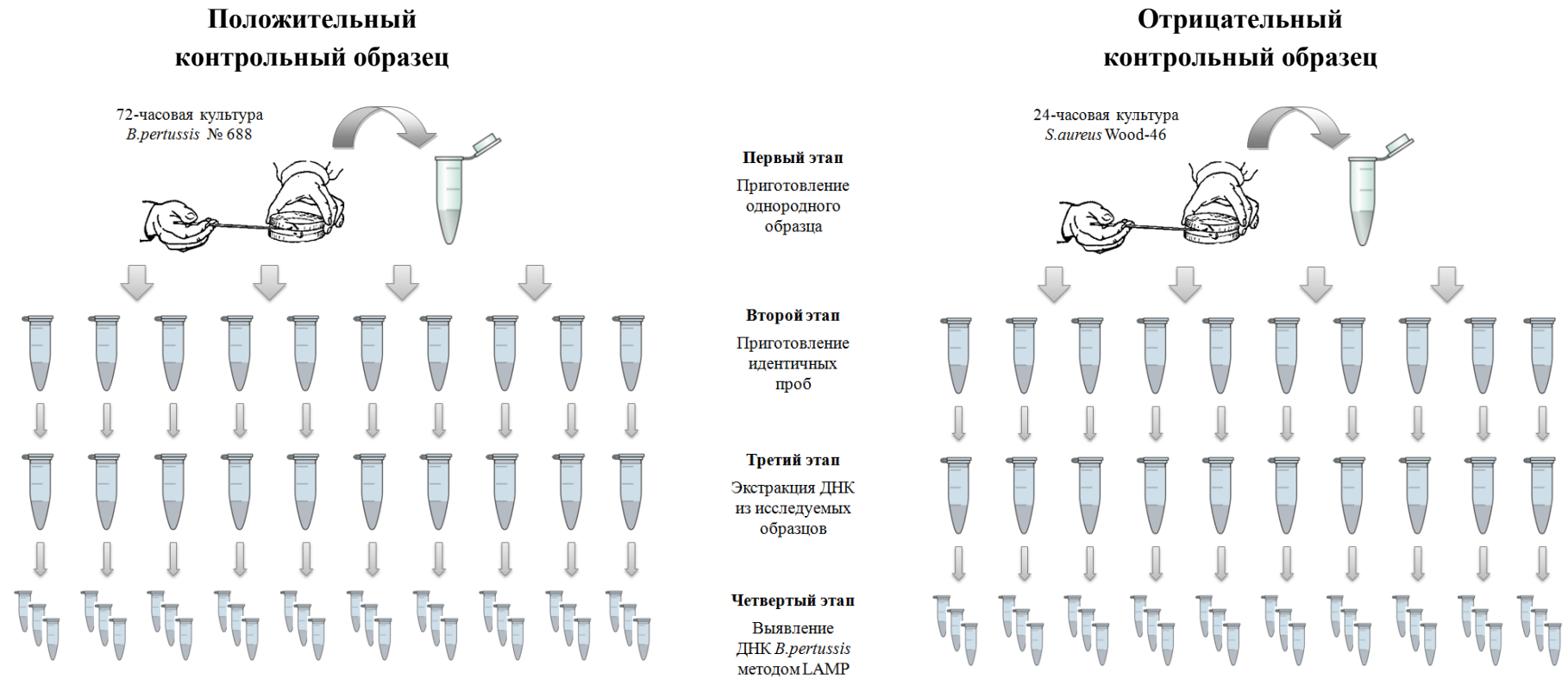


Рисунок 3 – Порядок проведения эксперимента по оценке аналитической надежности разработанного способа

2.3. Оценка валидности разработанного метода

В исследование было включено 329 пациентов в возрасте от 27 дней до 40 лет, госпитализированных в ГБУЗ «ИКБ № 1 ДЗМ» в период с января 2013 года по декабрь 2016 года.

Клинический диагноз устанавливался врачами-инфекционистами в соответствии с принятыми протоколами ведения больных. Обследование пациентов проведено с использованием двух методов: метода сравнения и разработанного метода. В качестве метода сравнения использовали коммерческий диагностический тест по выявлению специфических фрагментов генома *B.pertussis* методом ПЦР-РВ.

В соответствии с эпидемиологическим анамнезом, анамнезом заболевания, клинической картиной болезни и результатами лабораторного обследования, проведенного методом сравнения, пациенты были разделены на две группы.

В I группу включено 252 больных в возрасте от 0 месяцев до 30 лет, у которых при постановке клинического диагноза в качестве основного заболевания фигурировал «Коклюш» и при использовании метода сравнения в образцах клинического материала была обнаружена ДНК *B.pertussis*.

Возраст пациентов I группы: от 0 до 12 месяцев – 165 (65,5 %) человек, от 1 года до 7 лет – 68 (27 %) человек, от 7 до 18 лет – 12 (4,7 %) человека, 18 лет и старше – 7 (2,8 %) человек, то есть основную группу составили дети в возрасте от 0 до 12 месяцев (медиана 4 месяца).

Тяжесть и течение коклюша оценивали согласно общепринятой классификации, в соответствии с которой у 41 (16,3 %) больного коклюш протекал в легкой, у 186 (73,8 %) – в среднетяжелой, у 24 (9,5 %) – в тяжелой, у 1 (0,4 %) – в стертой формах (Таблица 8). Следует отметить тот факт, что степень тяжести течения коклюша зависела от возраста больного. Тяжелые формы были только у детей в возрасте 0 - 12 месяцев, в то время как взрослые переболели коклюшем исключительно в легкой форме, а дети ясельного, дошкольного и школьного возрастов – в меньшей степени в стертой или легкой (17 пациентов; 6,8 %) и в большей степени в среднетяжелой (63 пациента; 25 %) формах.

Таблица 8 – Распределение больных коклюшем по степени тяжести заболевания

Возрастная категория	Количество больных	Степень тяжести							
		Стертая форма		Легкая форма		Среднетяжелая форма		Тяжелая форма	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Дети в возрасте 0 - 12 месяцев	165	—	—	18	7,1	123	48,8	24	9,5
Дети в возрасте 1 - 6 лет	68	1	0,4	11	4,4	56	22,2	—	—
Дети в возрасте 7 - 17 лет	12	—	—	5	2	7	2,8	—	—
Взрослые 18 лет и старше	7	—	—	7	2,8	—	—	—	—
ИТОГО	252	1	0,4	41	16,3	186	73,8	24	9,5

У 49 (19,4 %) больных наблюдали осложненное течение коклюша. При этом у 43 (87,8 %) пациентов отмечали развитие осложнений, связанных с присоединением вторичной инфекции со стороны бронхо-легочной системы (бронхит, бронхиолит, пневмония), у 5 (10,2 %) – осложнений, обусловленных действием возбудителя (ателектаз легкого, энцефалопатия), у 1 (2 %) – как осложнений, связанных с присоединением вторичной инфекции, так и осложнений, обусловленных действием возбудителя (бронхиолит и энцефалопатия). Осложненное течение коклюша в 65,3 % случаев (32 пациента) развивалось у детей в возрасте от 0 до 12 месяцев.

При изучении вакцинального статуса обследуемых было выявлено, что 221 (87,7 %) больных коклюшем не привиты, 23 (9,1 %) – привиты, а у 8 (3,2 %) – отсутствовали данные о вакцинации (Рисунок 4).

Обследование пациентов I группы проведено с диагностической целью на разных сроках от начала заболевания: 12 (4,8 %) человек – на 1-й, 72 (28,6 %) – на 2-й, 96 (38,1 %) – на 3-й, 48 (19 %) – на 4-й, 16 (6,3 %) – на 5-й, 4 (1,6 %) – на 6-й, 3 (1,2 %) – на 7-й, 1 (0,4 %) – на 8-й неделях болезни, то есть большинство (216; 85,7 %) больных было обследовано на 2 - 4-й неделях болезни.

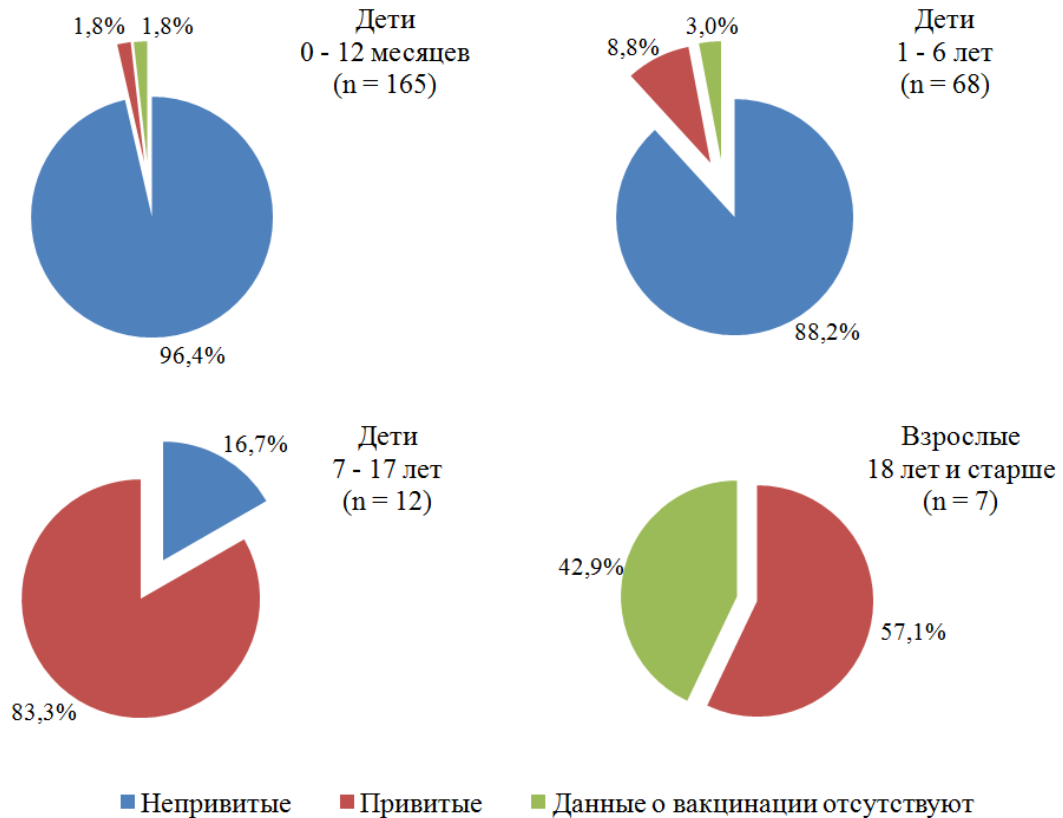


Рисунок 4 – Вакцинальный статус пациентов с верифицированным клиническим диагнозом «Коклюш»

Во II группу включено 77 пациентов в возрасте от 1 месяца до 40 лет, у которых диагностированы другие заболевания респираторного тракта или установлен контакт с больным коклюшем, и при использовании метода сравнения в образцах клинического материала ДНК *B.pertussis* не была выявлена.

Возраст пациентов II группы: от 1 до 12 месяцев – 37 (48 %) человек, от 1 года до 7 лет – 26 (33,8 %) человек, от 7 до 18 лет – 4 (5,2 %) человека, 18 лет и старше – 10 (13 %) человек.

Большинство (71; 92,2 %) пациентов II группы обследовано с диагностической целью на разных сроках от начала заболевания: 14 (18,2 %) человек – на 1-й, 29 (37,7 %) – на 2-й, 11 (14,3 %) – на 3-й, 3 (3,9 %) – на 4-й, 6 (7,8 %) – на 5-й, 4 (5,2 %) – на 6-й, 1 (1,2 %) – на 7-й, 3 (3,9 %) – на 8-й и более неделях болезни, то есть основная масса (54; 70,1 %) больных была обследована на 1 - 3-й неделях болезни. В остальных 7,8 % случаев (6 пациентов) исследование по выявлению ДНК *B.pertussis* выполнено по эпидемическим показаниям у людей,

находившихся в контакте с больным коклюшем. Данная категория обследуемых была представлена только женщинами в возрасте 20 - 39 лет.

В ходе эксперимента установлено, что при использовании разработанного диагностического теста по выявлению ДНК *B.pertussis* в биологическом материале среди пациентов I группы в одном случае получен отрицательный результат, который классифицировался как ложноотрицательный. Среди пациентов II группы также в одном случае получен положительный результат, интерпретируемый как ложноположительный (Таблица 9).

Таблица 9 – Результаты обследования пациентов I и II групп при использовании разработанного диагностического теста по выявлению ДНК *B.pertussis* в биологическом материале

Обследуемые группы пациентов	Результат выявления ДНК <i>B.pertussis</i> методом LAMP		ИТОГО
	Положительный	Отрицательный	
I группа	251	1	252
II группа	1	76	77
ИТОГО	252	77	329

Валидность разработанного способа по выявлению ДНК *B.pertussis* в биологическом материале методом LAMP оценивали в соответствии с [21, 24, 89, 94] по следующим критериям: чувствительность и специфичность, прогностическая ценность положительного результата и прогностическая ценность отрицательного результата, индекс точности (диагностическая эффективность), отношение правдоподобия положительного результата и отношение правдоподобия отрицательного результата. Вышеперечисленные критерии рассчитывали по стандартным формулам, описанным в разделе «Биоинформационные и статистические методы исследования», с использованием полученных данных, которые отображены в таблице 9, при распространенности коклюша среди пациентов изученной выборки в 76,6 %. Результаты оценки

валидности способа представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Результаты оценки валидности разработанного способа

Критерий (Гринхальх Т., 2006)	Величина критерия	Характеристика (Гринхальх Т., 2006)
Чувствительность Sensitivity, Se	99,6 %	Способность теста определять наличие данного заболевания у пациента
Специфичность Specificity, Sp	98,7 %	Способность теста определять отсутствие данного заболевания у пациента
Прогностическая ценность положительного результата, ПЦ ⁺ Positive predictive value, PV ⁺	99,6 %	Вероятность того, что при положительном результате теста пациент на данный момент действительно болен
Прогностическая ценность отрицательного результата, ПЦ ⁻ Negative predictive value, PV ⁻	98,7 %	Вероятность того, что при отрицательном результате теста пациент на данный момент действительно здоров
Индекс точности, ИТ (диагностическая эффективность) Accuracy, Ac	99,4 %	Доля истинных результатов (истинно положительных и истинно отрицательных) по отношению ко всем
Отношение правдоподобия положительного результата, ОП ⁺ Likelihood ratio of a positive test, LR ⁺	76,6	Насколько более вероятен положительный результат у больного по сравнению с вероятностью положительного результата у здорового
Отношение правдоподобия отрицательного результата, ОП ⁻ Likelihood ratio of a negative test, LR ⁻	0,004	Насколько более вероятен отрицательный результат у больного по сравнению с вероятностью отрицательного результата у здорового

Таким образом, диагностический тест по выявлению ДНК *B.pertussis* в биологическом материале методом LAMP обладает 99,6 % чувствительностью и 98,7 % специфичностью, и индекс точности (диагностическая эффективность) составил 99,4 %.

2.4. Результаты применения разработанного метода для обследования больных на разных сроках от начала заболевания, при различных формах клинического течения и на фоне антибиотикотерапии, а также детей в возрасте до 1 года

С целью подтверждения диагноза «Коклюш» с помощью разработанного способа проведено обследование 262 пациентов в возрасте от 0 месяцев до 30 лет, госпитализированных в ГБУЗ «ИКБ № 1 ДЗМ» в период с января 2013 года по декабрь 2016 года.

Окончательный диагноз устанавливался врачами-инфекционистами с учетом клинических проявлений заболевания, данных эпидемиологического анамнеза и результатов лабораторных исследований (выделение культуры *B.pertussis* или выявление ДНК возбудителя / специфических противокклюшных антител).

Обследованные пациенты были с различными формами клинического течения коклюша – от стертой до тяжелой. При использовании разработанного способа ДНК *B.pertussis* обнаружена у 252 (96,2 %) больных (Таблица 11).

Таблица 11 – Тяжесть течения коклюша у пациентов

Тяжесть течения заболевания	Количество пациентов		Результат выявления ДНК <i>B.pertussis</i> методом LAMP			
			Положительный		Отрицательный	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Стертая форма	1	0,4	1	0,4	—	—
Легкая форма	43	16,4	41	15,6	2	0,8
Среднетяжелая форма	194	74,0	186	71,0	8	3,0
Тяжелая форма	24	9,2	24	9,2	—	—
ИТОГО	262	100	252	96,2	10	3,8

Из таблицы 11 видно, что разработанный метод был эффективен при любых формах клинического течения коклюша. Так, ДНК *B.pertussis* обнаружена у всех пациентов с тяжелой формой коклюша (в 24 случаях из 24), в 95,8 % случаев – у

пациентов со среднетяжелой формой (у 186 из 194 больных) и в 95,3 % случаев – у пациентов с легкой формой (у 41 из 46 больных) заболевания.

ДНК *B.pertussis* обнаружена в пробах клинического материала, полученных от больных на разных сроках от начала заболевания – на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8-й неделях болезни (Таблица 12).

Таблица 12 – Сроки обследования больных коклюшем от начала заболевания

Сроки обследования	Количество пациентов		Результат выявления ДНК <i>B.pertussis</i> методом LAMP			
			Положительный		Отрицательный	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
1-я неделя	13	5,0	12	4,6	1	0,4
2-я неделя	73	27,9	72	27,5	1	0,4
3-я неделя	98	37,4	96	36,6	2	0,8
4-я неделя	53	20,2	48	18,4	5	1,8
5-я неделя и более	25	9,5	24	9,1	1	0,4
ИТОГО	262	100	252	96,2	10	3,8

Из таблицы 12 видно, что ДНК возбудителя коклюша была выявлена в 92,3 % случаев у пациентов на 1-й неделе (у 12 из 13 больных), в 98,6 % случаев – на 2-й неделе (у 72 из 73 больных), в 97,9 % случаев – на 3-й неделе (у 96 из 98 больных), в 90,6 % случаев – на 4-й неделе (у 48 из 53 больных) и в 96 % случаев – на 5-й и более неделях (у 24 из 25 больных) заболевания.

Проведена оценка зависимости частоты выделения ДНК *B.pertussis* из клинического материала больных на фоне антибиотикотерапии (Таблица 13). Обследуемые были разделены на две группы. I группу составили 172 (65,6 %) пациента, которые в течение 30 дней до взятия материала не принимали антибактериальные препараты. Во II группу включено 90 (34,4 %) больных, прошедших в течение 15 дней до или проходивших на момент взятия материала курс антибактериальной терапии.

Из таблицы 13 видно, что у больных коклюшем как I, так и II группы ДНК

B.pertussis обнаружена в высоком проценте случаев (96,6 % и 95,3 %, соответственно). По результатам выполненного статистического анализа установлено, что выделение ДНК *B.pertussis* из клинического материала пациентов не зависит от приема антибактериальных препаратов (критерий хи-квадрат Пирсона, $p > 0,05$).

Таблица 13 – Частота выявления ДНК *B.pertussis* у пациентов I и II групп

Обследуемые группы пациентов	Результат выявления ДНК <i>B.pertussis</i> методом LAMP		ИТОГО
	Положительный	Отрицательный	
I группа	87	3	90
II группа	164	8	172
ИТОГО	251	11	262

Так как дети до 1 года являются основной возрастной группой, подлежащей госпитализации при подозрении на коклюш и в которой наиболее высокий риск развития осложнений и тяжелых форм клинического течения, приводящих к смерти, то было важно оценить эффективность применения разработанного диагностического теста при обследовании этого контингента (Таблица 14).

Таблица 14 – Распределение больных коклюшем детей до 1 года по возрастным категориям

Возрастная категория	Количество пациентов		Результат выявления ДНК <i>B.pertussis</i> методом LAMP			
			Положительный		Отрицательный	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
0 - 3 месяцев	71	42,0	70	41,4	1	0,6
4 - 7 месяцев	61	36,1	60	35,5	1	0,6
8 - 12 месяцев	37	21,9	35	20,7	2	1,2
ИТОГО	169	100	165	97,6	4	2,4

Из таблицы 14 видно, что ДНК *B.pertussis* обнаружена в 98,6 % случаев у детей больных коклюшем в возрасте от 0 - 3 месяцев (70 из 71 больного), в 98,4 % случаев – у детей в возрасте 4 - 7 месяцев (у 60 из 61 больного) и в 94,6 % случаев – у детей в возрасте 8 - 12 месяцев (у 35 из 37 больных). В целом, эффективность обнаружения ДНК возбудителя у больных коклюшем с помощью разработанного метода LAMP составила 97,6 %.

Следовательно, разработанный диагностический тест по выявлению ДНК *B.pertussis* методом LAMP эффективен при обследовании больных с различной тяжестью клинического течения, на разных сроках от начала заболевания и на фоне антибиотикотерапии, а также при обследовании детей в возрасте до 1 года.

2.5. Результаты применения разработанного метода для обследования контактных лиц в эпидемических очагах и в организованных коллективах с длительно кашляющими детьми

С целью выявления больных на разных стадиях течения инфекционного процесса и бактерионосителей в очагах коклюшной инфекции проведено обследование контактных лиц с помощью генодиагностики в 8 образовательных учреждениях г. Москвы и Московской области в период с 2012 по 2015 гг. Под медицинским наблюдением находилось 4 930 человек. Клинический материал получен от 430 в возрасте от 6 до 74 лет. По результатам эпидемиологического расследования в трех очагах были выявлены источники инфекции, тогда как в пяти организованных коллективах источник не был установлен, а обследование проводилось на основании контакта с длительно кашляющими детьми.

Выявление специфических фрагментов генома *B.pertussis* осуществляли с помощью разработанного способа на основе метода LAMP и коммерческого набора на основе метода ПЦР-РВ.

В трех очагах было обследовано 84 контактных лица в возрасте от 8 до 74 лет, в том числе 6 человек с клиническими проявлениями в виде кашля и 78 – без клинических проявлений. Общая характеристика очагов коклюша представлена в таблице 15.

Таблица 15 – Характеристика очагов коклюшной инфекции

№ очага	Срок существования очага на момент обследования (дни)	Всего наблюдали (абс.)	Обследовано		Возрастная структура обследованных				
			Всего (абс.)	Клинические проявления					
				Есть (абс.)	Нет (абс.)	8 - 11 лет (абс.)	12 - 15 лет (абс.)	20 - 49 лет (абс.)	50 - 74 лет (абс.)
№ 1	35	263	28	5	23	—	—	14	14
№ 2	31	406	30	—	30	11	8	6	5
№ 4	20	649	26	1	25	25	—	1	—
	ИТОГО	1318	84	6	78	36	8	21	19

В указанных очагах были выявлены случаи коклюша у 7 детей, которые являлись учениками 1, 3, 4, 5 и 9-х классов. Результаты обследования установленных источников инфекции представлены в таблице 16.

Таблица 16 – Характеристика выявленных источников инфекции

№ очага	Выявлено источников инфекции (абс.)	Возраст				Метод лабораторного подтверждения		
		7 лет (абс.)	9 лет (абс.)	11 лет (абс.)	15 лет (абс.)	Бактериологический	Серологический	
							ИФА	РНГА
№ 1	4	1	2	1	—	—	1	3
№ 2	1	—	—	1	—	—	1	—
№ 4	2	—	—	1	1	1	1	—
ИТОГО	7	1	2	3	1	1	3	3

При обследовании 84 контактных лиц с помощью разработанного теста на основе метода LAMP ДНК *B.pertussis* была выявлена у 15 (17,9 %) человек, в том числе у трех человек с наличием клинических проявлений (Таблица 17).

В очаге № 1 ДНК возбудителя коклюша обнаружена у 12 (42,9 %) обследованных лиц, в том числе у 2 из 5 с клиническими проявлениями в виде кашля и у 10 из 23 – без клинических проявлений. Все ДНК-положительные образцы были выявлены у работников образовательного учреждения: 6 педагогов, 3 работника столовой и медицинская сестра. Результаты обследования контактных из очага № 1, полученные с помощью метода ПЦР-РВ и метода

LAMP, полностью совпали.

В очаге № 2 было обследовано 19 учащихся и 11 работников школы. При обследовании данного очага с помощью двух молекулярно-генетических методов ДНК-положительных образцов не обнаружено.

В очаге № 4 из 26 обследованных контактных лиц, включая 25 учащихся 4-го класса и одного учителя, ДНК возбудителя коклюша была выявлена у одного ребенка (3,8 %) с клиническими проявлениями и у двух детей (7,7 %) без клинических проявлений. При этом необходимо отметить, что если среди детей, у которых отсутствовали клинические проявления инфекции, ДНК возбудителя коклюша была обнаружена двумя молекулярно-генетическими методами, то у ребенка с наличием кашля ДНК *B.pertussis* выявлена только с помощью метода изотермической амплификации.

Таблица 17 – Результаты обследования контактных лиц в очагах с установленным источником инфекции

№ очага	Всего обследовано (абс.)	Результаты исследования							
		Кашель есть				Кашля нет			
		Метод ПЦР-РВ		Метод LAMP		Метод ПЦР-РВ		Метод LAMP	
		ответ « + »	ответ « – »	ответ « + »	ответ « – »	ответ « + »	ответ « – »	ответ « + »	ответ « – »
№ 1	28	2	3	2	3	10	13	10	13
№ 2	30	—	—	—	—	—	30	—	30
№ 4	26	—	1	1	—	2	23	2	23
ИТОГО	84	2	4	3	3	12	66	12	66

В пяти организованных коллективах обследовано 346 длительно кашляющих детей и контактных с ними лиц в возрасте от 6 до 74 лет, в том числе 4 человека с клиническими проявлениями в виде кашля и 342 – без клинических проявлений (Таблица 18).

С помощью разработанного теста на основе метода LAMP в указанных организованных детских коллективах ДНК *B.pertussis* была выявлена у 18 (5,2 %) человек, в том числе у двух человек с наличием клинических проявлений (кашля)

(Таблица 19).

Таблица 18 – Общая характеристика организованных коллективов с длительно кашляющими детьми

№ очага	Всего наблюдали (абс.)	Обследовано			Возрастная структура обследованных					
		Всего (абс.)	Клинические проявления							
			Есть (абс.)	Нет (абс.)	6 - 9 лет (абс.)	10 - 13 лет (абс.)	14 - 17 лет (абс.)	20 - 39 лет (абс.)	40 - 59 лет (абс.)	60 - 74 лет (абс.)
№ 3	706	30	1	29	25	5	—	—	—	—
№ 5	352	31	—	31	31	—	—	—	—	—
№ 6	985	130	—	130	2	74	20	8	22	4
№ 7	514	45	1	44	39	4	—	1	1	—
№ 8	1055	110	2	108	5	27	72	1	4	1
ИТОГО	3612	346	4	342	102	110	92	10	27	5

Таблица 19 – Результаты обследования длительно кашляющих и контактных с ними лиц в организованных детских коллективах

№ очага	Всего обследовано (абс.)	Результаты исследования							
		Кашель есть				Кашля нет			
		Метод ПЦР-РВ		Метод LAMP		Метод ПЦР-РВ		Метод LAMP	
		ответ « + »	ответ « - »	ответ « + »	ответ « - »	ответ « + »	ответ « - »	ответ « + »	ответ « - »
№ 3	30	1	—	1	—	1	28	1	28
№ 5	31	—	—	—	—	—	31	—	31
№ 6	130	—	—	—	—	10 (1*)	120	12	118
№ 7	45	—	1	1	—	—	44	1	43
№ 8	110	—	2	—	2	3 (1*)	105	2	106
ИТОГО	346	1	3	2	2	14 (2*)	328	16	326

Примечание: * Обозначены образцы, при тестировании которых была выявлена ДНК представителя рода *Bordetella spp.*

В очаге № 3 из 30 обследованных школьников ДНК *B.pertussis* обнаружена у двух детей, причем у одного из них был кашель. Результаты обследования контактных из очага № 3, полученные с помощью метода ПЦР-РВ и метода LAMP, полностью совпали.

В очаге № 5 при обследовании 31 учащегося с помощью двух методов ДНК-положительных образцов не обнаружено.

В очаге № 6 обследовано 96 (73,8 %) школьников и 34 (26,2 %) работника образовательного учреждения, среди которых 91,2 % – педагоги, 2,9 % – работники административно-управленческого аппарата, 5,9 % – технический персонал и буфетчицы. С помощью метода изотермической амплификации у лиц без клинических проявлений обнаружено 12 ДНК-положительных образцов, в том числе 7 образцов у детей и 2 – у взрослых (учителя). При этом ДНК *B.pertussis* при использовании метода ПЦР-РВ была обнаружена только в 9 образцах из 12. В одном случае (ученик 6-го класса) обнаружена ДНК представителя рода *Bordetella spp.*, а в двух других (ученик 4-го класса и учитель) – получен отрицательный результат.

В очаге № 7 при обследовании 43 (95,6 %) школьников в возрасте 8 - 9 лет и 2 (4,4 %) учителей с помощью метода изотермической амплификации ДНК *B.pertussis* выявлена у двух детей, причем у одного из них был кашель. При исследовании этих образцов с помощью метода ПЦР-РВ ДНК *B.pertussis* не обнаружена.

В очаге № 8 при обследовании 104 (94,5 %) учащихся и 6 (5,5 %) работников школы у двух учеников без кашля обнаружена ДНК *B.pertussis*. При этом с помощью метода ПЦР-РВ в одном образце выявлена ДНК представителя рода *Bordetella spp.*

Следовательно, полученные данные свидетельствуют о том, что разработанный метод генодиагностики коклюша может применяться в эпидемических очагах инфекции, а также в организованных коллективах для обследования длительно кашляющих детей и контактных с ними лиц. В трех эпидемических очагах обнаружено 15 (17,9 %) ДНК-положительных образцов, в том числе, в трех образцах от лиц с клиническими проявлениями. В пяти организованных коллективах с длительно кашляющими детьми обнаружено 18 (5,2 %) ДНК-положительных образцов, причем два образца были получены от лиц с клиническими проявлениями в виде кашля.

2.6. Результаты применения разработанного метода для обследования семейных очагов коклюшной инфекции

Нами проведена апробация разработанного способа по выявлению ДНК *B.pertussis* в биологическом материале на основе метода LAMP при обследовании женщин, госпитализированных в ГБУЗ «ИКБ № 1 ДЗМ» по уходу за ребенком.

Обследовано 40 практически здоровых на момент поступления в стационар женщин в возрасте от 20 до 39 лет, которые находились в тесном контакте с больным коклюшем ребенком. Исследования проведены на разных сроках с момента появления у детей первых клинических симптомов болезни: через 2 недели было обследовано 11 (27,5 %) женщин, через 3 недели – 15 (37,5 %), через 4 недели – 8 (20,0 %), через 5 недель – 3 (7,5 %) и через 6 недель – 3 (7,5 %). У обследуемых с целью выявления ДНК *B.pertussis* брали мазки с задней стенки ротоглотки. Для определения уровня специфических противокклюшных антител классов IgA, IgM и IgG осуществляли забор венозной крови из локтевой вены. ПЦР-исследование проводили с использованием разработанного диагностического теста на основе метода LAMP и коммерческого диагностического теста на основе метода ПЦР-РВ. Серологическое исследование выполнялось методом ИФА с помощью коммерческой тест-системы.

У всех поступивших детей в возрасте до 1 года врачами-инфекционистами на основании клинико-эпидемиологических данных и результатов лабораторных тестов верифицирован диагноз «Коклюш» различной степени тяжести. В связи с этим, за женщинами также было установлено медицинское наблюдение в течение их пребывания в стационаре.

На основании результатов лабораторных исследований (обнаружение ДНК *B.pertussis* и / или наличие / отсутствие противокклюшных антител к КТ и ФГА) и медицинского наблюдения женщины были разделены на две группы. При этом результаты ПЦР-исследований, выполненных с помощью разработанного теста на основе метода LAMP и коммерческого теста на основе метода ПЦР-РВ, не отличались.

В I группу включено 19 (47,5 %) женщин, у которых в период

нахождения в стационаре появились клинические признаки коклюша. Предварительный диагноз «Коклюш» устанавливали по наличию кашля у наблюдаемых контактных лиц. У 5 (26,3 %) женщин кашель был редкий, непродуктивный, не сопровождался катаральными явлениями и повышением температуры, и отмечалось першение в ротоглотке. На основании клинико-эпидемиологических данных у этих пациентов диагностировали атипичную стертую форму коклюша. У остальных 14 (73,7 %) женщин кашель был приступообразным, сопровождался гиперемией лица, наблюдался в ночные часы и после физического напряжения, при этом отсутствовали какие-либо катаральные явления со стороны верхних дыхательных путей и физикальные изменения в легких. Заболевание в данных случаях классифицировали как типичная легкая форма коклюша. Лабораторное обследование большинства женщин I группы (14; 73,7 %) было проведено на 2, 3 и 4-й неделях с момента появления у их детей первых клинических симптомов болезни. После получения результатов исследований с помощью генодиагностики (ПЦР-РВ, LAMP) и ИФА предварительный клинический диагноз «Коклюш» подтвердился у всех 19 пациентов (Таблица 20).

Таблица 20 – Результаты лабораторного обследования женщин, находившихся в контакте с больным коклюшем ребенком

Результаты лабораторного исследования	Группы обследуемых пациентов			
	I группа (n = 19)		II группа (n = 21)	
	абс.	%	абс.	%
ДНК <i>B.pertussis</i> обнаружена IgA / IgM / IgG не обнаружены	1	5,3	3	14,3
ДНК <i>B.pertussis</i> обнаружена IgA / IgM / IgG обнаружены	12	63,1	8	38,1
ДНК <i>B.pertussis</i> не обнаружена IgA / IgM / IgG обнаружены	6	31,6	7	33,3
ДНК <i>B.pertussis</i> не обнаружена IgA / IgM / IgG не обнаружены	—	—	3	14,3

Из таблицы 20 видно, что среди женщин I группы ДНК *B.pertussis* была выявлена у 13 (68,4 %), а специфические противокклюшные антитела – у 18 (94,7 %). При этом совпадение положительных результатов имело место у 12 (63,2 %) заболевших.

Во II группу включена 21 (52,5 %) женщина, у которых в ходе медицинского наблюдения врачами-инфекционистами не были зафиксированы клинические проявления болезни. Лабораторное обследование большинства женщин II группы (20; 95,2 %) проведено на 2, 3 и 4-й неделях с момента появления у их детей первых симптомов заболевания. При этом ДНК *B.pertussis* обнаружена у 11 (52,4 %), а специфические противокклюшные антитела выявлены у 15 (71,4 %). Отрицательные результаты получены только у 3 (14,3 %) контактных лиц этой группы (Таблица 20).

Установлено, что при обследовании семейных очагов среди взрослых выявлено 19 (47,5 %) больных стертыми и легкими формами коклюша и 11 (27,5 %) бактерионосителей. При этом в зависимости от длительности контакта с источником инфекции в 72,7 % случаев (8 женщин) бактерионосительство *B.pertussis* сопровождалось наличием специфических противокклюшных антител и в 27,3 % случаев (3 женщины) – их отсутствием. Следует отметить тот факт, что среди контактных в 17,5 % случаев (7 женщин) выявлены практически здоровые лица, у которых при наличии специфических противокклюшных антител ДНК возбудителя не была обнаружена.

Далее проведено изучение особенностей формирования специфического гуморального иммунитета у заболевших коклюшем и контактных лиц у 40 пациентов. Три женщины (две из I группы и одна из II группы) были исключены из эксперимента в связи с тем, что лабораторное обследование осуществлялось на 6-й неделе с момента появления у их детей первых клинических симптомов болезни, и полученные при выполнении серологического исследования результаты классифицировались как сомнительные.

В I группе специфические IgM были обнаружены у 3 (17,6 %) пациентов, IgA – у 12 (70,5 %), IgG – у 16 (94,1 %). Во II группе IgM выявлены у 1 (5,0 %)

женщины, IgA – у 4 (20,0 %), IgG – у 16 (80,0 %). При этом среди всех обследованных взрослых специфические антитела класса IgM обнаружены лишь у 4 (10 %). Также обращает на себя внимание тот факт, что у заболевших коклюшем антитела класса IgA выявляли чаще, чем у контактных практически здоровых людей (70,5 % и 20,0 %, соответственно) (Таблица 21).

Таблица 21 – Частота выявления специфических противокклюшных антител разных классов (IgM, IgA, IgG) среди контактных лиц при обследовании семейных очагов коклюша

Группы обследуемых	Количество	Сроки обследования	Специфические противокклюшные антитела разных классов					
			IgM		IgA		IgG	
			абс.	%	абс.	%	абс.	%
I группа	17	2-я неделя	—	—	3	17,6	4	23,5
		3-я неделя	1	5,9	4	23,5	5	29,4
		4-я неделя	2	11,8	2	11,8	4	23,5
		5-я неделя	—	—	3	17,6	3	17,6
	ИТОГО		3	17,6	12	70,5	16	94,1
II группа	20	2-я неделя	1	5,0	2	10,0	7	35,0
		3-я неделя	—	—	1	5,0	5	25,0
		4-я неделя	—	—	1	5,0	4	20,0
		5-я неделя	—	—	—	—	—	—
	ИТОГО		1	5,0	4	20,0	16	80,0

Специфические противокклюшные антитела класса IgG достигали порогового уровня в 94,1 % у больных коклюшем женщин I группы и в 80,0 % у практически здоровых контактных лиц II группы. Причем у заболевших высокие показатели антител IgG регистрировали уже на 2 - 3-й недели с момента первичного контакта с больным коклюшем (62 Ед / мл, 68 Ед / мл, 80 Ед / мл, 90 Ед / мл, 95 Ед / мл, 115 Ед / мл, 130 Ед / мл, 190 Ед / мл), а на 4 - 5-й неделях – достигали максимального уровня (300 Ед / мл).

Также обнаружены различия и в выявляемых сочетаниях антител разных

классов (Рисунок 5). Так, например, у заболевших коклюшем женщин I группы чаще всего (12; 70,5 %) обнаруживалось сочетание специфических антител классов IgA и IgG. Тогда как у практически здоровых контактных лиц II группы сочетание данных антител было выявлено лишь в 15 % случаев (3 женщины). Отсутствие специфических противокклюшных антител всех классов наблюдалось у обследуемых и I, и II групп и составило 5,9 % и 30,0 %, соответственно.

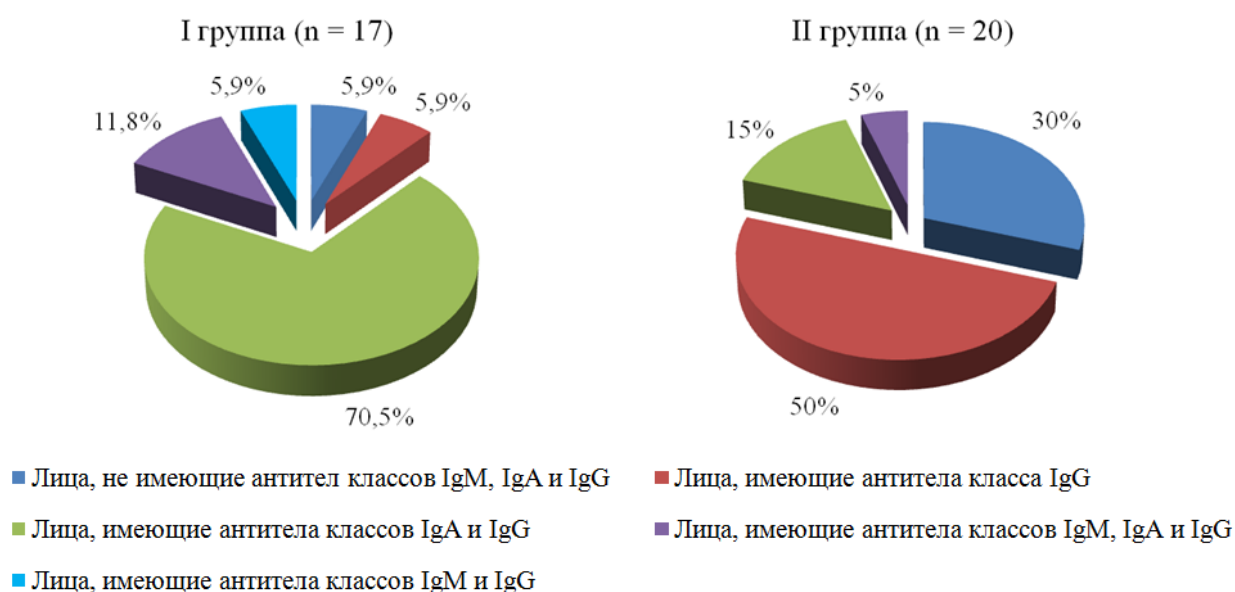


Рисунок 5 – Выявляемые специфические противокклюшные антитела разных классов (IgM, IgA, IgG) у контактных лиц I и II групп при обследовании семейных очагов коклюша

Таким образом, установлено, что среди контактных взрослых в семейных очагах в 47,5 % случаях выявлены больные стертыми и легкими формами коклюша. Причем у всех 19 из 19 обследованных женщин предварительный диагноз, установленный на основе клинических признаков заболевания и данных эпидемиологического анамнеза, был лабораторно подтвержден с помощью гено- и серодиагностики. Также среди обследованных у 27,5 % практически здоровых женщин, находившихся в контакте с больными детьми, обнаружено бактерионосительство *B.pertussis*, которое в 72,7 % случаев

сопровождалось появлением специфических противокклюшных антител, а в 27,3 % случаев – их отсутствием.

Резюме. Разработан способ генодиагностики коклюша на основе метода LAMP, который позволяет выявить ДНК *B.pertussis* в течение 4 - 5 часов от начала исследования в клиническом материале. Применение разработанного метода в практическом здравоохранении приведет к быстрому лабораторному подтверждению диагноза «Коклюш» независимо от сроков заболевания и формы клинического течения, что будет способствовать назначению своевременной и адекватной терапии; значительно повысит возможности обследования детей в возрасте до 1 года и взрослых со стертой клинической картиной болезни, в том числе на фоне антибиотикотерапии. На способ ускоренной генодиагностики коклюшной инфекции получен патент на изобретение РФ № 2542396 от 21.01.2015 г.

Показана целесообразность применения генодиагностики при обследовании контактных лиц в эпидемических очагах и организованных коллективов с длительно кашляющими лицами. Установлено, что при обследовании контактных лиц в очагах распространенность возбудителя коклюша может достигать 17,9 %, а при обследовании организованных коллективов с длительно кашляющими детьми и взрослыми причиной длительного кашля в 5,2 % случаев может быть возбудитель коклюша.

Показаны возможности и доказана необходимость обследования всех контактных лиц в границах семейного очага коклюша. В семейных очагах среди взрослых выявлено 47,5 % больных со стертыми и легкими формами коклюша и 27,5 % бактерионосителей. При этом в зависимости от длительности контакта с источником инфекции в 72,7 % случаев бактерионосительство *B.pertussis* сопровождалось наличием противокклюшных антител и в 27,3 % случаев – их отсутствием.

В Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-ОБОЛЕНСК» ФБУН ГНЦ ПМБ депонированы десять штаммов

B.pertussis (B-7392; B-7393; B-7394; B-8011; B-8012; B-8013; B-8014; B-8015; B-8016; B-8017), шесть штаммов *B.parapertussis* (B-7821; B-8006; B-8007; B-8008; B-8009; B-8010) и два штамма *B.bronchiseptica* (B-7822; B-8005).

ГЛАВА 3. Разработка метода генодиагностики дифтерийной инфекции на основе изотермической амплификации (LAMP)

3.1. Разработка метода ускоренной генодиагностики для выявления ДНК возбудителя дифтерии

Нами разработан простой, ускоренный, чувствительный и специфичный способ генодиагностики, основанный на технологии LAMP [209] и позволяющий выявлять возбудителя дифтерийной инфекции в клиническом материале в течение 4 - 4,5 часов от начала исследования.

Разработанный способ предполагает проведение нескольких этапов: 1 – взятие клинического материала от пациента; 2 – пробоподготовка и выделение ДНК из исследуемого материала; 3 – проведение амплификации в изотермическом режиме; 4 – детекция продуктов амплификации методом горизонтального электрофореза в агарозном геле и интерпретация результатов.

Взятие клинического материала проводили согласно [53] двумя сухими стерильными ватными одноразовыми тампонами из зева и носа пациента. При наличии другой локализации (кожа, наружный слуховой проход, гениталии и т.д.) добавляется еще один тампон. После взятия материала рабочую часть зондов с каждого тампона (зев, нос, другая локализация) помещали в разные одноразовые пробирки типа эппендорф с 0,5 мл физиологического раствора.

Пробоподготовку клинического образца проводили путем суспендирования клинического материала с тампона в физиологический раствор по методике, изложенной в разделе «Материалы и методы».

Выделение ДНК из клинического материала осуществляли сорбционным методом с помощью коммерческих наборов согласно инструкции производителя.

Реакционная смесь для проведения амплификации состоит из двух смесей: № 1 и № 2.

Состав смеси №1: 10x ПЦР буфер, 2 mM смесь нуклеотидов (dNTP), 25 mM $MgCl_2$, раствор Betaine, праймер ДТ - ВР - FIP (5'-GATTGGTCCCAGTAACGG TTTTTCATCAAACGGCATTAGAGC-3'), праймер ДТ - ВР - VIP (5'-CTGTAT

TCGCTGGGGCTAACTCAAATTATCAGCTGTTTCGCTAT-3'), праймер ДТ - F3 (5'-GGAAAAAGCTAAACAATACCTAGA-3'), праймер ДТ - B3 (5'-AAGAGCAGCAGTTGTCTT-3') и праймер Loop (5'-ATGCAACGTGGGCAGTAAAC-3').

Состав смеси № 2: рабочее разведение (1:9) Bst ДНК-полимеразы в буферном растворе.

В каждую пробирку вносили сначала 21 мкл смеси № 1, затем 3 мкл ДНК пробы, полученной после экстракции из клинического или контрольного образца; добавляли 1 каплю минерального масла. Пробы прогревали при 90 °С - 95 °С в течение 3 - 5 мин. и далее охлаждали. В каждую пробу вносили 1 мкл смеси № 2 и слегка перемешивали. В качестве положительного контроля амплификации использовали ДНК токсигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis* № 665.

Амплификацию при изотермических условиях проводили в программируемом микротермостате «Гном» или в термоциклере в режиме: 65 °С – 60 мин., 80 °С – 2 мин.

Детекцию результатов реакции осуществляли методом горизонтального электрофореза в 50х ТАЕ-буфере в 2 % агарозном геле в режиме 160 V 40 мин. Дифференциацию осуществляли путем сравнения профиля исследуемого ДНК-образца со специфическим профилем ДНК-образца контрольного токсигенного штамма *C. diphtheriae*. Если профиль исследуемого ДНК-образца был аналогичен профилю ДНК-образца контрольного токсигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis* № 665, то данные образцы регистрировались как содержащие ДНК токсигенного штамма *C.diphtheriae*, что свидетельствовало о наличии в клиническом материале ДНК возбудителя дифтерии (Рисунок 6).

На способ генодиагностики дифтерийной инфекции получен патент на изобретение РФ № 2623149 от 22.06.2017 г.

Апробация способа генодиагностики возбудителя дифтерии на основе метода LAMP проведена на типовых коллекционных штаммах *C.diphtheriae* (Таблица 1) и на штаммах *C.diphtheriae*, выделенных из клинического материала от пациентов с подозрением на дифтерию (Таблица 2). В работу включено 50 токсигенных и 130 нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* биоваров *gravis* и *mitis*,

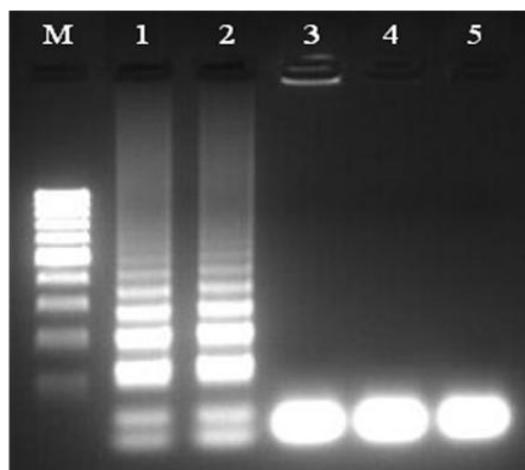


Рисунок 6 – Электрофореграмма продуктов изотермической амплификации: ДНК 2 токсигенных и 2 нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* (пример)

Примечание: М – маркер молекулярных весов ДНК GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific; 1 – ДНК токсигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis*; 2 – ДНК токсигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *mitis*; 3 – ДНК нетоксигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis*; 4 – ДНК нетоксигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *mitis*; 5 – отрицательный контроль (ПЦР-смесь)

а также 15 НТТН-штаммов *C.diphtheriae* с разными дефектами гена ДТ. Установлено, что положительные сигналы регистрировались во всех образцах, содержащих ДНК токсигенных штаммов *C.diphtheriae* двух биоваров (Рисунок 7),

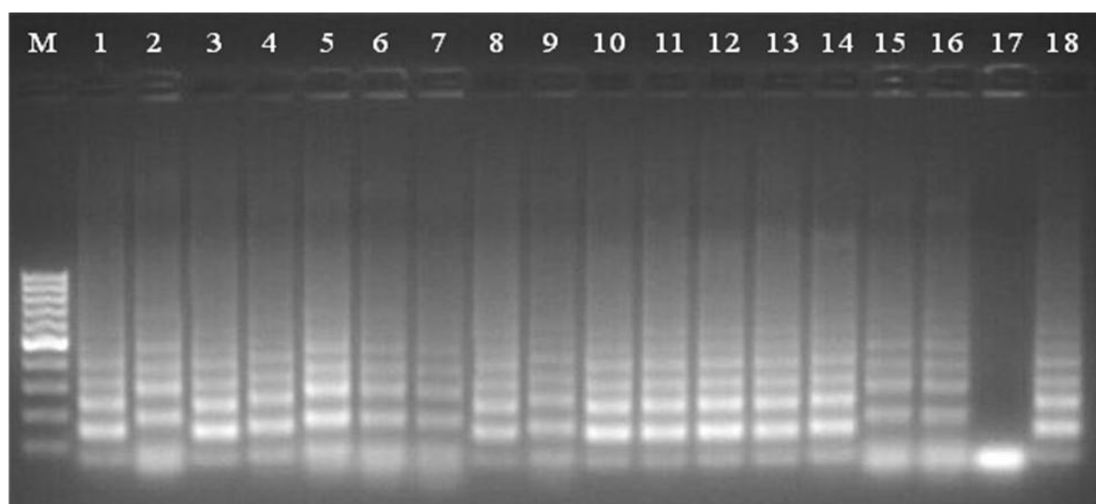


Рисунок 7 – Электрофореграмма продуктов изотермической амплификации: ДНК 16 токсигенных штаммов *C.diphtheriae* (пример)

Примечание: М – маркер молекулярных весов ДНК GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific; 1 - 8 – ДНК токсигенных штаммов *C.diphtheriae* биовара *gravis*; 9 - 16 – ДНК токсигенных штаммов *C.diphtheriae* биовара *mitis*; 17 – отрицательный контроль (ПЦР-смесь); 18 – положительный контроль (ДНК токсигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis* № 665)

а также в образцах с ДНК НТТН-штаммов *C.diphtheriae*, содержащих делецию или мобильный генетический IS-1 элемент в гене *tox* (Рисунок 8). При этом в образцах с ДНК НТТН-штаммов *C.diphtheriae*, содержащих в гене *tox* мобильный генетический IS-2 элемент, положительные сигналы не были обнаружены (Рисунок 8). Во всех образцах с ДНК нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* двух биоваров положительные сигналы отсутствовали (Рисунок 9).

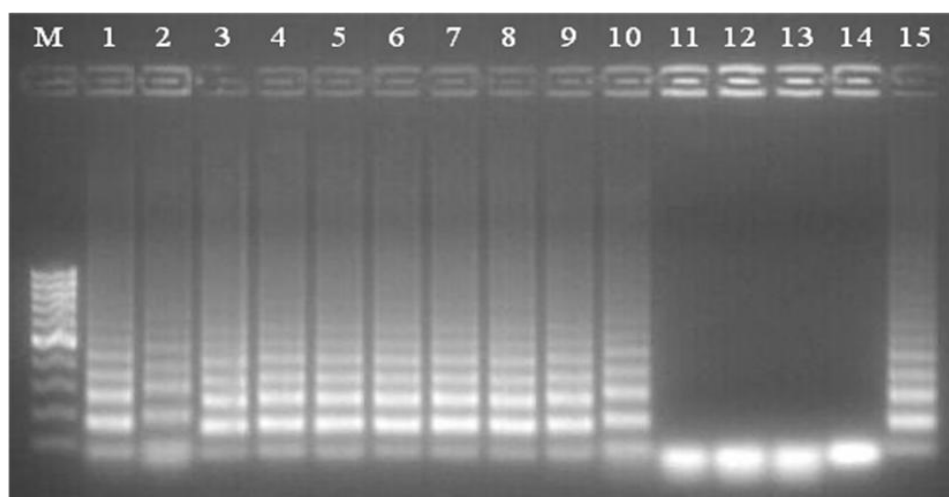


Рисунок 8 – Электрофореграмма продуктов изотермической амплификации: ДНК 13 НТТН-штаммов *C.diphtheriae* (пример)

Примечание: М – маркер молекулярных весов ДНК GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific; 1 - 8 – ДНК НТТН-штаммов *C.diphtheriae* биовара *mitis*, содержащих делецию нуклеотида G в позиции 55 в гене *tox*; 9 - 10 – ДНК НТТН-штаммов *C.diphtheriae* биовара *mitis*, содержащих мобильный генетический IS-1 элемент в гене *tox*; 11 - 13 - ДНК НТТН-штаммов *C.diphtheriae* биовара *mitis*, содержащих мобильный генетический IS-2 элемент в гене *tox*; 14 – отрицательный контроль (ПЦР-смесь); 15 – положительный контроль (ДНК токсигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis* № 665)

Таким образом, разработанный способ в 100 % случаев выявлял ДНК токсигенных штаммов *C.diphtheriae*. При этом НТТН-штаммы *C.diphtheriae*, у которых фенотип Тох- обусловлен наличием мобильного генетического IS-2 элемента в гене *tox*, идентифицировались как нетоксигенные, а НТТН-штаммы коринебактерий, у которых фенотип Тох- обусловлен делецией или наличием мобильного генетического IS-1 элемента в гене *tox*, идентифицировались как токсигенные.

Как и в разработанном способе генодиагностики *B.pertussis* методом LAMP,

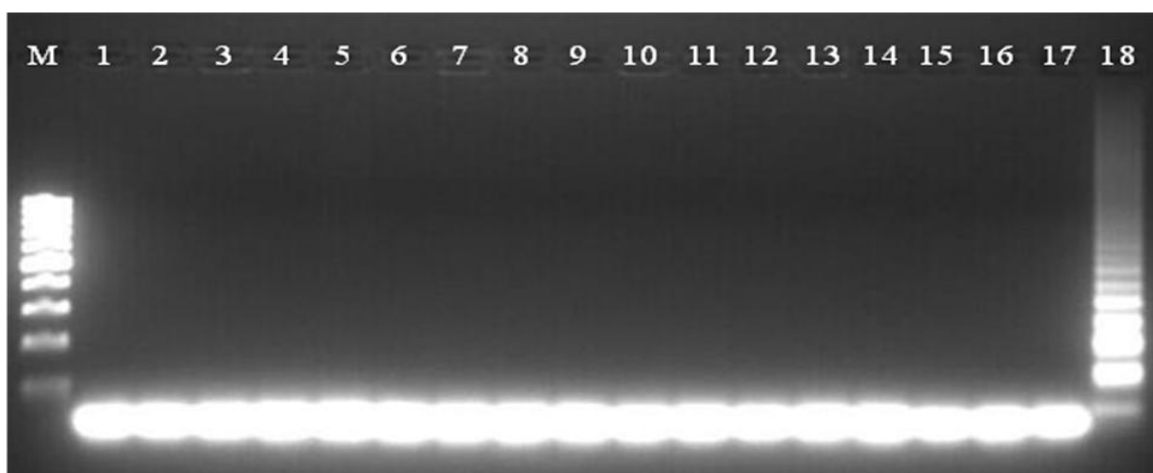


Рисунок 9 – Электрофореграмма продуктов изотермической амплификации: ДНК 16 нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* (пример)

Примечание: М – маркер молекулярных весов ДНК GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific; 1 - 8 – ДНК нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* биовара *mitis*; 9 - 16 – ДНК нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* биовара *gravis*; 17 – отрицательный контроль (ПЦР-смесь); 18 – положительный контроль (ДНК токсигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis* № 665)

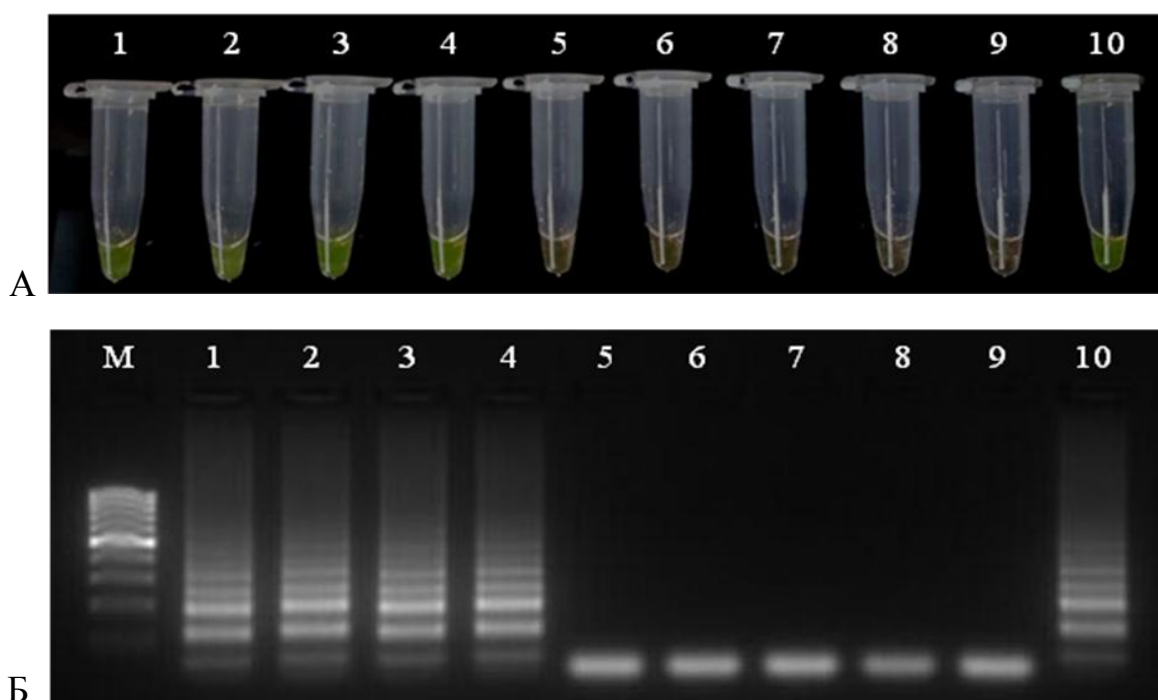


Рисунок 10 – Способ генодиагностики возбудителя дифтерии методом LAMP: детекция продуктов амплификации с помощью интеркалирующего красителя (А) и методом горизонтального электрофореза в агарозном геле (Б) (пример)

Примечание: М – маркер молекулярных весов ДНК GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific; 1, 2 – ДНК токсигенных штаммов *C.diphtheriae* биовара *gravis*; 3, 4 – ДНК токсигенных штаммов *C.diphtheriae* биовара *mitis*; 5, 6 - ДНК нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* биовара *gravis*; 7, 8 – ДНК нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* биовара *mitis*; 9 – отрицательный контроль (ПЦР-смесь); 10 – положительный контроль (ДНК токсигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis* № 665)

в представленном методе генодиагностики возбудителя дифтерии также возможен переход на иной способ детекции продуктов амплификации с помощью интеркалирующего красителя, что позволит сократить продолжительность исследования еще на 1 час. Апробация этого варианта детекции была проведена на типовых коллекционных штаммах *C.diphtheriae* (Таблица 1). Результаты амплификации оценивали визуально по изменению цвета содержимого пробирки. Положительными считали те пробы, в которых регистрировали светло-зеленое окрашивание. Отрицательные же образцы окрашивались в светло-оранжевый цвет (Рисунок 10).

3.2. Оценка аналитической чувствительности разработанного метода генодиагностики

С целью оценки аналитической чувствительности разработанного метода готовили три линейки последовательных разведений бактериальной культуры типового контрольного токсигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis* № 665 в соответствии с [53]. Далее из каждого разведения делали серию одинаковых проб, содержащих по 100 мкл суспензии, из которых в последующем выделяли ДНК. Параллельно с этим, для определения общего количества жизнеспособных микроорганизмов в 1 мл бактериальной взвеси, из каждого разведения производили высев 100 мкл приготовленной суспензии на плотную питательную среду КТА. Засеянные чашки инкубировали при 37 °С. Через 24 и 48 часов подсчитывали число выросших колоний (КОЕ / мл) (Таблица 22).

Выделение ДНК из исследуемого материала осуществляли с помощью трех коммерческих наборов. Показано, что при использовании наборов реагентов «К-СОРБ» и «АмплиПрайм® ДНК-сорб-АМ» аналитическая чувствительность составила 5×10^3 ГЭ / мл, а набора «АмплиПрайм® РИБО-преп» – 10^3 ГЭ / мл (Рисунок 11). При сопоставлении с данными бактериологического исследования наибольшая аналитическая чувствительность разработанного способа генодиагностики возбудителя дифтерии была достигнута при использовании коммерческого набора для выделения ДНК «АмплиПрайм® РИБО-преп» и

составила $4,5 \times 10^2$ ГЭ / мл (Таблица 22). В связи с чем, этот набор реагентов был использован при проведении дальнейших исследований.

Таблица 22 – Схема приготовления разведений и учет КОЕ / мл токсигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis* № 665

Разведение	Количество м.к. в 1 мл взвеси бактериальной культуры по стандарту мутности (10 МЕ)	Число колониеобразующих единиц в 1 мл взвеси бактериальной культуры (КОЕ / мл)
– 1	5×10^8	Не поддается подсчету
– 2	5×10^7	Не поддается подсчету
– 3	5×10^6	Не поддается подсчету
– 4	5×10^5	Не поддается подсчету
– 5	5×10^4	Не поддается подсчету
– 6	5×10^3	$3,6 \times 10^3$
– 7	10^3	$4,5 \times 10^2$

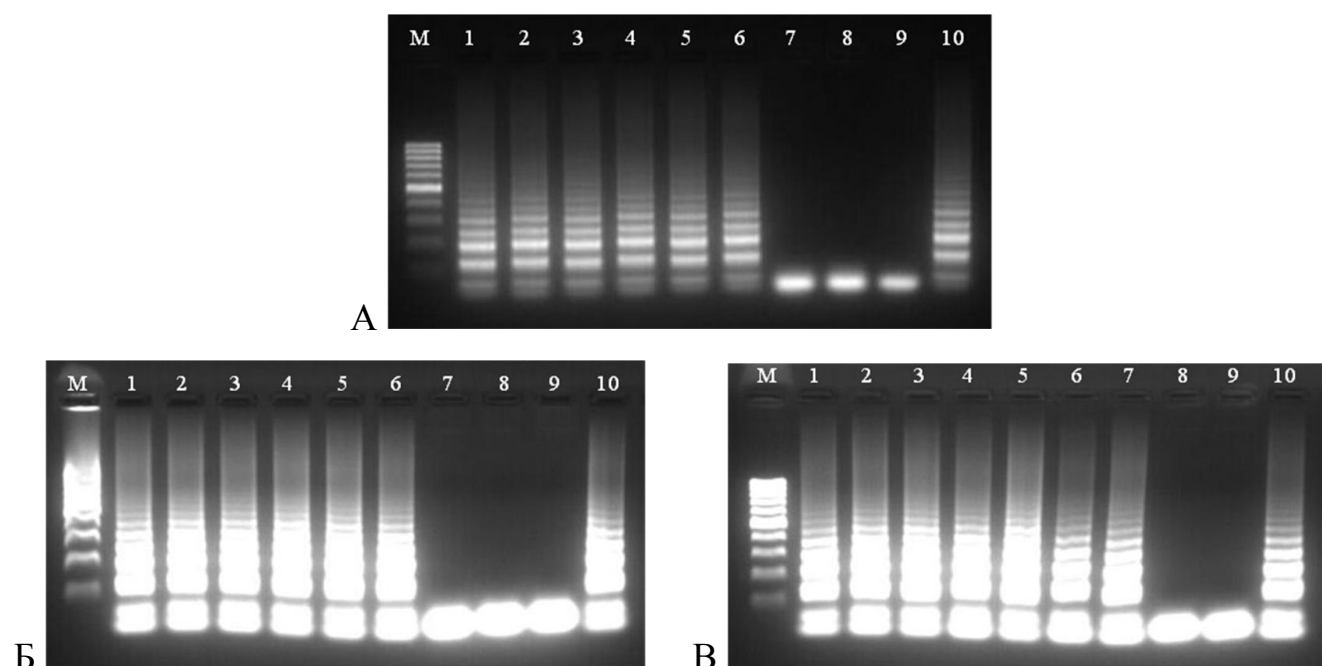


Рисунок 11 – Электрофореграмма продуктов изотермической амплификации: порог аналитической чувствительности при использовании коммерческих наборов реагентов для выделения ДНК «К-СОРБ» (А), «АмплиПрайм® ДНК-сорб-АМ» (Б) и «АмплиПрайм® РИБО-преп» (В)

Примечание: М – маркер молекулярных весов ДНК GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific; 1 – 5×10^8 ГЭ / мл; 2 – 5×10^7 ГЭ / мл; 3 – 5×10^6 ГЭ / мл; 4 – 5×10^5 ГЭ / мл; 5 – 5×10^4 ГЭ / мл; 6 – 5×10^3 ГЭ / мл; 7 – 10^3 ГЭ / мл; 8 – отрицательный контроль экстракции; 9 – отрицательный контроль (ПЦР-смесь); 10 – положительный контроль (ДНК токсигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis* № 665)

3.3. Оценка аналитической специфичности разработанного метода генодиагностики

Оценка аналитической специфичности разработанного метода генодиагностики возбудителя дифтерии проведена на типовых коллекционных и свежевыделенных штаммах представителей рода *Corynebacterium* и микроорганизмов других родов (Таблицы 1, 2, 3, 4). Исследование показало, что во всех образцах, содержащих ДНК микроорганизмов представителей рода *Corynebacterium*, положительные сигналы отсутствовали (Рисунок 12).

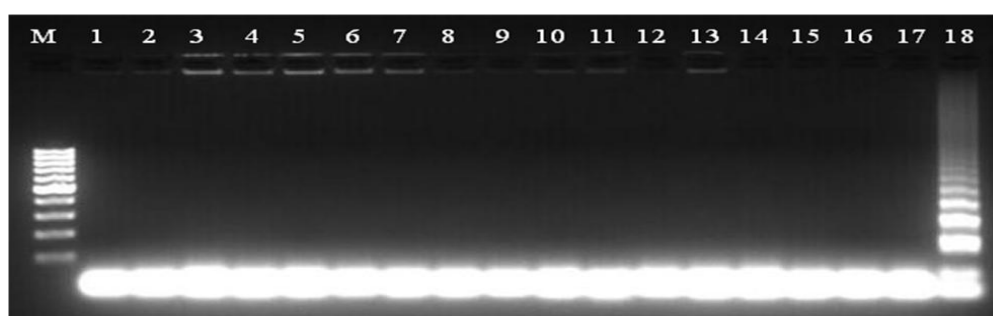


Рисунок 12 – Электрофореграмма продуктов изотермической амплификации: ДНК 16 штаммов представителей рода *Corynebacterium* (пример)

Примечание: М – маркер молекулярных весов ДНК GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific; 1 - 16 – ДНК штаммов *C.accolens*, *C.afermentas sub. lipophilum*, *C.amycolatum*, *C.coyleae*, *C.durum*, *C.imitans*, *C.jejikeium*, *C.mucifaciens*, *C.paurometabolum*, *C.propinquum*, *C.pseudodiphtheriticum*, *C.pseudotuberculosis*, *C.tuberculostrictum*, *C.ulcerans*, *C.urealyticum*, *C.xerosis*; 17 – отрицательный контроль (ПЦР-смесь); 18 – положительный контроль (ДНК токсигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis* № 665)

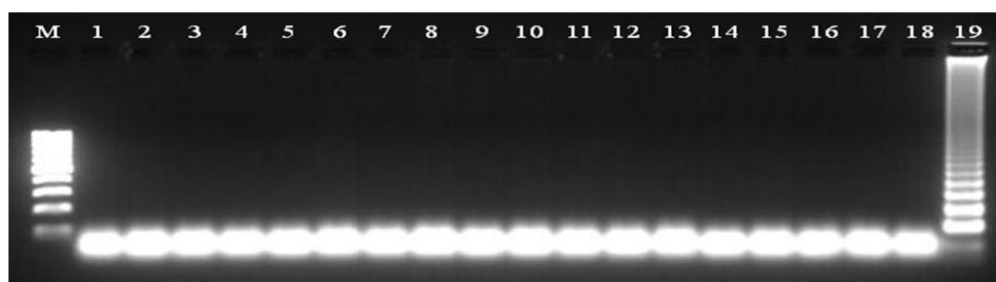


Рисунок 13 – Электрофореграмма продуктов изотермической амплификации: ДНК 17 штаммов микроорганизмов других родов (пример)

Примечание: М – маркер молекулярных весов ДНК GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific; 1 - 17 – ДНК штаммов *A.viscosus*, *B.bronchiseptica*, *B.parapertussis*, *B.pertussis*, *C.albicans*, *H.influenzae*, *K.pneumoniae subsp. ozaenae*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*, *S.epidermidis*, *S.hominis*, *S.mitis*, *S.oralis*, *S.parasanguinis*, *S.pneumoniae*, *S.pyogenes*, *S.salivarius*; 18 – отрицательный контроль (ПЦР-смесь); 19 – положительный контроль (ДНК токсигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis* № 665)

Аналогичные результаты были получены при тестировании образцов, содержащих ДНК микроорганизмов других родов (Рисунок 13). Таким образом, разработанный способ генодиагностики возбудителя дифтерии обладает 100 % аналитической специфичностью.

3.4. Апробация метода генодиагностики в модельных экспериментах на иммитантах клинических образцов

В связи с отсутствием проб биологического материала от больных с дифтерией апробацию разработанного способа генодиагностики осуществляли в модельных экспериментах на иммитантах клинических образцов в лабораторных условиях.

Иммитанты готовили следующим образом. У практически здоровых добровольцев из зева брали мазки двумя сухими стерильными одноразовыми зондами-тампонами. Далее в лабораторных условиях на тампоны, используя стерильный наконечник с аэрозольным барьером, наносили (заражали) 100 мкл бактериальной взвеси типового контрольного токсигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis* № 665 с различной концентрацией м.к. в 1 мл (Таблица 23), приготовление которой осуществляли в соответствии с [53]. Бактериальную взвесь микробов каждой концентрации наносили на два тампона. Далее материал с первого тампона засекали на плотную питательную среду КТА, а со второго тампона – производили смыв в 0,5 мл стерильного физиологического раствора для последующего выделения ДНК. Посевы термостатировали при температуре 37 °С. Подсчет числа выросших колоний осуществляли через 24 и 48 часов. Для чистоты проведения эксперимента готовили три линейки последовательных разведений бактериальной культуры типового контрольного токсигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis* № 665.

В ходе исследования было установлено, что аналитическая чувствительность на иммитантах клинических образцов составила 5×10^3 ГЭ / мл (Рисунок 14). При сопоставлении полученных данных с результатами бактериологического исследования истинное значение аналитической

чувствительности соответствовало $2,3 \times 10^3$ ГЭ / мл (Таблица 23).

Таблица 23 – Схема приготовления разведений и учет КОЕ / мл токсигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis* № 665 при работе с иммитантами клинических образцов

Разведение	Количество м.к. в 1 мл взвеси бактериальной культуры по стандарту мутности (10 МЕ)	Число колониеобразующих единиц в 1 мл взвеси бактериальной культуры (КОЕ / мл)
– 1	5×10^8	Не поддается подсчету
– 2	5×10^7	Не поддается подсчету
– 3	5×10^6	Не поддается подсчету
– 4	5×10^5	Не поддается подсчету
– 5	5×10^4	Не поддается подсчету
– 6	5×10^3	$2,3 \times 10^3$
– 7	10^3	$3,2 \times 10^2$

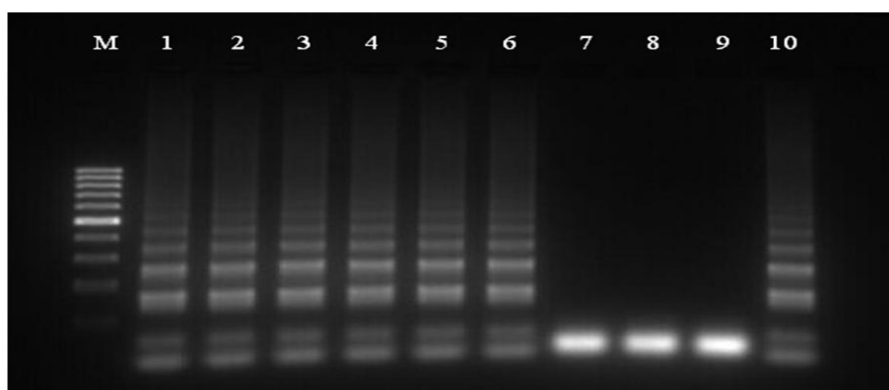


Рисунок 14 – Электрофореграмма продуктов изотермической амплификации: порог аналитической чувствительности при работе с иммитантами клинических образцов (пример)

Примечание: М – маркер молекулярных весов ДНК GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific; 1 – 5×10^8 ГЭ / мл; 2 – 5×10^7 ГЭ / мл; 3 – 5×10^6 ГЭ / мл; 4 – 5×10^5 ГЭ / мл; 5 – 5×10^4 ГЭ / мл; 6 – 5×10^3 ГЭ / мл; 7 – 10^3 ГЭ / мл; 8 – отрицательный контроль экстракции; 9 – отрицательный контроль (ПЦР-смесь); 10 – положительный контроль (ДНК токсигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis* № 665)

Учитывая показания к обследованию больных с подозрением на дифтерию, бактерионосителей и многочисленные работы, свидетельствующие о том, что при тонзиллитах выделяются *C.diphtheriae* [145, 155, 208], нами проведена апробация разработанного способа генодиагностики на клиническом материале, который

был получен от 79 пациентов с различными формами хронического тонзиллита и патологией полости носа, поступивших в ГБУЗ НИКИО им. Л.И. Свержевского ДЗМ на плановую госпитализацию.

Двумя сухими стерильными одноразовыми тампонами из зева пациента брали мазки. После взятия материала рабочую часть зонда одного тампона помещали в одноразовую пробирку типа эппендорф с 0,5 мл стерильного физиологического раствора. Далее производили смыв патологического материала и выделение ДНК. Установлено, что во всех пробах положительные сигналы отсутствовали, то есть ни у кого из обследованных ДНК *C.diphtheriae* не была обнаружена. Параллельно с этим второй тампон исследовали бактериологическим методом, по результатам которого штаммы *C.diphtheriae* не были выделены.

Резюме. Разработан способ генодиагностики дифтерийной инфекции на основе метода LAMP, позволяющий обнаружить ДНК возбудителя в клиническом материале в течение 4 - 4,5 часов. В предложенном способе НТТН-штаммы *C.diphtheriae*, у которых фенотип Тох- обусловлен наличием в гене *tox* мобильного генетического IS-2 элемента, идентифицируются как нетоксигенные, а НТТН-штаммы, у которых фенотип Тох- обусловлен делецией или наличием мобильного генетического IS-1 элемента в гене *tox*, идентифицируются как токсигенные. Показаны возможности детекции результатов реакции методом электрофореза и с помощью интеркалирующего красителя. Определены аналитические характеристики разработанного способа: чувствительность на коллекционном штамме *C.diphtheriae* биовара *gravis* № 665 составила $4,5 \times 10^{-2}$ ГЭ / мл, на иммитантах клинических образцов – $2,3 \times 10^{-3}$ ГЭ / мл; определена 100 % специфичность на типовых коллекционных и свежевыделенных штаммах *C.diphtheriae*, штаммах представителей рода *Corynebacterium*, штаммах других микроорганизмов и клинических образцах, полученных от больных с тонзиллярной патологией и патологией полости носа.

ГЛАВА 4. Разработка метода генодиагностики дифтерийной инфекции на основе мультиплексной ПЦР

4.1. Разработка метода генодиагностики в мультиплексном формате для выявления ДНК возбудителя дифтерии

ПЦР в формате мультиплекс позволяет одновременно в одной реакции выявлять либо несколько мишеней у одного микроорганизма, либо нескольких микроорганизмов. Несмотря на то, что возбудителем дифтерийной инфекции являются только токсигенные *C.diphtheriae* [48, 117], в последние годы в зарубежной литературе все чаще появляются сообщения о выделении *C.ulcerans* от пациентов с дифтериеподобными заболеваниями, характеризующимися тяжелым течением, вплоть до летального исхода [176, 182, 223]. К тому же среди людей продолжают циркулировать НТТН-штаммы *C.diphtheriae* [11, 39, 124], хотя вопрос об их эпидемиологическом значении до сих пор остается открытым. В последние годы также возрос интерес к нетоксигенным *C.diphtheriae*, с выделением которых на данный момент связывают развитие тонзиллитов, фарингитов, эндокардитов, артритов, абсцессов и остеомиелитов.

Представленный в главе 3 разработанный метод генодиагностики на основе LAMP позволяет обнаружить ДНК возбудителя дифтерии в клиническом материале в течение 4 - 4,5 часов от начала исследования и может использоваться в лабораториях различного уровня финансирования. Вместе с тем этот способ не позволяет дифференцировать НТТН-штаммы *C.diphtheriae* с различными дефектами гена *tox*, что является необходимым при верификации выделенных на территории России штаммов *C.diphtheriae* в Референс-центре по дифтерии и коклюшу, а также при проведении мониторинга возбудителя в системе эпиднадзора за дифтерийной инфекцией.

Поэтому целью данного исследования являлась разработка способа по выявлению и дифференциации ДНК токсигенных и нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* и *C.ulcerans* и НТТН-штаммов *C.diphtheriae* на основе метода ПЦР в

формате мультиплекс.

Первоначально был осуществлен подбор уникальных ДНК-мишеней. Выявлены последовательности фрагментов пяти генов: гена *16SrRNA*, кодирующего рибосомальную РНК; гена *tox*, кодирующего синтез главного фактора патогенности возбудителя дифтерии – ДТ (два фрагмента); гена *rpoB*, кодирующего β -субъединицу РНК-полимеразы; гена *dtxR*, кодирующего DtxR белок, осуществляющий железо-опосредованную репрессию гена *tox* и присутствующий у всех штаммов *C.diphtheriae*; гена *amy*, кодирующего фермент амилазу, участвующий в процессе разложения крахмала. На основании последовательностей выбранных фрагментов генов *16SrRNA*, *tox*, *rpoB*, *dtxR* и *amy* с помощью программ PerlPrimer 1.1.21. и BLAST были подобраны олигонуклеотидные праймеры, обеспечивающие амплификацию фрагментов указанных локусов размером 816 п.н., 624 п.н. и 514 п.н., 446 п.н., 258 п.н. и 131 п.н., соответственно (Таблица 24). Выбор праймеров осуществляли с учетом возможности их использования в формате мультиплекс.

Таблица 24 – Последовательности праймеров, использованные для проведения ПЦР в формате мультиплекс

Праймер	Последовательность нуклеотидов 5' – 3'
16S F	ACCGCACTTTAGTGTGTGTG [233]
16S R	TCTCTACGCCGATCTTGTAT [233]
DT F	Подана заявка на депонирование последовательности
DT 514 F	Подана заявка на депонирование последовательности
DT R	Подана заявка на депонирование последовательности
C 2700 F	CGTATGAACATCGGCCAGGT [233]
C 3130 R	TCCATTTGCGCCGAAGCGCTG [233]
dtxR1 F	GGGACTACAACGCAACAAGAA [206]
dtxR1 R	CAACGGTTTGGCTAACTGTA [206]
New Amy F	CGTGTGGTCAGTCGAAGGAA
New Amy R1	TGGACAGGCCAACGGAATAC

Постановку ПЦР в формате мультиплекс осуществляли в двух пробирках с использованием реакционных смесей № 1 и № 2. Состав реакционной смеси № 1: 3 мкл 10× ПЦР буфера с KCl и 15 mM MgCl₂, 2 mM смесь dNTP, по 5 pmol праймеров 16S F - 16S R, DT 514 F - DT R, C 2700 F - C 3130 R, dtxR1 F - dtxR1 R, New Amy F - New Amy R1, 2,5 ед. Taq ДНК-полимеразы (на одну реакцию). Состав реакционной смеси № 2: 3 мкл 10× ПЦР буфера с KCl и 15 mM MgCl₂, 2 mM смесь dNTP, по 5 pmol праймеров DT F - DT R, 2,5 ед. Taq ДНК-полимеразы (на одну реакцию).

Выбрана оптимальная программа амплификации (Таблица 25). Для предотвращения появления неспецифических продуктов реакции использовали «горячий старт». Амплификацию проводили с 3 мкл препарата ДНК в общем объеме реакционной смеси 25 мкл в четырехканальном амплификаторе «Терцик». В качестве положительного контроля амплификации использовали ДНК токсигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis* № 665.

Таблица 25 – Программа амплификации для проведения «расширенного варианта» ПЦР в формате мультиплекс

Температура	Время	Количество циклов
95 °C	3 мин	1
95 °C	60 с	34
55 °C	40 с	
68 °C	90 с	
68 °C	5 мин	1

На этапе амплификации в пробирке № 1 одновременно проводилось пять реакций: амплификация консервативного фрагмента родового для коринебактерий гена *groB*, амплификация специфических фрагментов в геномах *C.diphtheriae* (генов *dtxR* и *amy*) и *C.ulcerans* (гена *16SrRNA*) и амплификация консервативного фрагмента гена *tox* размером 514 п.н. В пробирке № 2 проводилась одна реакция – амплификация консервативного фрагмента гена *tox* размером 624 п.н. (Рисунки 15 А и 15 Б, 16 А и 16 Б).

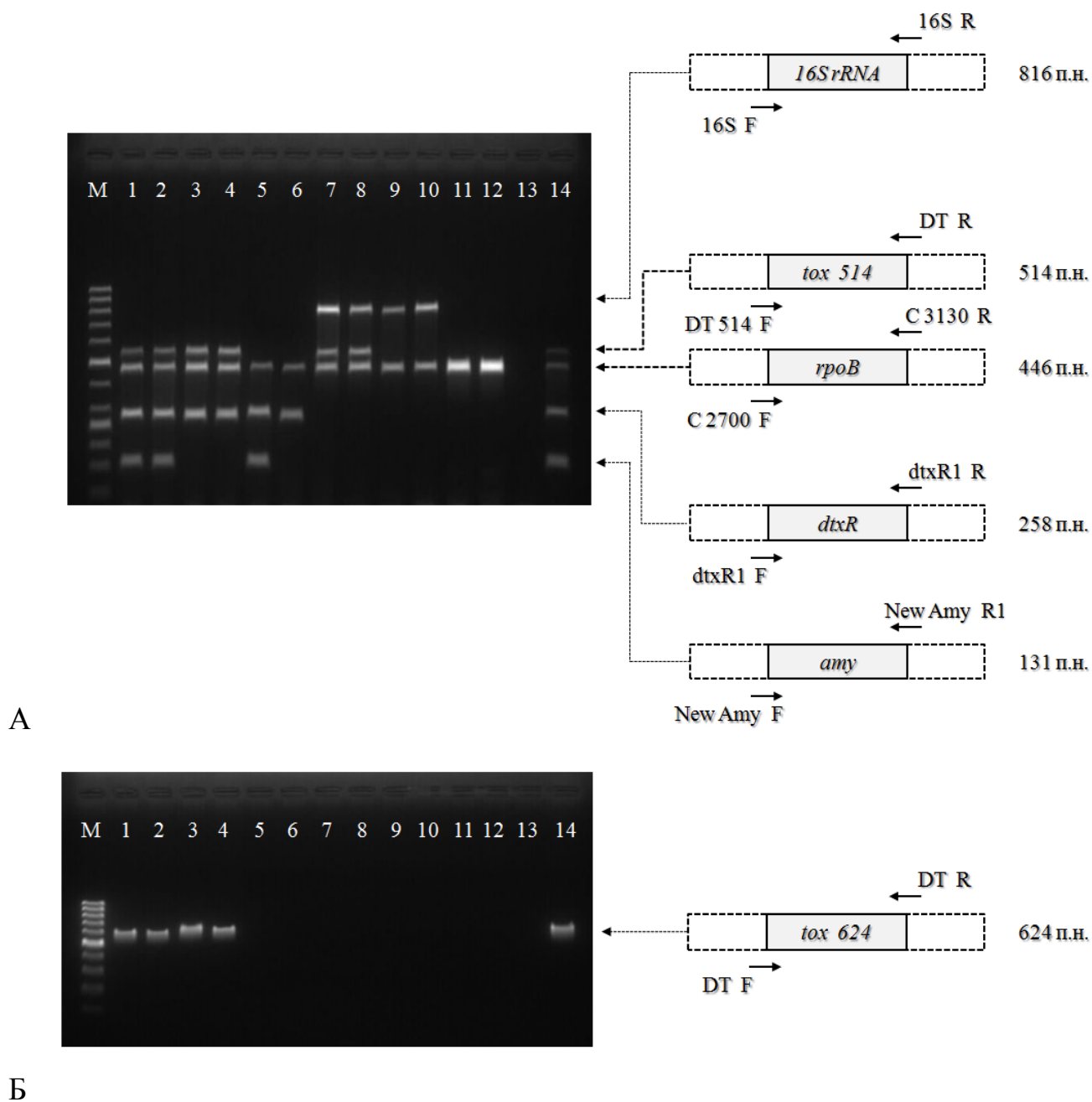


Рисунок 15 – Электрофореграмма продуктов ПЦР в формате мультиплекс, полученных в ходе амплификации в пробирке № 1 (А) и пробирке № 2 (Б): ДНК 12 штаммов рода *Corynebacterium* («расширенный вариант») (пример)

Примечание: М – маркер молекулярных весов ДНК: А - GeneRuler 50 DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific (фрагмент длиной 50 п.н. на рисунке не просматривается), Б - GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific; 1, 2 – ДНК токсигенных штаммов *C.diphtheriae* биовара *gravis*; 3, 4 – ДНК токсигенных штаммов *C.diphtheriae* биовара *mitis*; 5 – ДНК нетоксигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis*; 6 – ДНК нетоксигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *mitis*; 7, 8 – ДНК токсигенных штаммов *C.ulcerans*; 9, 10 – ДНК нетоксигенных штаммов *C.ulcerans*; 11, 12 – ДНК штаммов *Corynebacterium spp.*; 13 – отрицательный контроль (ПЦ-смесь); 14 – положительный контроль (ДНК токсигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis* № 665)

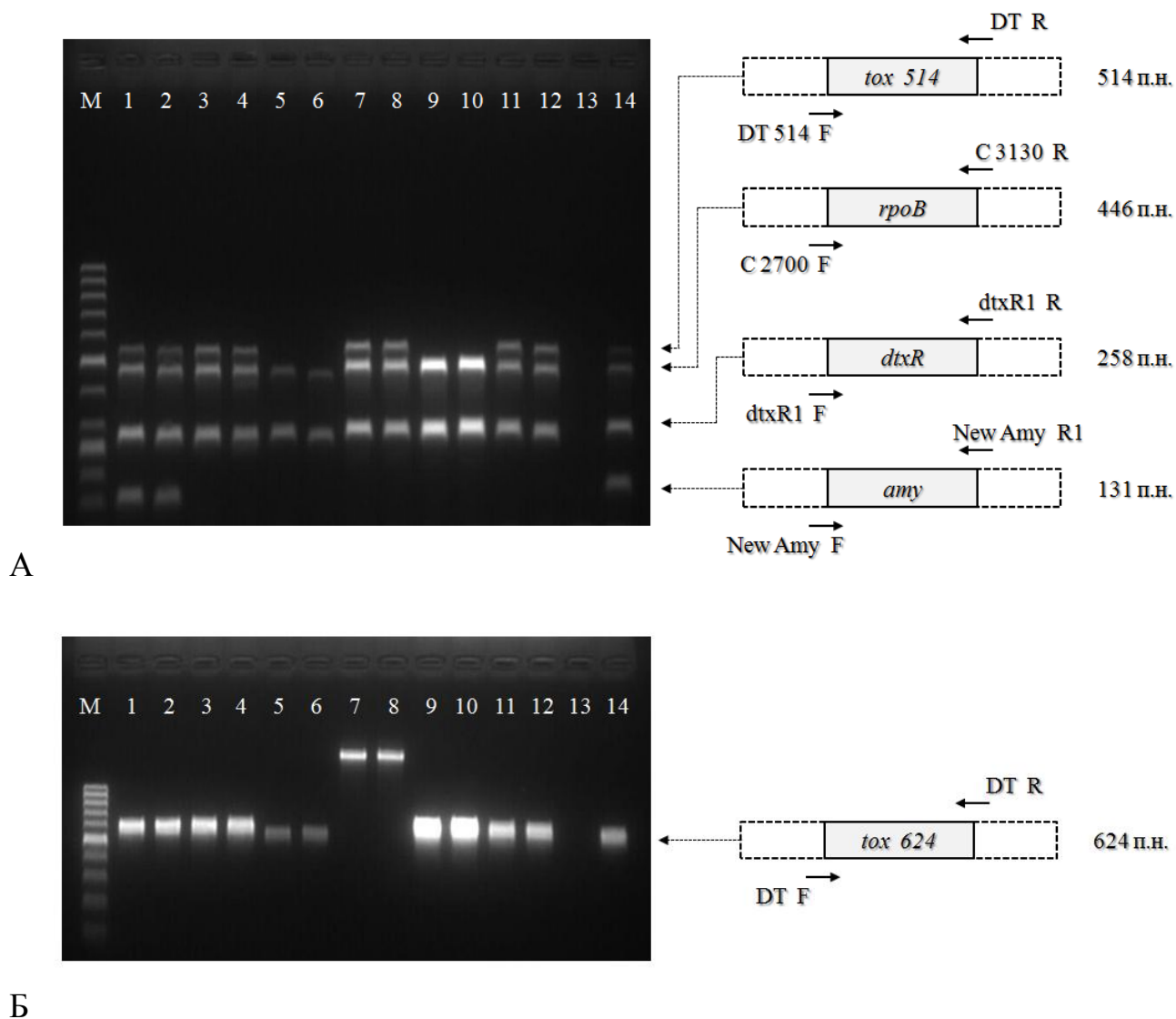


Рисунок 16 – Электрофореграмма продуктов ПЦР в формате мультиплекс, полученных в ходе амплификации в пробирке № 1 (А) и пробирке № 2 (Б): ДНК 12 штаммов *C.diphtheriae* («расширенный вариант») (пример)

Примечание: М – маркер молекулярных весов ДНК: А - GeneRuler 50 DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific (фрагменты длиной 50 п.н. и 100 п.н. на рисунке не просматриваются), Б - GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific; 1, 2 – ДНК токсигенных штаммов *C.diphtheriae* биовара *gravis*; 3, 4 – ДНК токсигенных штаммов *C.diphtheriae* биовара *mitis*; 5, 6, 9, 10 – ДНК НТТН-штаммов *C.diphtheriae* биовара *mitis*, содержащих делецию нуклеотида G в позиции 55 в гене *tox*; 7, 8 – ДНК НТТН-штаммов *C.diphtheriae* биовара *mitis*, содержащих мобильный генетический IS-1 элемент в гене *tox*; 11, 12 – ДНК НТТН-штаммов *C.diphtheriae* биовара *mitis*, содержащих мобильный генетический IS-2 элемент в гене *tox*; 13 – отрицательный контроль (ПЦР-смесь); 14 – положительный контроль (ДНК токсигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis* № 665)

Детекцию ПЦР-продуктов осуществляли методом горизонтального электрофореза в 2 % агарозном геле в 50х ТАЕ-буфере с последующей визуализацией с помощью гельдокументирующей системы.

Для токсигенных штаммов *C.diphtheriae* биовара *gravis* характерным было наличие пяти фрагментов четырех генов – *tox* (624 п.н. и 514 п.н.), *rpoB* (446 п.н.), *dtxR* (258 п.н.) и *amy* (131 п.н.); для нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* биовара *gravis* – наличие фрагментов трех генов – *rpoB* (446 п.н.), *dtxR* (258 п.н.) и *amy* (131 п.н.); для токсигенных штаммов *C.diphtheriae* биовара *mitis* и НТТН-штаммов *C.diphtheriae*, содержащих IS-2 элемент в гене *tox* – наличие четырех фрагментов трех генов – *tox* (624 п.н. и 514 п.н.), *rpoB* (446 п.н.) и *dtxR* (258 п.н.); для НТТН-штаммов *C.diphtheriae*, содержащих IS-1 элемент в гене *tox* – наличие фрагментов трех генов – *tox* (514 п.н.), *rpoB* (446 п.н.) и *dtxR* (258 п.н.); для НТТН-штаммов *C.diphtheriae*, содержащих делецию в гене *tox* – наличие фрагментов трех генов – *tox* (624 п.н.), *rpoB* (446 п.н.) и *dtxR* (258 п.н.); для нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* биовара *mitis* – наличие фрагментов двух генов – *rpoB* (446 п.н.) и *dtxR* (258 п.н.); для токсигенных штаммов *C.ulcerans* – наличие фрагментов трех генов – *16SrRNA* (816 п.н.), *tox* (514 п.н.) и *rpoB* (446 п.н.); для нетоксигенных штаммов *C.ulcerans* – наличие фрагментов двух генов – *16SrRNA* (816 п.н.) и *rpoB* (446 п.н.); для штаммов других представителей рода *Corynebacterium* – наличие фрагмента одного гена – *rpoB* (446 п.н.) (Таблица 26).

Таблица 26 – Выявляемые в ходе проведения ПЦР в формате мультиплекс ДНК-мишени у *C.diphtheriae*, *C.ulcerans* и *Corynebacterium spp.*

Идентифицируемый микроорганизм	Ген <i>16SrRNA</i>	Ген <i>tox</i>		Ген <i>rpoB</i>	Ген <i>dtxR</i>	Ген <i>amy</i>
	816 п.н.	624 п.н.	514 п.н.	446 п.н.	258 п.н.	131 п.н.
<i>C.diphtheriae</i> биовара <i>gravis</i> токсигенные	–	+	+	+	+	+
<i>C.diphtheriae</i> биовара <i>gravis</i> нетоксигенные	–	–	–	+	+	+
<i>C.diphtheriae</i> биовара <i>mitis</i> токсигенные	–	+	+	+	+	–
<i>C.diphtheriae</i> биовара <i>mitis</i> НТТН-штаммы, содержащие IS-2 элемент в гене <i>tox</i>	–	+	+	+	+	–

Продолжение таблицы 26

Идентифицируемый микроорганизм	Ген <i>16SrRNA</i>	Ген <i>tox</i>		Ген <i>rpoB</i>	Ген <i>dtxR</i>	Ген <i>amy</i>
	816 п.н.	624 п.н.	514 п.н.	446 п.н.	258 п.н.	131 п.н.
<i>C.diphtheriae</i> биовара <i>mitis</i> НТТН-штаммы, содержащие IS-1 элемент в гене <i>tox</i>	—	—	+	+	+	—
<i>C.diphtheriae</i> биовара <i>mitis</i> НТТН-штаммы, содержащие делецию нуклеотида G в позиции 55 в гене <i>tox</i>	—	+	—	+	+	—
<i>C.diphtheriae</i> биовара <i>mitis</i> нетоксигенные	—	—	—	+	+	—
<i>C.ulcerans</i> токсигенные	+	—	+	+	—	—
<i>C.ulcerans</i> нетоксигенные	+	—	—	+	—	—
<i>Corynebacterium spp.</i>	—	—	—	+	—	—

Таким образом, «расширенный вариант» ПЦР в формате мультиплекс с одномоментной постановкой в двух пробирках позволяет выявлять ДНК токсигенных и нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* биоваров *gravis* и *mitis*, ДНК НТТН-штаммов, у которых фенотип Тох- обусловлен делецией или наличием мобильного генетического IS-1 элемента в гене *tox*, ДНК токсигенных и нетоксигенных штаммов *C.ulcerans* и ДНК штаммов других представителей рода *Corynebacterium*. Однако с помощью разработанного «расширенного варианта» дифференциация исследуемых штаммов проводится только при работе с выделенными чистыми культурами микроорганизмов, и он может быть использован в рамках осуществления мониторинга за возбудителем в системе эпиднадзора за дифтерийной инфекцией.

Для применения ПЦР в мультиплексном формате в диагностических целях нами предложен «сокращенный вариант» с постановкой в два этапа, что дает возможность использовать этот способ для исследования биологического

материала непосредственно с тампона от больного с подозрением на дифтерию или дифтериеподобное заболевание.

С целью выявления в изучаемом образце ДНК токсигенных штаммов *C.diphtheriae* биоваров *gravis* и *mitis*, а также ДНК токсигенных штаммов *C.ulcerans*, для I этапа ПЦР в формате мультиплекс в качестве мишеней были выбраны фрагменты трех генов – *tox* (514 п.н.), *dtxR* (258 п.н.) и *amy* (131 п.н.).

Объем реакционной смеси содержал: 3 мкл 10× ПЦР буфера с KCl и 15 mM MgCl₂, 2 mM смесь dNTP, по 5 pmol праймеров DT 514 F - DT R, dtxR1 F - dtxR1 R, New Amy F - New Amy R1, 2,5 ед. Taq ДНК-полимеразы (на одну реакцию), 3 мкл препарата ДНК. Условия проведения амплификации представлены в таблице 27.

Таблица 27 – Программа амплификации для проведения «сокращенного варианта» ПЦР в формате мультиплекс

Температура	Время	Количество циклов
95 °C	5 мин	1
94 °C	30 с	30
58 °C	30 с	
72 °C	30 с	

Так, для токсигенных штаммов *C.diphtheriae* биовара *gravis* характерным было наличие трех фрагментов генов – *tox* (514 п.н.), *dtxR* (258 п.н.) и *amy* (131 п.н.); для токсигенных штаммов *C.diphtheriae* биовара *mitis* и НТТН-штаммов *C.diphtheriae*, содержащих IS-элементы в гене *tox* – двух фрагментов генов – *tox* (514 п.н.) и *dtxR* (258 п.н.); для нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* биовара *gravis* – двух фрагментов генов – *dtxR* (258 п.н.) и *amy* (131 п.н.); для нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* биовара *mitis* и НТТН-штаммов *C.diphtheriae*, содержащих делецию в гене *tox* – одного фрагмента гена *dtxR* (258 п.н.); для токсигенных штаммов *C.ulcerans* – одного фрагмента гена *tox* (514 п.н.). Таким образом, НТТН-штаммы *C.diphtheriae*, у которых фенотип Тох- обусловлен

наличием мобильных генетических IS-элементов в гене *tox*, по итогам I этапа будут определяться как токсигенные штаммы *C.diphtheriae* биовара *mitis*. При этом НТТН-штаммы *C.diphtheriae*, содержащие делецию в гене *tox*, войдут в группу нетоксигенных штаммов (Рисунок 17).

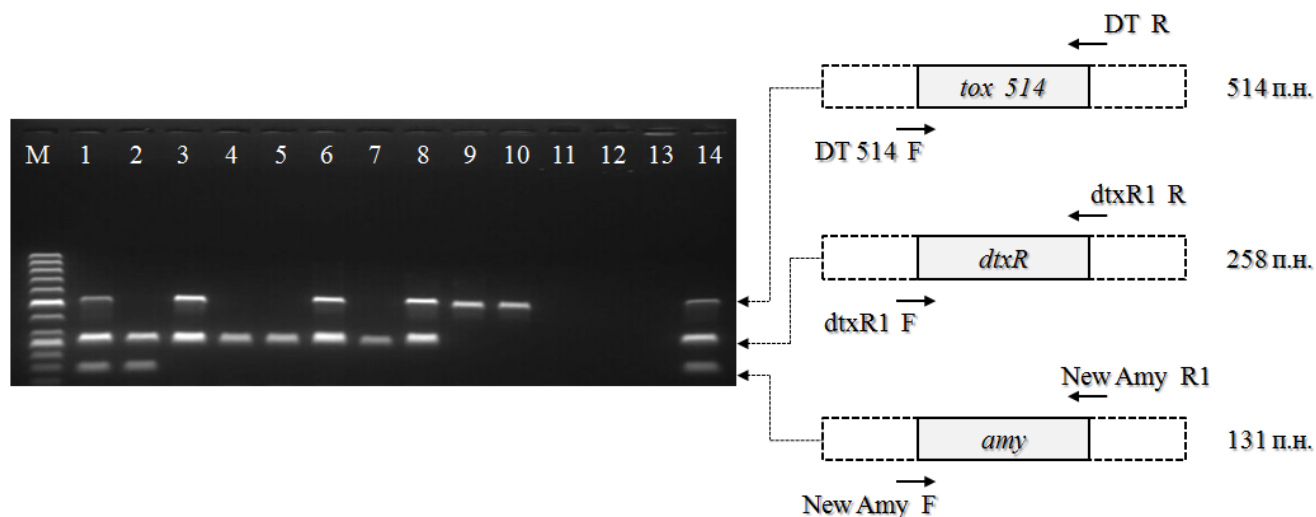


Рисунок 17 – Электрофореграмма продуктов ПЦР в формате мультиплекс, полученных в ходе амплификации при проведении I этапа: ДНК 8 штаммов *C.diphtheriae* и 4 штаммов *C.ulcerans* («сокращенный вариант») (пример)

Примечание: М – маркер молекулярных весов ДНК GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific (фрагмент длиной 50 п.н. на рисунке не просматривается); 1 – ДНК токсигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis*; 2 – ДНК нетоксигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis*; 3 – ДНК токсигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *mitis*; 4 – ДНК нетоксигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *mitis*; 5, 7 – ДНК НТТН-штаммов *C.diphtheriae* биовара *mitis*, содержащих делецию нуклеотида G в позиции 55 в гене *tox*; 6 – ДНК НТТН-штамма *C.diphtheriae* биовара *mitis*, содержащего мобильный генетический IS-1 элемент в гене *tox*; 8 – ДНК НТТН-штамма *C.diphtheriae* биовара *mitis*, содержащего мобильный генетический IS-2 элемент в гене *tox*; 9, 10 – ДНК токсигенных штаммов *C.ulcerans*; 11, 12 – ДНК нетоксигенных штаммов *C.ulcerans*; 13 – отрицательный контроль (ПЦР-смесь); 14 – положительный контроль (ДНК токсигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis* № 665)

Следовательно, на I этапе ПЦР-исследования выявляются предположительно токсигенные штаммы *C.ulcerans* и проводится дифференциация нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* биоваров *gravis* и *mitis* от предположительно токсигенных. И те ДНК-пробы, которые оказались положительными по наличию фрагмента гена *tox* размером 514 п.н. при проведении I этапа исследования, подлежат обязательному изучению во II этапе.

Для II этапа ПЦР в формате мультиплекс в качестве мишеней выбраны

фрагменты также трех генов – *16SrRNA* (816 п.н.), *tox* (624 п.н.) и *rpoB* (446 п.н.).

Реакционная смесь содержала: 3 мкл 10× ПЦР буфера с KCl и 15 mM MgCl₂, 2 mM смесь dNTP, по 5 pmol праймеров 16S F - 16S R, DT F - DT R, C 2700 F - C 3130 R, 2,5 ед. Taq ДНК-полимеразы (на одну реакцию), 3 мкл препарата ДНК. Амплификацию проводили при условиях, представленных в таблице 27.

При этом для токсигенных штаммов *C.diphtheriae* биоваров *gravis* и *mitis*, а также для НТТН-штаммов *C.diphtheriae*, содержащих делецию или мобильный генетический IS-2 элемент в гене *tox*, характерным было наличие двух фрагментов генов – *tox* (624 п.н.) и *rpoB* (446 п.н.); для нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* биоваров *gravis* и *mitis*, а также для НТТН-штаммов *C.diphtheriae*, содержащих мобильный генетический IS-1 элемент в гене *tox*, – одного фрагмента гена *rpoB* (446 п.н.); для нетоксигенных и токсигенных штаммов *C.ulcerans* – двух фрагментов генов – *16SrRNA* (816 п.н.) и *rpoB* (446 п.н.) (Рисунок 18).

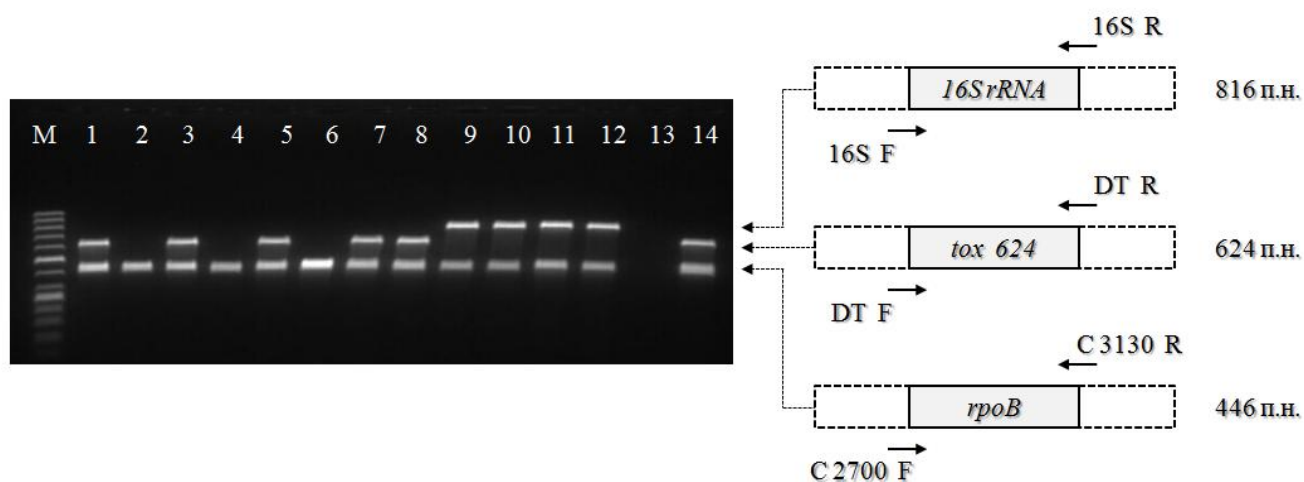


Рисунок 18 – Электрофореграмма продуктов ПЦР в формате мультиплекс, полученных в ходе амплификации при проведении II этапа: ДНК 8 штаммов *C.diphtheriae* и 4 штаммов *C.ulcerans* («сокращенный вариант») (пример)

Примечание: М – маркер молекулярных весов ДНК GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific; 1 – ДНК токсигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis*; 2 – ДНК нетоксигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis*; 3 – ДНК токсигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *mitis*; 4 – ДНК нетоксигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *mitis*; 5, 7 – ДНК НТТН-штаммов *C.diphtheriae* биовара *mitis*, содержащих делецию нуклеотида G в позиции 55 в гене *tox*; 6 – ДНК НТТН-штамма *C.diphtheriae* биовара *mitis*, содержащего мобильный генетический IS-1 элемент в гене *tox*; 8 – ДНК НТТН-штамма *C.diphtheriae* биовара *mitis*, содержащего мобильный генетический IS-2 элемент в гене *tox*; 9, 10 – ДНК токсигенных штаммов *C.ulcerans*; 11, 12 – ДНК нетоксигенных штаммов *C.ulcerans*; 13 – отрицательный контроль (ПЦР-смесь); 14 – положительный контроль (ДНК токсигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis* № 665)

Таким образом, на II этапе ПЦР-исследования выявляются истинно токсигенные штаммы *C.ulcerans* и проводится окончательная дифференциация истинно токсигенных штаммов *C.diphtheriae* двух биоваров (возбудителя дифтерии) от НТТН-штаммов *C.diphtheriae*, у которых фенотип Тох- обусловлен наличием мобильного генетического IS-1 элемента в гене *tox*. При этом НТТН-штаммы *C.diphtheriae*, содержащие мобильный генетический IS-2 элемент в гене *tox*, остаются в группе токсигенных штаммов.

Разработанный способ для выявления ДНК возбудителя дифтерии методом ПЦР в формате мультиплекс в «расширенном» и «сокращенном» вариантах апробирован на типовых коллекционных штаммах *C.diphtheriae* (Таблица 1) и на штаммах *C.diphtheriae*, выделенных из клинического материала от пациентов с подозрением на дифтерию (Таблица 2). Изучено 50 токсигенных и 130 нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* биоваров *gravis* и *mitis*, а также 15 НТТН-штаммов *C.diphtheriae* с разными дефектами гена *tox*. Установлено, что с помощью «расширенного» и «сокращенного» вариантов в 100 % случаев дифференцировались токсигенные и нетоксигенные штаммы *C.diphtheriae* биоваров *gravis* и *mitis*. НТТН-штаммы *C.diphtheriae* биовара *mitis*, содержащие делецию или мобильный генетический IS-1 элемент в гене *tox*, идентифицировались как нетоксигенные, а НТТН-штаммы коринебактерий, содержащие IS-2 элемент в гене *tox*, – как токсигенные.

4.2. Оценка аналитической специфичности разработанных вариантов метода генодиагностики

Оценка аналитической специфичности «расширенного» и «сокращенного» вариантов проведена на свежевыделенных и типовых коллекционных штаммах представителей рода *Corynebacterium* и микроорганизмов других родов (Таблицы 1, 2, 3, 4).

В ходе проведенного эксперимента выявлено, что во всех образцах, содержащих ДНК штаммов представителей рода *Corynebacterium*, положительные сигналы регистрировали только по фрагменту гена *rpoB* (446 п.н.), все остальные

фрагменты генов отсутствовали (Рисунки 19 А и 19 Б, 20 А и 20 Б).

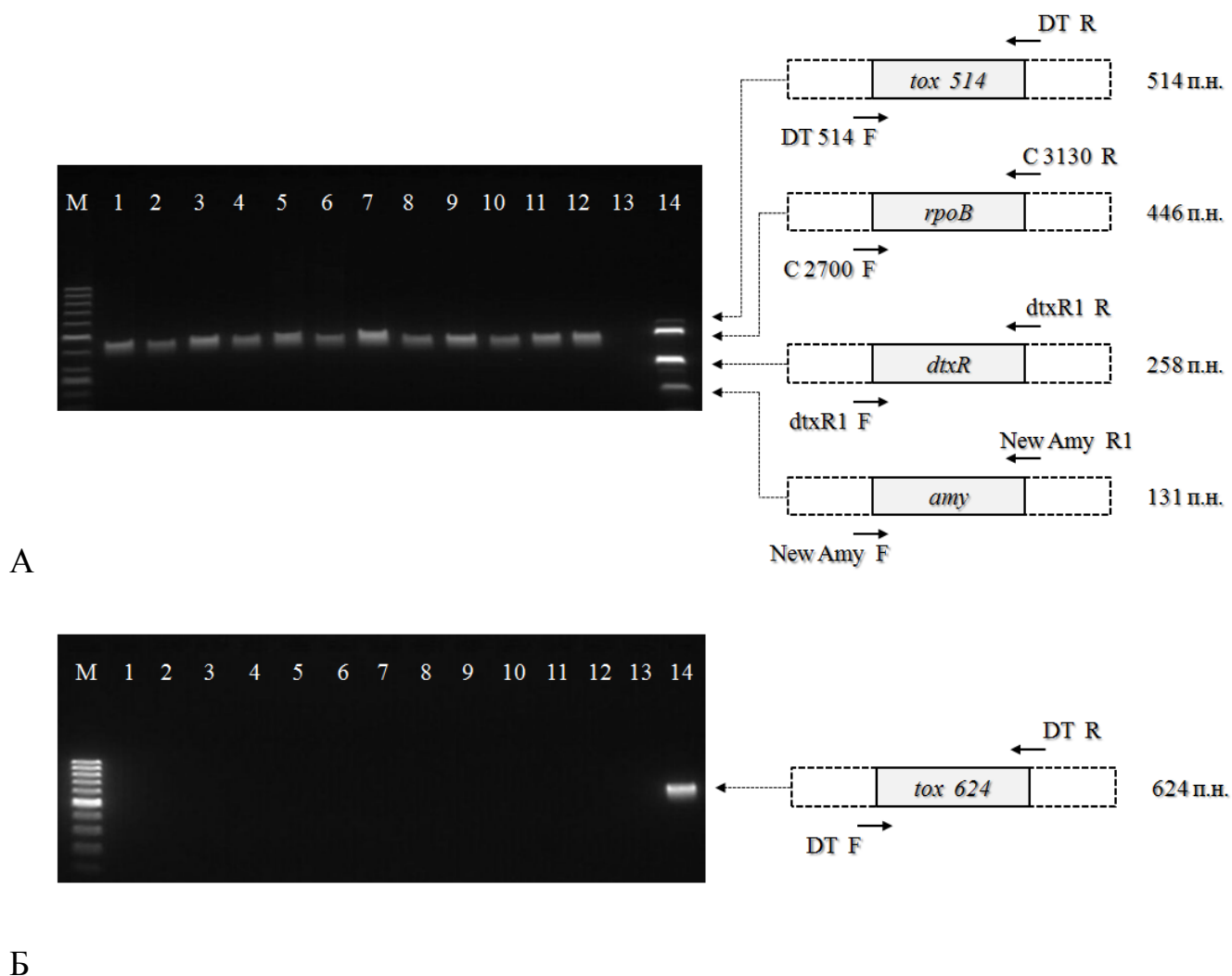


Рисунок 19 – Электрофореграмма продуктов ПЦР в формате мультиплекс, полученных в ходе амплификации в пробирке № 1 (А) и пробирке № 2 (Б): ДНК 12 штаммов представителей рода *Corynebacterium* («расширенный вариант») (пример)

Примечание: М – маркер молекулярных весов ДНК: А - GeneRuler 50 DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific (фрагменты длиной 50 п.н. и 100 п.н. на рисунке не просматриваются), Б - GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific; 1 - 12 – ДНК штаммов *C.amycolatum*, *C.coyleae*, *C.durum*, *C.imitans*, *C.jejikeium*, *C.mucifaciens*, *C.propinquum*, *C.pseudodiphtheriticum*, *C.pseudotuberculosis*, *C.tuberculostearicum*, *C.urealyticum*, *C.xerosis*; 13 – отрицательный контроль (ПЦР-смесь); 14 – положительный контроль (ДНК токсигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis* № 665)

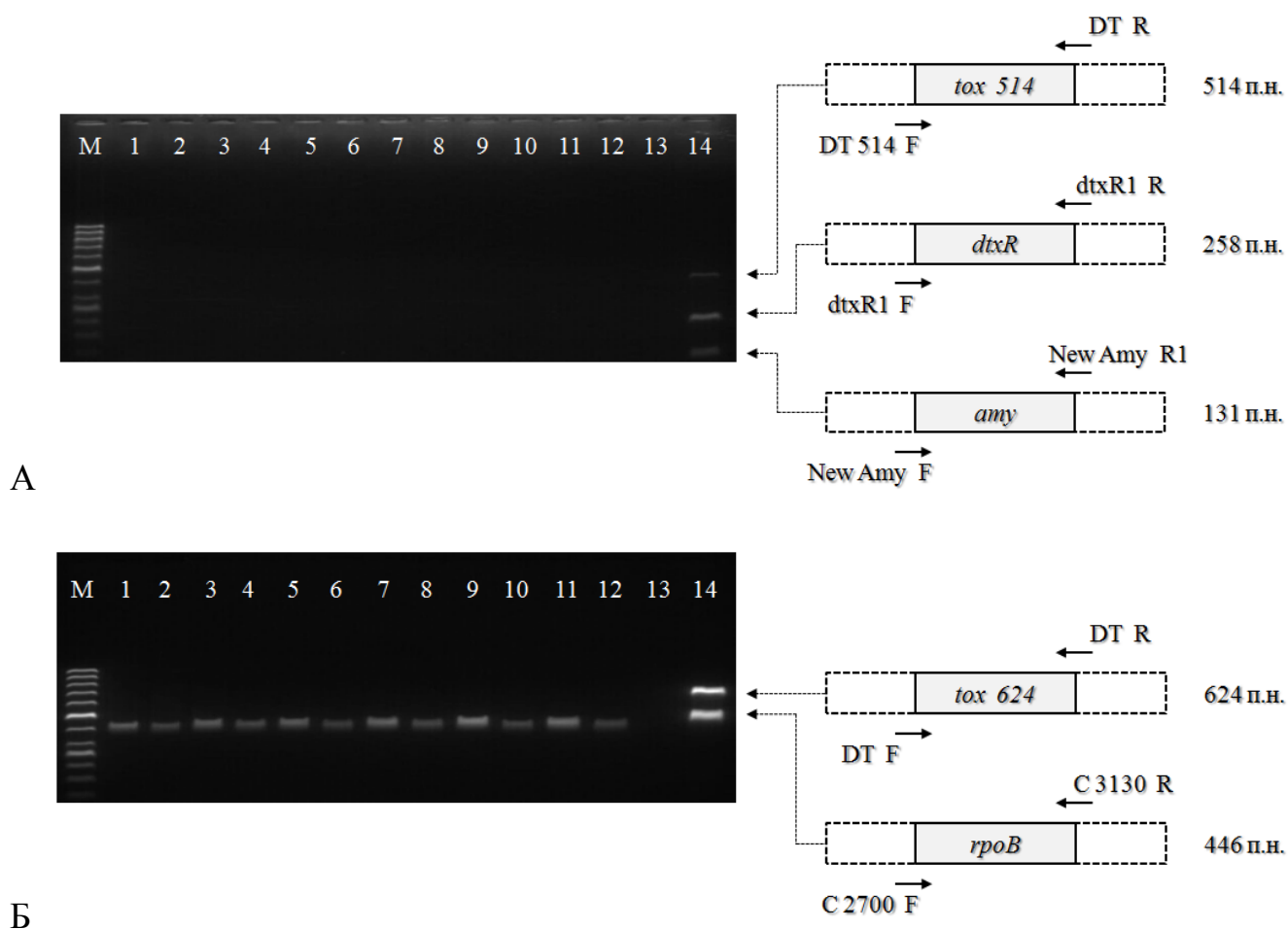


Рисунок 20 – Электрофореграмма продуктов ПЦР в формате мультиплекс, полученных в ходе амплификации при проведении I этапа (А) и II этапа (Б): ДНК 12 штаммов представителей рода *Corynebacterium* («сокращенный вариант») (пример)

Примечание: М – маркер молекулярных весов ДНК GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific (фрагмент длиной 50 п.н. на рисунке не просматривается); 1 - 12 – ДНК штаммов *C.amycolatum*, *C.coyleae*, *C.durum*, *C.imitans*, *C.jejikeium*, *C.mucifaciens*, *C.propinquum*, *C.pseudodiphtheriticum*, *C.pseudotuberculosis*, *C.tuberculostearicum*, *C.urealyticum*, *C.xerosis*; 13 – отрицательный контроль (ПЦР-смесь); 14 – положительный контроль (ДНК токсигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis* № 665)

При тестировании образцов, содержащих ДНК штаммов микроорганизмов других родов, положительные сигналы также отсутствовали (Рисунки 21 А и 21 Б, 22 А и 22 Б).

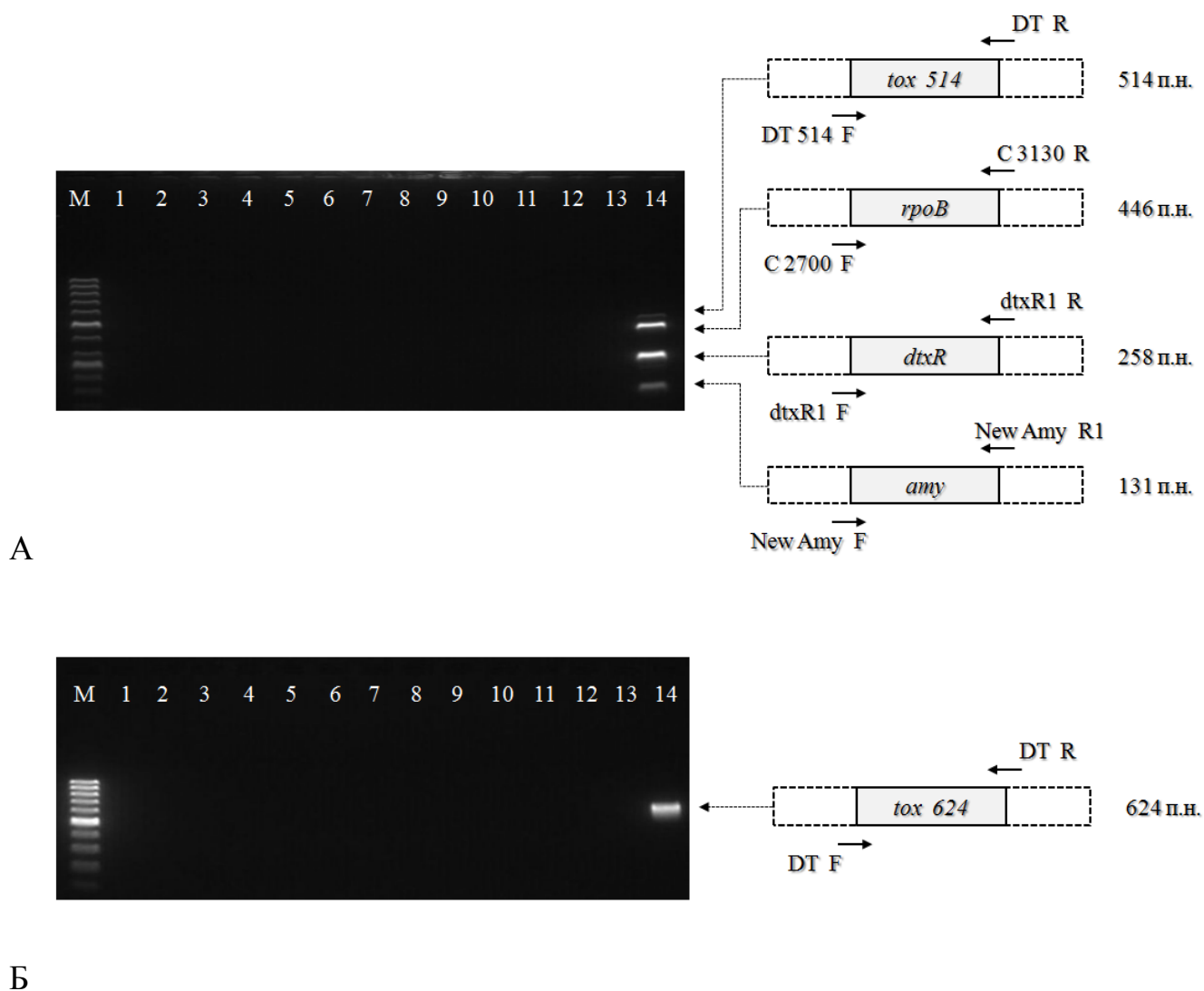


Рисунок 21 – Электрофореграмма продуктов ПЦР в формате мультиплекс, полученных в ходе амплификации в пробирке № 1 (А) и пробирке № 2 (Б): ДНК 12 штаммов других микроорганизмов («расширенный вариант») (пример)

Примечание: М – маркер молекулярных весов ДНК: А - GeneRuler 50 DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific (фрагмент длиной 50 п.н. на рисунке не просматривается), Б - GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific; 1 - 12 – ДНК штаммов *A.viscosus*, *B.pertussis*, *C.albicans*, *H.influenzae*, *K.pneumoniae* subsp. *ozaenae*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*, *S.epidermidis*, *S.hominis*, *S.mitis*, *S.pneumoniae*, *S.pyogenes*; 13 – отрицательный контроль (ПЦР-смесь); 14 – положительный контроль (ДНК токсигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis* № 665)

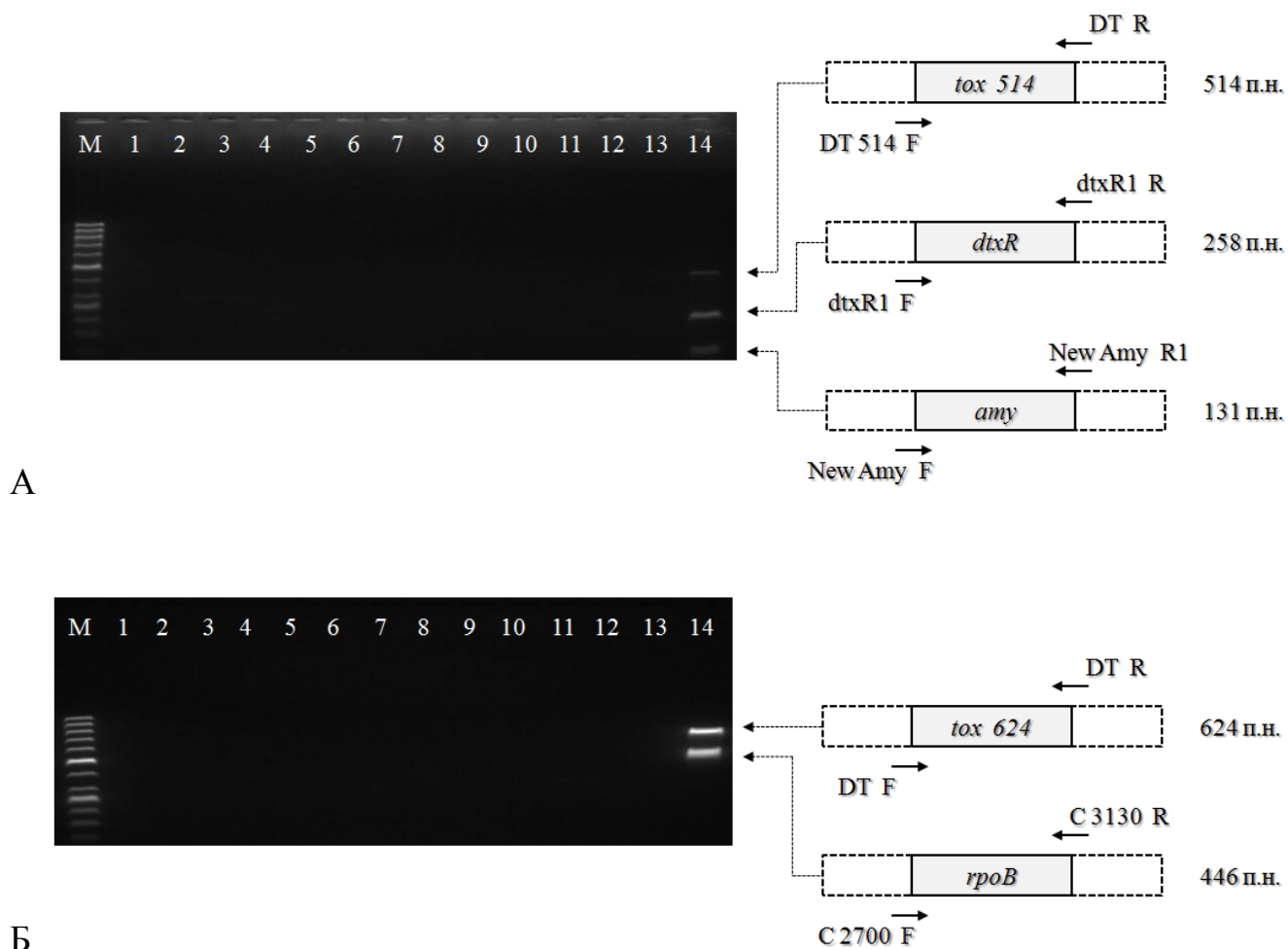


Рисунок 22 – Электрофореграмма продуктов ПЦР в формате мультиплекс, полученных в ходе амплификации при проведении I этапа (А) и II этапа (Б): ДНК 12 штаммов других микроорганизмов («сокращенный вариант») (пример)

Примечание: М – маркер молекулярных весов ДНК: GeneRuler 50 DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific (фрагмент длиной 50 п.н. на рисунке не просматривается); 1 - 12 – ДНК штаммов *A.viscosus*, *B.pertussis*, *C.albicans*, *H.influenzae*, *K.pneumoniae* subsp. *ozaenae*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*, *S.epidermidis*, *S.hominis*, *S.mitis*, *S.pneumoniae*, *S.pyogenes*; 13 – отрицательный контроль (ПЦР-смесь); 14 – положительный контроль (ДНК токсигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis* № 665)

Следовательно, разработанные варианты для выявления и дифференциации ДНК токсигенных и нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* и *C.ulcerans* и НТТН-штаммов *C.diphtheriae* на основе метода ПЦР в формате мультиплекс обладают 100 % аналитической специфичностью.

4.3. Результаты апробации метода генодиагностики на иммитантах клинических образцов

Оценку аналитической чувствительности способа для выявления и дифференциации ДНК токсигенных штаммов *C.diphtheriae* биоваров *gravis* и *mitis* и *C.ulcerans* на основе «сокращенного варианта» ПЦР в формате мультиплекс с постановкой в два этапа проводили по методике, описанной в разделе 3.2. В ходе исследований установлено, что при использовании коммерческого набора «АмплиПрайм[®] РИБО-преп» на этапе экстракции ДНК из изучаемого субстрата (суспензии бактериальных клеток), аналитическая чувствительность разработанного способа составила 5×10^3 ГЭ / мл (Рисунок 23 А и 23 Б). При сопоставлении выше представленных данных с результатами бактериологического исследования истинное значение аналитической чувствительности соответствовало $2,3 \times 10^3$ ГЭ / мл (Таблица 22).

Апробацию разработанного способа на иммитантах клинических образцов осуществляли в модельных экспериментах в лабораторных условиях по схеме, представленной в разделе 3.4. Исследования показали, что аналитическая чувствительность на иммитантах составила 5×10^3 ГЭ / мл (Рисунок 24 А и 24 Б). При сопоставлении полученных в ходе эксперимента данных с результатами бактериологического исследования истинное значение аналитической чувствительности соответствовало $2,3 \times 10^3$ ГЭ / мл (Таблица 23).

Учитывая данные литературы о возможной этиологической роли нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* в развитии ЛОР-патологии [145, 155, 208], разработанный способ также был апробирован на 79 образцах клинического материала, полученного от пациентов с различными формами хронического тонзиллита и патологией полости носа, у которых брали клинический материал двумя тампонами из зева. С первого тампона производили смыв патологического материала, как представлено в разделе «Материалы и методы», и последующее выделение ДНК, а со второго – посев на КА для проведения бактериологического исследования с идентификацией выросших колоний с помощью масс-спектрометрического метода и секвенирования генов *rpoB* и *16SrRNA*.

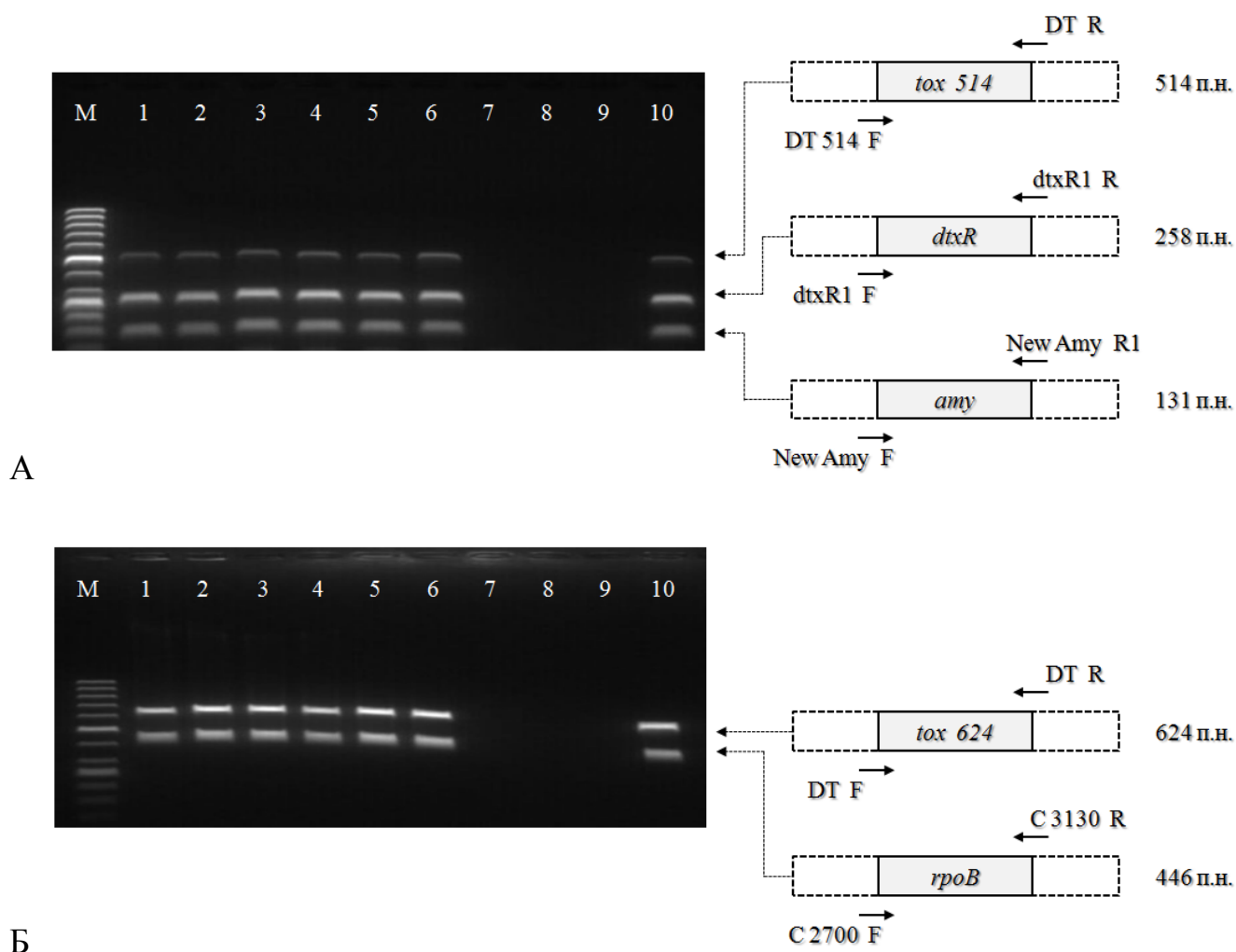


Рисунок 23 – Электрофореграмма продуктов ПЦР в формате мультиплекс, полученных в ходе амплификации при проведении I этапа (А) и II этапа (Б): порог аналитической чувствительности при работе с бактериальной суспензией контрольного штамма *C.diphtheriae* № 665 в различных разведениях («сокращенный вариант») (пример)

Примечание: М – маркер молекулярных весов ДНК GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific (фрагмент длиной 50 п.н. на рисунке не просматривается); 1 – 5×10^8 ГЭ / мл; 2 – 5×10^7 ГЭ / мл; 3 – 5×10^6 ГЭ / мл; 4 – 5×10^5 ГЭ / мл; 5 – 5×10^4 ГЭ / мл; 6 – 5×10^3 ГЭ / мл; 7 – 10^3 ГЭ / мл; 8 – отрицательный контроль экстракции; 9 – отрицательный контроль (ПЦР-смесь); 10 – положительный контроль (ДНК токсигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis* № 665)

Установлено, что с помощью разработанного «сокращенного варианта» ПЦР-диагностики в мультиплексном формате в 47 пробах регистрировались положительные сигналы только по фрагменту гена *rpoB* (446 п.н.), все остальные фрагменты генов отсутствовали, что свидетельствовало о наличии в этих образцах ДНК *Corynebacterium spp.* При параллельных бактериологических, масс-спектрометрических и молекулярно-генетических исследованиях

(секвенирования) были идентифицированы штаммы микроорганизмов, представленные в таблице 3.

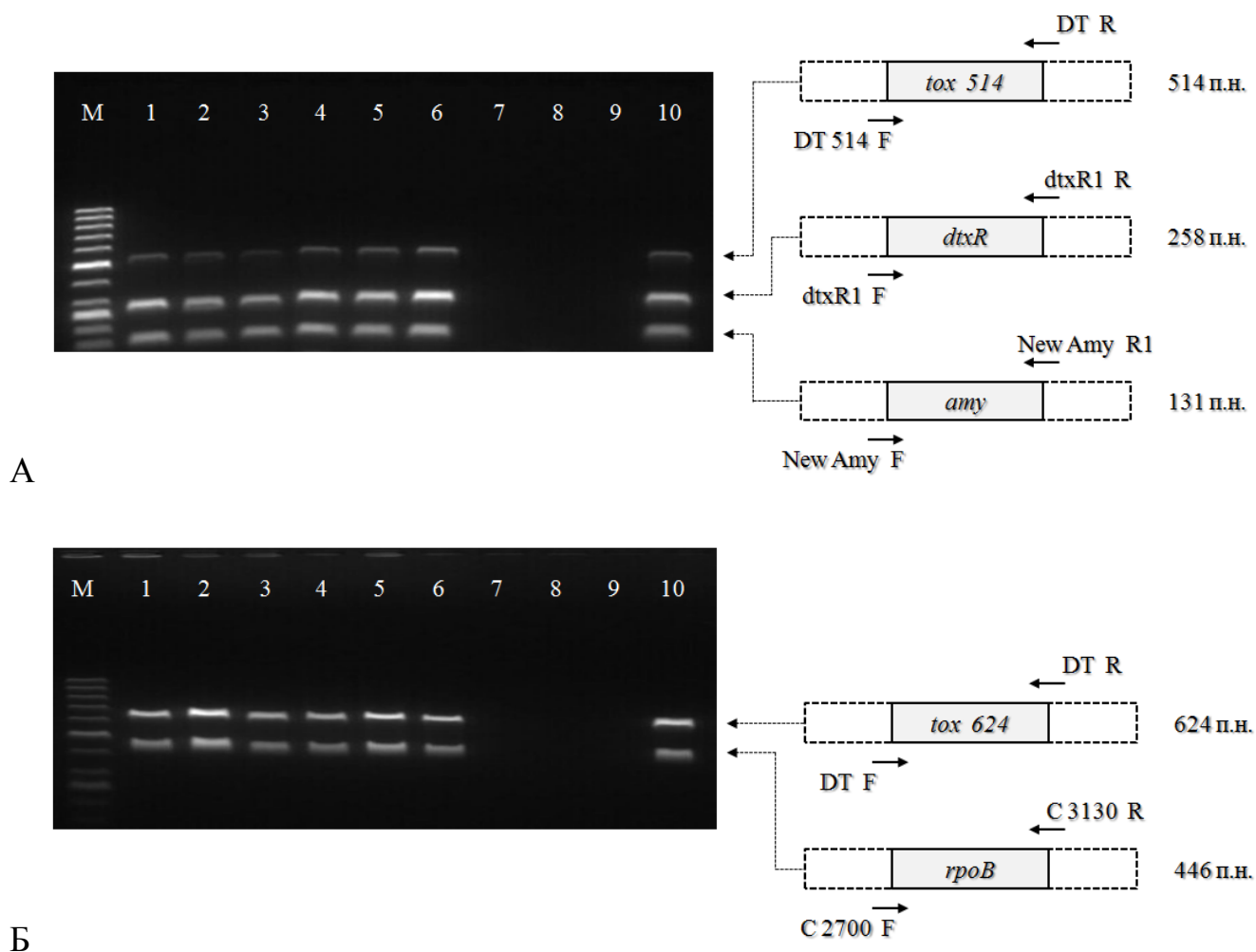


Рисунок 24 – Электрофореграмма продуктов ПЦР в формате мультиплекс, полученных в ходе амплификации при проведении I этапа (А) и II этапа (Б): порог аналитической чувствительности при работе с иммитантами клинических образцов («сокращенный вариант») (пример)

Примечание: М – маркер молекулярных весов ДНК GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific (фрагменты длиной 50 п.н. и 100 п.н. на рисунке не просматриваются); 1 – 5×10^8 ГЭ / мл; 2 – 5×10^7 ГЭ / мл; 3 – 5×10^6 ГЭ / мл; 4 – 5×10^5 ГЭ / мл; 5 – 5×10^4 ГЭ / мл; 6 – 5×10^3 ГЭ / мл; 7 – 10^3 ГЭ / мл; 8 – отрицательный контроль экстракции; 9 – отрицательный контроль (ПЦР-смесь); 10 – положительный контроль (ДНК токсигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis* № 665)

Резюме. Разработан способ идентификации *C.diphtheriae*, *C.ulcerans* и *Corynebacterium spp.* методом ПЦР в формате мультиплекс с одномоментной постановкой в двух пробирках и электрофоретической детекцией продуктов

амплификации. В ходе ПЦР-исследования проводится дифференциация токсигенных и нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* биоваров *gravis* и *mitis*, НТТН-штаммов *C.diphtheriae*, содержащих делецию нуклеотида G в позиции 55 или мобильный генетический IS-1 элемент в гене *tox*, токсигенных и нетоксигенных штаммов *C.ulcerans* и других представителей рода *Corynebacterium* в чистой культуре возбудителя. При этом только НТТН-штаммы *C.diphtheriae*, у которых фенотип Тох- обусловлен наличием мобильного генетического IS-2 элемента в гене *tox*, идентифицируются как токсигенные.

С целью использования в практическом здравоохранении предложен «сокращенный» вариант ПЦР в формате мультиплекс с постановкой в два этапа, позволяющий идентифицировать токсигенные штаммы *C.diphtheriae* биоваров *gravis* и *mitis* и *C.ulcerans*. На I этапе ПЦР-исследования выявляются предположительно токсигенные штаммы *C.ulcerans* и проводится дифференциация нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* двух биоваров от предположительно токсигенных. На II этапе определяются истинно токсигенные штаммы *C.ulcerans* и проводится окончательная дифференциация истинно токсигенных штаммов *C.diphtheriae* двух биоваров (возбудителя дифтерии) от НТТН-штаммов *C.diphtheriae*, содержащих мобильный генетический IS-1 элемент в гене *tox*. При этом НТТН-штаммы коринебактерий, содержащие делецию нуклеотида G в позиции 55 в гене *tox*, уже на I этапе идентифицируются как нетоксигенные, а НТТН-штаммы *C.diphtheriae*, у которых фенотип Тох- обусловлен наличием в гене *tox* мобильного генетического IS-2 элемента, определяются как токсигенные. Также показано, что разработанный способ обладает высокими аналитическими характеристиками: чувствительность на типовом коллекционном штамме *C.diphtheriae* биовара *gravis* № 665 составила $2,3 \times 10^3$ ГЭ / мл, на иммитантах клинических образцов – $2,3 \times 10^3$ ГЭ / мл; определена 100 % специфичность на типовых коллекционных и свежевыделенных штаммах *C.diphtheriae*, штаммах представителей рода *Corynebacterium*, штаммах других микроорганизмов и клинических образцах, полученных от больных с тонзиллярной патологией и патологией полости носа.

Штаммы *C.diphtheriae*, *C.ulcerans* и других представителей рода *Corynebacterium*, выделенные от больных дифтерией, дифтериеподобными заболеваниями и бактерионосителей, а также от больных с различными формами хронического тонзиллита и патологией полости носа, депонированы в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» ФБУН ГНЦ ПМБ: восемнадцать штаммов *C.diphtheriae* (В-7813; В-7815; В-7816; В-7817; В-7970; В-7071; В-7972; В-7073; В-7974; В-7975; В-7976; В-7977; В-7978; В-7979; В-7980; В-7981; В-7991; В-7992), одиннадцать штаммов *C.ulcerans* (В-7818; В-7819; В-7982; В-7983; В-7984; В-7985; В-7986; В-7987; В-7988; В-7989; В-7990), тринадцать штаммов микроорганизмов рода *Corynebacterium* (В-7820; В-7993; В-7994; В-7995; В-7996; В-7997; В-7998; В-7999; В-8000; В-8001; В-8002; В-8003; В-8004). Все изученные штаммы *C.diphtheriae* дополнили лабораторную коллекцию штаммов *C.diphtheriae* и банк ДНК, которые можно использовать в дальнейших научных исследованиях для изучения биологических свойств возбудителя дифтерии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на очевидные успехи многолетней массовой иммунизации населения, актуальность проблемы коклюшной и дифтерийной инфекций сохраняется [6, 8, 9, 20, 68, 69, 73, 75, 97, 98, 113, 129, 130, 179, 196, 221, 229, 242, 247, 248, 252]. Поддержанию эпидемического процесса при этих инфекциях способствует наличие скрытых источников инфекции, когорты восприимчивых лиц, заболеваемость среди привитых, а также бактерионосительство.

В последнее десятилетие разработаны разные варианты молекулярно-генетических методов для идентификации возбудителя коклюша, основанные на выявлении различных мишеней в геноме *B. pertussis*: ПЦР в классическом формате с электрофорезом, ПЦР-РВ и изотермическая амплификация [101, 189, 216, 217, 230]. Вместе с тем использование ПЦР-РВ имеет ряд таких ограничений, как высокая стоимость исследования, необходимость сложного дорогостоящего оборудования и его технического обслуживания, временами возникающие сложности на этапе интерпретации результатов, что требует проведения повторного обследования, особенно при идентификации нескольких видов бордетелл. Поэтому одним из перспективных направлений является разработка тест-систем по выявлению ДНК *B. pertussis*, являющейся наиболее патогенной среди всех бордетелл и вызывающей тяжелые формы заболевания с летальным исходом. Кроме того, такой подход экономически целесообразен для региональных лабораторий с разными системами финансирования.

В отношении развития генодиагностики дифтерийной инфекции большинство предпринятых попыток создания молекулярно-генетических тест-систем, в том числе в форматах ПЦР в классическом варианте, ПЦР-РВ, мультиплекс-ПЦР и изотермической амплификации, в частности с дифференциацией *C. ulcerans* и *C. pseudotuberculosis*, были направлены на определение токсигенных свойств в чистой культуре коринебактерий [144, 215, 227, 228, 233]. Единичные разработки в отношении выявления специфических фрагментов генома *C. diphtheriae* непосредственно в патологическом материале

[134, 135, 191] требуют дальнейшего развития, а предложенные наборы реагентов для ПЦР-исследования представлены только экспериментальными моделями. Поэтому целью исследования стало совершенствование молекулярно-генетических методов лабораторной диагностики дифтерии и коклюша, основанных на технологиях амплификации нуклеиновых кислот.

Ранее в ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора на основе изотермической амплификации был разработан способ для ускоренной лабораторной диагностики коклюша [12, 13, 14, 87], который позволял выявить ДНК *B.pertussis* в течение 9 - 10 часов от начала исследования в клиническом материале. Нами проведена оптимизация этого способа и разработан новый ускоренный способ (патент на изобретение РФ № 2542396 от 21.01.2015 г.), преимущественно отличающийся от предыдущего особенностями пробоподготовки клинического образца, составом реакционной смеси, внедрением процедуры первичного отжига праймеров, возможностями перехода на детекцию с помощью интеркалирующего красителя и, в целом, повышением эффективности выявления ДНК *B.pertussis*. В разработанном нами способе пробоподготовка осуществляется путем простого смыва клинического материала с тампона в физиологический раствор и занимает не более 12 - 15 мин. В ранее предложенном способе пробоподготовка заключалась в проведении нескольких этапов (первичный прогрев проб, обработка лизоцимом и протеиназой К), что в общей сложности занимало до 3 - 4 часов. Выделение ДНК в разработанном способе проводили с помощью коммерческих наборов, основанных на сорбционной технологии. В то время как в ранее предложенном методе, выделение ДНК предлагалось проводить с помощью реагентов, приготовленных в лабораторных условиях. Существенным отличием разработанного нами способа от ранее предложенного является состав реакционной смеси. Кроме того, с целью увеличения эффективности отжига праймеров, в разработанном нами способе применен первичный отжиг праймеров и охлаждение, а также отработана концентрация Bst ДНК-полимеразы в буферном растворе, что, в свою очередь, увеличивает специфичность исследования. Последовательность праймеров,

режим амплификации и детекция методом электрофореза в обоих разработанных способах были одинаковыми.

Следовательно, применение разработанного нами способа позволяет выявлять ДНК *B.pertussis* в клиническом материале в течение 4 - 5 часов с 99,4 % диагностической эффективностью, в то время как проведение исследования с помощью ранее предложенного способа занимало до 9 - 10 часов и позволяло выявлять ДНК возбудителя в 84,9 % случаях.

При дальнейшем совершенствовании разработанного способа выявления ДНК *B.pertussis* в направлении создания диагностического теста «у постели больного» проведена апробация методики с использованием детекции с интеркалирующим красителем на ограниченном количестве проб клинического материала от больных с диагнозом «Коклюш». Анализ результатов амплификации проводили визуально по изменению цвета содержимого пробирки. Применение данной технологии позволяет сократить продолжительность исследования еще на 1 час, что, в общей сложности, будет занимать 3 - 4 часа от начала. Кроме того, преимуществами использования изотермической амплификации является отсутствие дорогостоящего оборудования для ПЦР-РВ, так как для проведения исследования требуются только реактивы и микротермостат, что делает эту технологию доступной для лабораторий первичного звена и с разной системой финансирования.

Разработанный способ был апробирован на большом клиническом материале, полученном от 329 пациентов, госпитализированных в ГБУЗ «ИКБ № 1 ДЗМ». Обследование больных проводилось на разных сроках от начала заболевания, при различной степени тяжести клинического течения и, в ряде случаев, при наличии осложнений. Проведенная оценка достоверности показала, что разработанный способ обладает 99,6 % чувствительностью и 98,7 % специфичностью; прогностическая ценность положительного и отрицательного результата составила 99,6 % и 98,7 %, соответственно; индекс точности (диагностическая эффективность) – 99,4 %; отношение правдоподобия положительного и отрицательного результата – 76,6 и 0,004, соответственно.

Оценка аналитической надежности в 100 % случаев показала сходимость и воспроизводимость методики.

С целью оценки эффективности разработанного способа при обследовании больных коклюшем на разных сроках от начала заболевания, при различных формах клинического течения и на фоне антибиотикотерапии, а также детей возрасте до 1 года, проведено изучение клинического материала, полученного от 262 пациентов, госпитализированных в ГБУЗ «ИКБ № 1 ДЗМ». Исследование показало, что ДНК *B.pertussis* удалось обнаружить у 96,2 % больных с любой формой клинического течения коклюша: у всех пациентов с тяжелой, в 95,8 % случаев – со среднетяжелой и в 95,3 % случаев – с легкой формами заболевания. ДНК возбудителя коклюша обнаружена в 92,3 % - 98,6 % случаях в пробах, полученных от больных на разных сроках от начала заболевания – на 1, 2, 3, 4, 5-й неделях болезни, а также в высоком проценте случаев (96,6 % - 95,3 %) независимо от антибиотикотерапии.

Дети до 1 года являются основной возрастной группой, подлежащей госпитализации при подозрении на коклюш и в которой наиболее высокий риск развития осложнений и тяжелых форм клинического течения, приводящих к смерти. Кроме того, взятие клинического материала у детей раннего возраста представляет определенные трудности в связи с хаотичным вскармливанием (практически отсутствует интервал в 3 - 4 часа между кормлениями) и техникой забора, что приводит к потере биоматериала и снижению эффективности исследования. Поэтому представлялось важным оценить эффективность применения разработанного диагностического теста при обследовании этого контингента. Анализ показал, что эффективность обнаружения ДНК *B.pertussis* у этой категории больных с помощью разработанного метода LAMP составила 97,6 %, причем у самой маленькой возрастной категории (0 - 3 месяцев) удалось достичь 98,6 %. Результаты подобных исследований, проведенных зарубежными авторами на клиническом материале от больных коклюшем, отсутствуют [143, 174, 209, 210].

Нами проведена апробация разработанного способа генодиагностики с

целью выявления больных на разных стадиях течения инфекционного процесса и бактерионосителей в очагах коклюшной инфекции. При обследовании 40 женщин, госпитализированных в ГБУЗ «ИКБ № 1 ДЗМ» по уходу за больным коклюшем ребенком (семейные очаги), у 19 (47,5 %) женщин диагностированы стертые и легкие формы заболевания, которые были подтверждены лабораторно в 100 % случаев: ДНК *B.pertussis* выявлена у 13 (68,4 %) пациентов, а сероконверсия антител – у 18 (94,7 %). Наиболее важным представляется то, что с помощью разработанного метода удалось выявить 27,5 % бактерионосителей, у которых в зависимости от длительности контакта с источником инфекции в 72,7 % случаев выявлены специфические противокклюшные антитела, и в 27,3 % случаев они отсутствовали. Полученные данные свидетельствуют о широкой циркуляции *B.pertussis* среди населения и высоком уровне бактерионосительства, что соответствует данным зарубежных и отечественных исследователей о распространенности бактерионосительства при коклюше [179, 196, 247].

Показана возможность применения методов генодиагностики, в том числе разработанного, для обследования контактных в эпидемических очагах, а также в организованных коллективах с длительно кашляющими лицами с целью выявления в максимально сжатые сроки больных коклюшем и причин длительного кашля среди детей и взрослых. С этой целью изучен клинический материал от 430 лиц из восьми образовательных учреждений г. Москвы и Московской области (2012 - 2015 гг.) и обнаружено 33 ДНК-положительных образца. В трех очагах коклюшной инфекции выявлено 15 (17,9 %) ДНК-положительных образцов, из которых три пробы биологического материала получены от людей, у которых наблюдались клинические проявления в виде кашля. В пяти организованных коллективах с длительно кашляющими детьми обнаружено 18 (5,2 %) ДНК-положительных образцов, из которых две исследуемые пробы получены от людей с клиническими проявлениями в виде кашля. Это свидетельствует о том, что в данном случае причиной кашля является возбудитель коклюша, а в других – можно предполагать наличие бактерионосительства или перенесенное ранее заболевание в легкой или стертой

форме. При этом в двух коллективах при обследовании длительно кашляющих детей ДНК-положительные образцы не были обнаружены, что может свидетельствовать о наличии в этих очагах респираторных инфекций другой этиологии. Интересным также является и следующий факт: при обследовании организованных коллективов в общеобразовательных учреждениях ДНК-положительные образцы выявлялись не только у детей (54,5 %), но и у взрослых (45,5 %). Причем среди сотрудников образовательных учреждений в 33,3 % случаев подобные находки регистрировали у педагогических работников, которые, по причине своей профессиональной деятельности, находились в более тесном контакте с детьми. В ходе исследования проб клинического материала с помощью разработанного способа на основе метода LAMP ДНК возбудителя коклюша была обнаружена у 33 лиц, а с использованием коммерческой тест-системы – у 27. При этом применение разработанного способа позволило выявить ДНК *B.pertussis* во всех пяти образцах исследуемого материала, полученных от людей с клиническими проявлениями, в то время как при использовании коммерческой тест-системы только в трех из этих пяти проб. Среди контактных лиц без клинических проявлений с помощью разработанного метода обнаружено 28 ДНК-положительных образцов. Тестирование этих же проб с применением коммерческой тест-системы дало иные результаты: в трех образцах клинического материала характерный флуоресцентный сигнал по каналам JOE / Yellow и ROX / Orange не регистрировался, а в одном образце была обнаружена ДНК микроорганизма рода *Bordetella spp.* Выявленные расхождения между результатами, полученными при использовании диагностических тестов на основе метода LAMP и метода ПЦР-РВ, можно объяснить тем, что LAMP-технология обладает более высокой чувствительностью за счет использования трех пар специфических праймеров на один фрагмент генома возбудителя коклюша, кодирующего ген КТ. В тоже время в одной пробе при ее исследовании с применением разработанного метода ДНК *B.pertussis* не была обнаружена, а при использовании коммерческой тест-системы – выявлена ДНК микроорганизма рода *Bordetella spp.*, что может быть обусловлено наличием в одном очаге разных

видов бордетелл.

Таким образом, разработанный способ генодиагностики коклюшной инфекции позволяет выявить ДНК *B.pertussis* в течение 4 - 5 часов от начала исследования в клиническом материале. Его применение в практическом здравоохранении приведет к быстрому лабораторному подтверждению диагноза «Коклюш» независимо от сроков заболевания и формы клинического течения, что будет способствовать назначению своевременной и адекватной терапии; значительно повысит возможности обследования детей в возрасте до 1 года и взрослых со стертой клинической картиной заболевания, в частности на фоне антибиотикотерапии. Проведенные исследования подтвердили целесообразность и эффективность применения генодиагностики при обследовании не только кашляющих, но и контактных в очагах коклюшной инфекции в организованных коллективах, а в семейных очагах – в совокупности с серодиагностикой.

Учитывая перспективы использования изотермической амплификации для диагностики возбудителей инфекционных заболеваний и на основе опубликованных наработок [209, 210, 213], нами разработан ускоренный способ генодиагностики, основанный на этой технологии и позволяющий выявить ДНК возбудителя дифтерии в клиническом материале в течение 4 - 4,5 часов. На способ лабораторной диагностики дифтерийной инфекции получен патент на изобретение РФ № 2623149 от 22.06.2017 г. В отличие от ранее опубликованной работы [213], нам удалось сократить число используемых праймеров до трех вместо пяти и отказаться от применения готовых ПЦР-наборов. Кроме того, в упомянутой выше работе предложенный метод апробирован только на выделенных в чистой культуре штаммах *C.diphtheriae*.

Апробация разработанного нами способа проведена на типовых коллекционных и свежевыделенных штаммах *C.diphtheriae*, как токсигенных и нетоксигенных двух биоваров, так и на НТТН-штаммах с разными дефектами гена ДТ, а также на иммитантах клинических образцов и клиническом материале, полученном от больных с хроническим тонзиллитом и патологией полости носа. Установлено, что разработанный способ был эффективен в 100 % случаях при

выявлении ДНК токсигенных *C.diphtheriae*. При этом НТТН-штаммы *C.diphtheriae*, содержащие мобильный генетический IS-2 элемент в гене *tox*, идентифицировались как нетоксигенные, а НТТН-штаммы, у которых фенотип Тох- обусловлен делецией нуклеотида G в 55 позиции или наличием мобильного генетического IS-1 элемента в гене *tox*, идентифицировались как токсигенные. Аналитическая чувствительность составила $4,5 \times 10^2$ ГЭ / мл, на иммитантах клинических образцов – $2,3 \times 10^3$ ГЭ / мл. Аналитическая специфичность на 79 штаммах 21 вида представителей рода *Corynebacterium* и 168 штаммах 17 видов микроорганизмов других родов составила 100 %.

Начиная с 1990-х годов, в зарубежной литературе появились сообщения о выделении *C.ulcerans* от пациентов с ларингитами тяжелого течения при наличии налетов псевдомембранозного характера [176, 182, 223]. Также сохраняется циркуляция НТТН-штаммов *C.diphtheriae* среди людей [11, 39, 124], а вопрос об их эпидемиологическом значении до сих пор остается открытым. Кроме этого, в последние годы возрос интерес и к нетоксигенным *C.diphtheriae*, с выделением которых на данный момент связывают развитие тонзиллитов, фарингитов, эндокардитов, артритов, абсцессов и остеомиелитов. В связи с чем, нами разработан способ генодиагностики дифтерийной инфекции для одновременного выявления ДНК токсигенных и нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* и *C.ulcerans* и дифференциации НТТН-штаммов *C.diphtheriae* на основе метода ПЦР в формате мультиплекс с электрофоретической детекцией продуктов амплификации.

Первоначально был разработан «расширенный вариант» ПЦР в формате мультиплекс с одномоментной постановкой в двух пробирках, который позволяет дифференцировать ДНК токсигенных и нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* двух биоваров, НТТН-штаммов, содержащих делецию или мобильный генетический IS-1 элемент в гене *tox*, токсигенных и нетоксигенных штаммов *C.ulcerans* и штаммов других представителей рода *Corynebacterium*. Применение этого способа возможно для дифференциации исследуемых выделенных штаммов

коринебактерий, и он может быть использован в рамках осуществления мониторинга за возбудителем в Референс-центре или региональных центрах в системе эпиднадзора за дифтерийной инфекцией.

С целью использования в практическом здравоохранении для исследования биологического материала непосредственно с тампона от больного с подозрением на дифтерию или дифтериеподобное заболевание нами предложен «сокращенный вариант» ПЦР в формате мультиплекс с постановкой в два этапа, где на I этапе выявляются предположительно токсигенные штаммы *C.ulcerans* и дифференцируются нетоксигенные штаммы *C.diphtheriae* двух биоваров, а на II этапе – определяются истинно токсигенные штаммы *C.ulcerans* и *C.diphtheriae* двух биоваров (возбудителя дифтерии) и НТТН-штаммы *C.diphtheriae*, содержащие мобильный генетический IS-1 элемент в гене *tox*. Следует отметить тот факт, что обязательному изучению во II этапе подлежат только те ДНК-пробы, которые оказались положительными по наличию фрагмента гена *tox* размером 514 п.н. на I этапе ПЦР-исследования.

Ни один из ранее предложенных мультиплексных форматов [215, 233], посредством которых выявляли и дифференцировали токсигенные и нетоксигенные *C.diphtheriae*, *C.ulcerans* и *C.pseudotuberculosis*, не позволял идентифицировать биовар возбудителя дифтерии и НТТН-штаммы *C.diphtheriae*. Разработанный нами способ отличается от ранее предложенного варианта [12, 15, 88, 141] увеличенным количеством используемых ДНК-мишеней, что, в свою очередь, дает возможность идентифицировать не только возбудителя дифтерии, но и возбудителей дифтериеподобных заболеваний.

Разработанные варианты на основе метода ПЦР в формате мультиплекс апробированы на типовых коллекционных и свежевыделенных штаммах *C.diphtheriae* и показана их эффективность в 100 % случаев при выявлении ДНК токсигенных и нетоксигенных *C.diphtheriae* двух биоваров. НТТН-штаммы *C.diphtheriae*, содержащие в гене *tox* делецию или мобильный генетический IS-1 элемент, идентифицировались как нетоксигенные, а НТТН-штаммы коринебактерий, у которых фенотип Тох- обусловлен наличием мобильного

генетического IS-2 элемента в гене *tox*, – как токсигенные. Аналитическая чувствительность способа составила $2,3 \times 10^3$ ГЭ / мл. Аналитическая специфичность на 67 штаммах 20 видов представителей рода *Corynebacterium* и 168 штаммах 17 видов микроорганизмов других родов показала, что положительные сигналы регистрировали только по фрагменту гена *rpoB* (446 п.н.) для штаммов представителей рода *Corynebacterium*, и положительные сигналы отсутствовали у микроорганизмов других родов, что свидетельствует о 100 % аналитической специфичности. Учитывая, что лабораторная диагностика дифтерийной инфекции в нашей стране базируется только на бактериологических исследованиях, и основываясь на разработанных методах генодиагностики, нами предлагается алгоритм проведения лабораторного исследования на дифтерийную инфекцию с диагностической (Рисунок 25) и профилактической (Рисунок 26) целями.

Так, с диагностической целью предлагается проведение параллельного бактериологического и молекулярно-генетического исследования. Отказ от бактериологии с диагностической целью является нецелесообразным, так как эпидемиологическая значимость НТТН-штаммов *C.diphtheriae* до конца не определена [11, 77, 78, 200, 201], существуют различные механизмы отсутствия экспрессии гена ДТ у этих штаммов [47, 77, 78, 124, 201, 245], выявлен различный уровень их циркуляции в разные периоды эпидемического процесса дифтерийной инфекции с увеличением числа НТТН-штаммов в период спада эпидемии [11, 39, 62, 63, 66, 77, 124, 197, 200, 201], а также их неоднородность по принадлежности к сиквенс-типам, согласно которой некоторые из них близкородственны с токсигенными штаммами [124]. В бактериологическом исследовании все НТТН-штаммы *C.diphtheriae* будут нетоксигенными. С помощью разработанных методов LAMP и мультиплекс-ПЦР в «сокращенном» формате можно выявлять все токсигенные *C.diphtheriae* двух биоваров, то есть идентифицировать возбудителя дифтерийной инфекции. Но НТТН-штаммы, содержащие делецию или мобильный генетический IS-1 элемент в гене *tox*, в методе LAMP и НТТН-штаммы, содержащие мобильный генетический IS-2 элемент в гене *tox*,

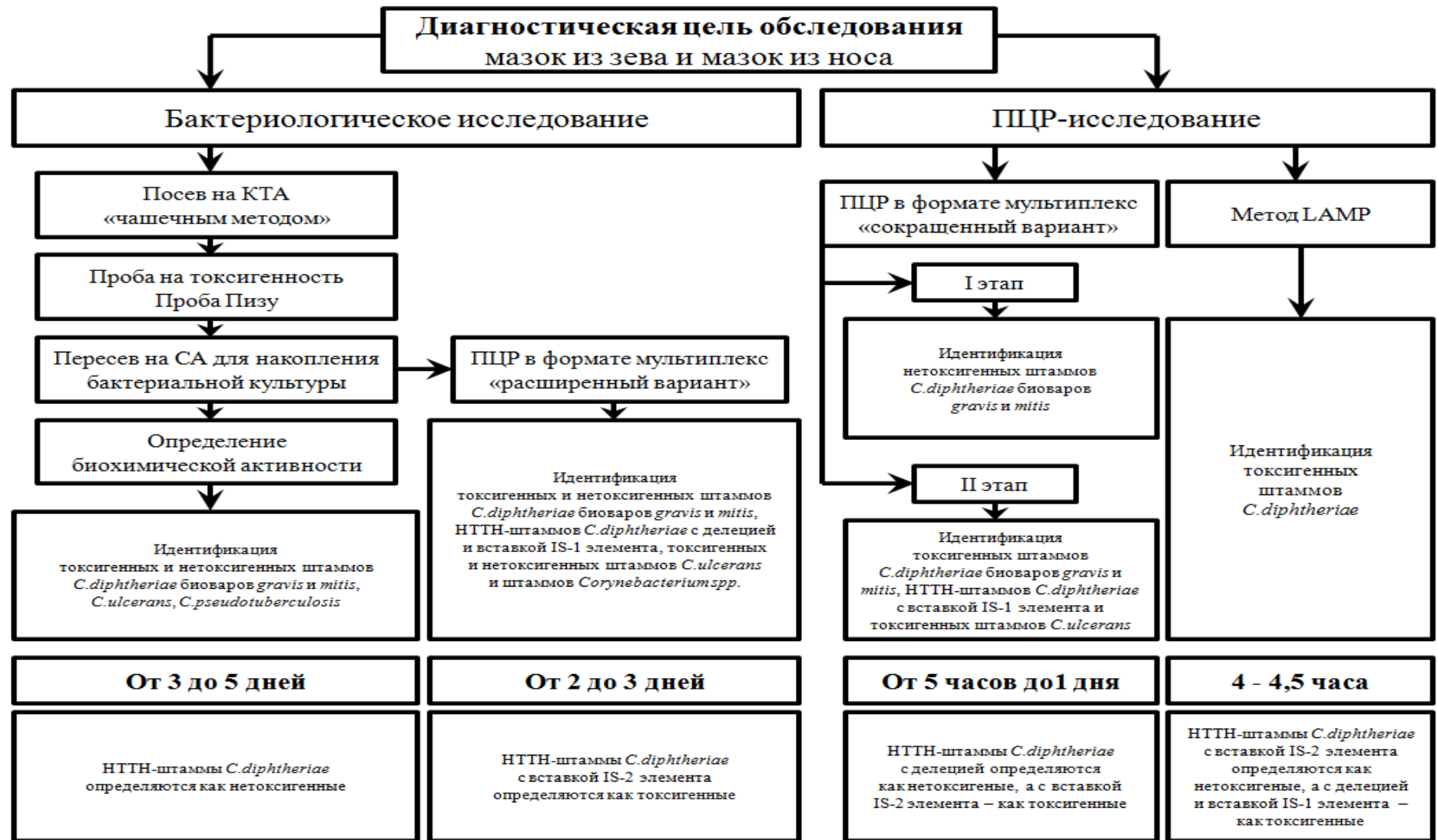


Рисунок 25 – Алгоритм проведения исследования на дифтерийную инфекцию с диагностической целью

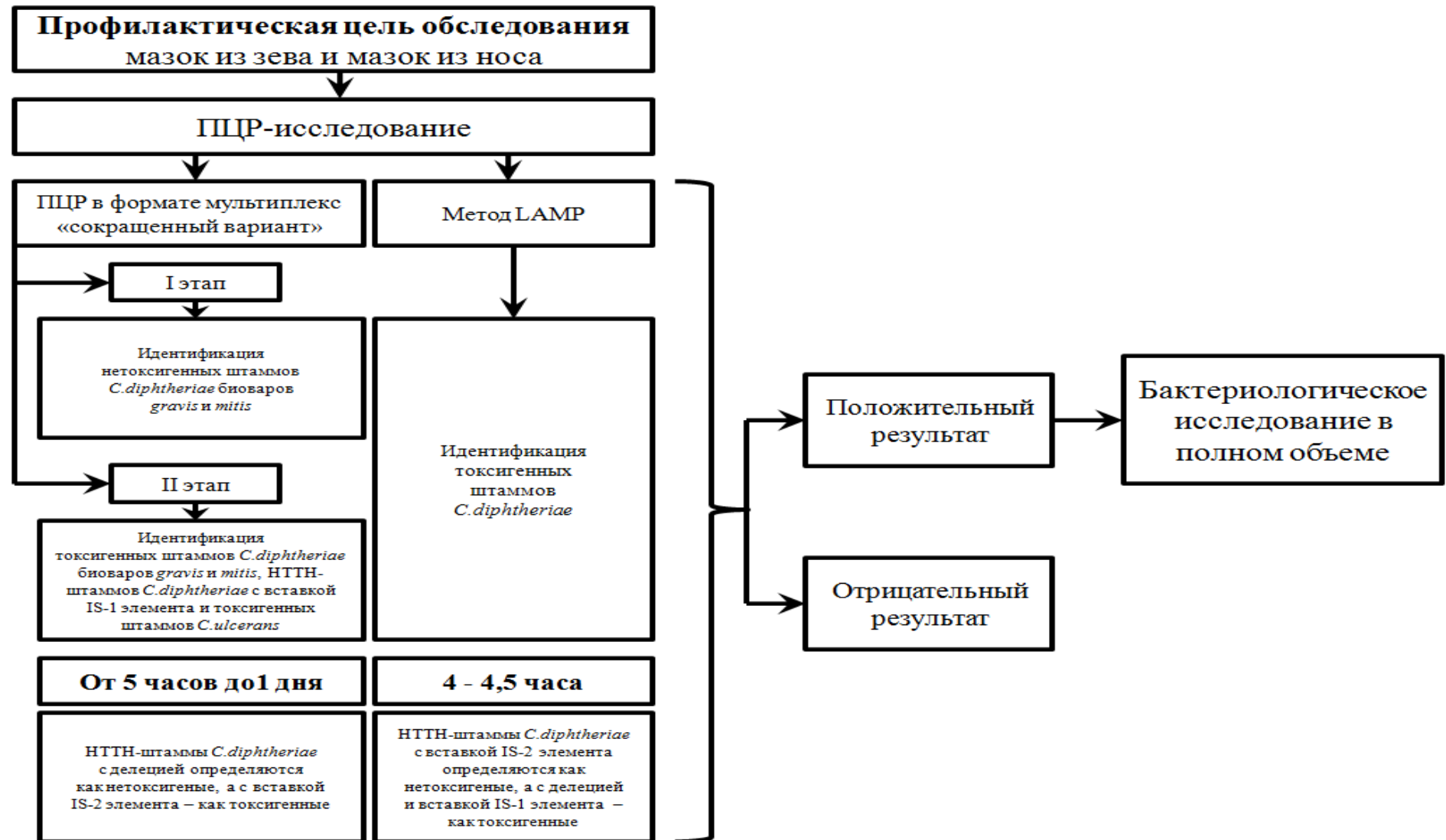


Рисунок 26 – Алгоритм исследования на дифтерийную инфекцию с профилактической целью

в мультиплекс-ПЦР будут регистрироваться как токсигенные. С профилактической целью предлагается проведение молекулярно-генетического исследования (Рисунок 26). При наличии отрицательного результата генодиагностики уже в течение одного рабочего дня можно выдать ответ обследуемому, что, несомненно, является важным при получении результатов исследования для госпитализации, направления в организованные коллективы открытого и закрытого типа. При наличии положительного результата необходимо проведение бактериологического исследования в полном объеме.

Таким образом, разработанные ускоренные методы генодиагностики позволят с новых позиций подойти к совершенствованию лабораторной диагностики коклюшной и дифтерийной инфекций и расширят возможности практических лабораторий по выявлению возбудителей этих заболеваний.

ВЫВОДЫ

1. Разработан метод генодиагностики на основе LAMP-технологии, который позволяет выявить ДНК *B.pertussis* непосредственно в клиническом материале от больного в течение 4 - 5 часов от начала исследования. Метод показал высокую эффективность (диагностическая чувствительность - 99,6 %, диагностическая специфичность - 98,7 %, индекс точности (диагностическая эффективность) - 99,4 %) при обследовании пациентов с различными формами клинического течения, на разных сроках болезни и на фоне антибиотикотерапии, особенно у детей в возрасте до 1 года.
2. Разработанный метод диагностики коклюша позволил обнаружить ДНК *B.pertussis* у 17,9 % обследованных контактных лиц в трех эпидемических очагах и у 5,2 % человек в организованных коллективах с длительно кашляющими детьми, что свидетельствует о возможности его использования для выявления больных на разных стадиях течения инфекционного процесса и бактерионосителей в организованных детских коллективах с установленным и не установленным источником инфекции.
3. Среди контактных взрослых в семейных очагах выявлено 47,5 % больных стертыми и легкими формами коклюша и в 27,5 % случаях обнаружено бактерионосительство *B.pertussis*, которое в зависимости от длительности контакта с источником инфекции в 72,7 % случаев сопровождалось наличием специфических противокклюшных антител разных классов, а в 27,3 % случаев их отсутствием.
4. Разработан способ генодиагностики дифтерийной инфекции на основе LAMP и определены его аналитические характеристики: чувствительность составила $2,3 \times 10^3$ ГЭ / мл, специфичность – 100 %.
5. Разработан «расширенный вариант» ПЦР в формате мультиплекс, позволяющий одномоментно дифференцировать ДНК токсигенных и нетоксигенных *C.diphtheriae* двух биоваров, НТГН-штаммов с делецией или вставкой IS-1 в гене *tox*, токсигенных и нетоксигенных *C.ulcerans* и других

представителей рода *Corynebacterium* в чистой культуре возбудителя, который можно использовать при мониторинге возбудителя в системе эпиднадзора за дифтерийной инфекцией.

6. С целью использования в практическом здравоохранении предложен «сокращенный вариант» ПЦР в формате мультиплекс с постановкой в два этапа, где на I этапе выявляются предположительно токсигенные *C.ulcerans* и дифференцируются нетоксигенные *C.diphtheriae* двух биоваров, а на II этапе – определяются истинно токсигенные *C.ulcerans* и *C.diphtheriae* двух биоваров (возбудителя дифтерии) и НТТН-штаммы *C.diphtheriae*, содержащие мобильный генетический IS-1 элемент в гене *tox*.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При обследовании контактных лиц в очагах коклюшной инфекции с установленным источником инфекции, а также длительно кашляющих лиц необходимо применение молекулярно-генетических методов диагностики с целью раннего выявления больных коклюшем, а также установления причин длительного кашля как среди детей, так и взрослых.
2. При обследовании семейных очагов коклюшной инфекции целесообразно использование молекулярно-генетической диагностики в совокупности с серодиагностикой с целью установления источника инфекции, в том числе бактерионосителей.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Необходимы дальнейшие исследования по изучению распространенности возбудителя коклюша с целью установления механизмов и длительности бактерионосительства при коклюшной инфекции, а также методов лабораторной диагностики, используемых при нем.
2. Обоснована целесообразность подготовки методических рекомендаций по применению молекулярно-генетических методов в лабораторной диагностике дифтерийной инфекции.
3. Необходимы дальнейшие исследования по оптимизации всех разработанных способов на этапе детекции с целью исключения возможности контаминации продуктами амплификации.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВОЗ	— Всемирная организация здравоохранения
ГЭ	— геном-эквивалент
ДНК	— дезоксирибонуклеиновая кислота
ДТ	— дифтерийный токсин
ИФА	— иммуноферментный анализ
КА	— кровяной агар
ККРС	— кровь крупного рогатого скота
КОЕ	— колониеобразующая единица
КТ	— коклюшный токсин
КТА	— кровяно-теллуритовый агар
м.к.	— микробная клетка
МР, МУ, МУК	— методические рекомендации, методические указания
НТТН	— нетоксигенные токснесущие штаммы
п.н.	— пара нуклеотидов
ПЦР	— полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ	— ПЦР в режиме реального времени
РА	— реакция агглютинации
РКОА	— реакция коагглютинации
РНАт	— реакция нейтрализации антител
РНГА	— реакция непрямой гемагглютинации
РНИФ	— реакция непрямой иммунофлюоресценции
РПГА	— реакция пассивной гемагглютинации
РСК	— реакция связывания комплемента
СКРС	— сыворотка крупного рогатого скота
СП	— санитарно-эпидемиологические правила
ФГА	— филаментозный гемагглютинин
<i>16SrRNA</i>	— ген, кодирующий рибосомальную РНК
<i>amy</i>	— ген, кодирующий фермент амилазу
CDC	— Centers for Disease Control and Prevention, Центры по контролю и профилактике заболеваний
<i>dtxR</i>	— ген, кодирующий DtxR белок
EMBL/GenBank	— European molecular biology laboratory, база данных генотипов
Ig	— иммуноглобулин
IS	— инсерционная последовательность
LAMP	— loop-mediated isothermal amplification, петлеобразующая изотермическая амплификация
MALDI-TOF MS	— matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией / ионизацией
NCBI	— National Center for Biotechnology Information, национальный центр биотехнологической информации
<i>rpoB</i>	— ген, кодирующий β -субъединицу РНК-полимеразы
<i>tox</i>	— ген, кодирующий дифтерийный токсин

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеева, Е.А. Современные подходы к комплексным лабораторным исследованиям на дифтерию / Е.А. Алексеева, Г.Я. Ценева, Л.А. Липатова, Г.И. Беспалова, Л.А. Краева // Инфекция и иммунитет. - 2012. - Т. 2, № 4. - С. 729-734.
2. Амфитеатрова, Н.Ф. Разработка непрямого иммунофлюоресцентного метода для выявления возбудителя коклюша / Н.Ф. Амфитеатрова, А.Н. Савинова, Н.Н. Амерханова. - Казань, 1989. - 11 с. - Деп. в ВИНТИ Рос. акад. наук 19.01.90, № 399-B90.
3. Амфитеатрова, Н.Ф. Применение непрямого иммунофлюоресцентного метода для выявления *B.pertussis* при диагностике коклюша / Н.Ф. Амфитеатрова, А.Н. Савинова, Н.Н. Амерханова. - Казань, 1990. - 14 с. - Деп. в ВИНТИ Рос. акад. наук 10.05.90, № 1942-B90.
4. Бабаченко, И.В. Особенности эпидемиологии и клиники коклюша в г. Санкт-Петербурге / И.В. Бабаченко, В.Н. Тимченко, А.С. Мартынкин // Здравоохранение Российской Федерации. - 2002. - № 4. - С. 31-33.
5. Бабаченко, И.В. Клинико-лабораторные особенности коклюшной инфекции у детей в современных условиях: дис. ... д-ра мед. наук: 14.00.10, 03.00.07 / Бабаченко Ирина Викторовна. - СПб., 2007. - 332 с.
6. Бабаченко, И.В. Коклюш у детей: монография / И.В. Бабаченко, С.М. Харит, Н.Н. Курова, Г.Я. Ценева. - М.: Комментарий, 2014. - 176 с.
7. Басов, А.А. Особенности распространения коклюша в организованном коллективе с высоким уровнем привитости против этой инфекции / А.А. Басов, О.В. Цвиркун, А.Г. Герасимова, О.Ю. Борисова, Н.В. Россошанская, В.Н. Бабенко // Жизнь без опасностей. Здоровье. Профилактика. Долголетие. - 2013. - Т. 8, № 4. - С. 60-64.
8. Басов, А.А. Эпидемический процесс коклюша на современном этапе: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.02.02 / Басов Артем Александрович. - М., 2016. - 24 с.

9. Борисов, А.С. Коклюш и паракоклюш в современной практике участкового педиатра / А.С. Борисов, Е.С. Цуканова, О.В. Гурович, Е.В. Пухова, Н.А. Степанищева, Ю.В. Мешкова, Г.Г. Волосовец, В.С. Кузнецова, Е.А. Усачева // Вестник научных конференций. - 2017. - № 1-1 (17). - С. 34-36.
10. Борисова, И.Э. Антигенный дрейф коклюшного микроба / И.Э. Борисова, Т.С. Селезнева // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2008. - № 1(38). - С. 39-44.
11. Борисова, О.Ю. Патогенные и молекулярно-генетические свойства штаммов *C.diphtheriae*, циркулирующих на территории России в течение 1994 - 1998 гг.: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.00.07 / Борисова Ольга Юрьевна. - М., 1999. - 29 с.
12. Борисова, О. Ю. Молекулярно-генетические особенности структуры генов патогенности возбудителей коклюша и дифтерии; совершенствование лабораторной диагностики при этих инфекциях: дис. ... д-ра мед. наук: 03.00.07 / Борисова Ольга Юрьевна. - М., 2009. - 293 с.
13. Борисова, О.Ю. Ускоренный молекулярно-генетический метод выявления возбудителя коклюша / О.Ю. Борисова, Н.Т. Гадуа, М.С. Петрова, О.П. Попова, С.Ю. Комбарова, И.К. Мазурова, В.А. Алешкин // Медицинский альманах. - 2009. - № 2. - С. 51-53.
14. Борисова, О.Ю. Прямой ускоренный метод выявления возбудителя коклюша / О.Ю. Борисова, М.С. Петрова, Н.Т. Гадуа, В.Г. Скачкова, В.С. Савинкова, О.П. Попова, И.К. Мазурова, А.В. Алешкин // Клиническая лабораторная диагностика. - 2010. - № 5. - С. 53-55.
15. Борисова, О.Ю. Генотипические различия между штаммами *Corynebacterium diphtheriae* биоваров *gravis* и *mitis* / О.Ю. Борисова, Н.В. Воложанцев, В.Г. Мельников, И.К. Мазурова, С.Ю. Комбарова, В.А. Алешкин // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2013. - № 3. - С. 24-31.
16. Борисова, О.Ю. К вопросу о применении коммерческих транспортных сред для взятия патологического материала при обследовании на дифтерию / О.Ю. Борисова, И.А. Чагина, Н.Т. Гадуа // Медицинский алфавит. - 2014. - Т. 3, №

15. - С. 21-23.
17. Бугаев, Е.А. Полимеразная цепная реакция в диагностике дифтерийной инфекции / Е.А. Бугаев, В.Г. Мельников, С.Ю. Комбарова, О.Ю. Борисова, Т.В. Платонова, Г.А. Шипулин, С.В. Малинина, М.Ю. Корочкина, И.К. Мазурова // Материалы VIII Всероссийского съезда общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов ; Москва, 26-28 марта 2002 года: сб. ст. в 4 т. - М.: ООО «Росинэкс», 2002. - Т. 3. - С. 236-237.
18. Васильев, Д.А. Разработка системы молекулярно-генетической идентификации *Corynebacterium ulcerans* на основе ПЦР в режиме реального времени / Д.А. Васильев, А.В. Мاستиленко, О.Ю. Борисова, Т.Н. Полетаева, Н.В. Макшанова // Молекулярная диагностика 2014: сб. тр. VIII Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием в 2 т. - М.: ООО «Издательство МБА», 2014. - Т. 2. - Разд. 27. - С. 487-488.
19. Гадуа, Н.Т. Особенности генетической структуры современных штаммов *Bordetella pertussis*: автореф. ... дис. канд. мед. наук: 03.02.03 / Гадуа Натия Торникеевна. - М., 2012. - 27 с.
20. Герасимова, А.Г. Клинико-эпидемиологическая характеристика современного коклюша / А.Г. Герасимова, М.С. Петрова, Н.Т. Тихонова, О.В. Цвиркун, О.П. Попова // Вакцинация. Новости вакцинопрофилактики. - 2004. - № 5(35). - С. 4-5.
21. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц; пер. с англ. Ю.А. Данилова; под ред. Н.Е. Бузикашвили, Д.В. Самойлова. - М.: Практика, 1998. - 459 с.
22. Гореликова, Е.В. Оптимизация клинико-лабораторной диагностики и эпидемиологического надзора за коклюшем: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.30, 03.00.07 / Гореликова Екатерина Владимировна. - Пермь, 2006. - 25 с.
23. ГОСТ Р 53022.2-2008. Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 2. Оценка аналитической надежности методов исследования (точность, чувствительность, специфичность). - Введ. 2010-01-01.- М.: Стандартинформ,

2009. - 31 с.

24. ГОСТ Р 53022.3-2008. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов. - Введ. 2010-01-01. - М.: Стандартиформ, 2009. - 22 с.
25. Грачева, Н.М. Коклюш (клиника, диагностика, лечение): методические рекомендации / Н.М. Грачева, Н.А. Малышев, М.С. Петрова, О.П. Попова, О.Ю. Борисова, Е.И. Келли, Е.Н. Абрамова. - М.: Департамент здравоохранения города Москвы, 2009. - 26 с.
26. Диагностика коклюша и паракоклюша: методические рекомендации МР 3.1.2.0072-13: утверждены Главным государственным санитарным врачом РФ 24.05.2013. - М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2013. - 56 с.
27. Зайцев, Е.М. Применение моноклональных антител для изучения антигенного строения и выявления дифтерийного токсина: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.36 / Зайцев Евгений Михайлович. - М., 1988. - 22 с.
28. Зайцев, Е.М. Особенности постинфекционного и поствакцинального гуморального иммунитета к коклюшу: дис. ... д-ра мед. наук: 14.03.09, 03.02.03 / Зайцев Евгений Михайлович. - М., 2012. - 258 с.
29. Зверякина, Н.Н. К вопросу о повышении эффективности бактериологического метода диагностики коклюшной инфекции / Н.Н. Зверякина, Г.Я. Ценева, Н.Н. Курова, Л.В. Лосева, Г.А. Курова, В.П. Лямина // Клиническая лабораторная диагностика. - 2002. - № 2. - С. 44-45.
30. Инструкция по бактериологическому и серологическому исследованиям при коклюше и паракоклюше (для бактериологических лабораторий санитарно-эпидемиологических станций и больниц): утверждена начальником Главного управления карантинных инфекций Минздрава СССР 09.09.1983. - М.: Министерство здравоохранения, 1983. - 36 с.
31. Иоффе, В.И. Коклюш (микробиология, иммунология, специфическая профилактика) / В.И. Иоффе, П.В. Осипова, Н.Н. Склорова, Н.А. Козлова. - Л.: Медицина, 1964. - 284 с.

32. Калиногорская, О.С. Микробиологические аспекты коклюшной инфекции у детей: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.00.07 / Калиногорская Ольга Серафимовна. - СПб., 2006. - 20 с.
33. Калиногорская, О.С. Особенности течения коклюша у детей на современном этапе: состояние поствакцинального иммунитета и антиинфекционной резистентности слизистой ротоглотки / О.С. Калиногорская, А.С. Кветная // Профилактическая и клиническая медицина. - 2008. - № 3. - С. 102-105.
34. Каратаев, Г.И. Мобильные генетические элементы *Bordetella pertussis* и их роль в регуляции генов вирулентности возбудителя коклюша: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.07, 03.00.15 / Каратаев Геннадий Иванович. - М., 2008. - 48 с.
35. Каратаев, Г.И. Инсерционная инактивация оперона вирулентности в популяции персистирующих бактерий *Bordetella pertussis* / Г.И. Каратаев, Л.Н. Синяшина, А.Ю. Медкова, Е.Г. Семин, З.В. Шевцова, А.З. Матуа, И.Г. Конджария, А.А. Амичба, Д.Т. Кубрава, З.Я. Микваба // Генетика. - 2016. - Т. 52, № 4. - С. 422.
36. Кветная, А. С. Диагностика коклюшной инфекции у детей на современном этапе / А.С. Кветная, О.С. Калиногорская // Детские инфекции. - 2007. - Т. 6, № 1. - С. 13-17.
37. Кириллова, Г.А. Опыт применения иммуноферментного анализа для диагностики коклюша / Г.А. Кириллова, Е.Е. Сухинова, Е.И. Шмелева, Н.У. Мерцалова, Т.Н. Ремова, М.Н. Озерецковская, Н.С. Захарова, Э.П. Петрова, В.Я. Антишина // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 1994. - № 6. - С. 83-84.
38. Комбарова, С.Ю. Усовершенствование методики постановки полимеразной цепной реакции для выявления гена дифтерийного токсина / С.Ю. Комбарова, В.Г. Мельников, О.Ю. Борисова, Т.В. Платонова, Б.Н. Соков, Г.Н. Смердов, Н.С. Ушакова, Н.И. Степанова, Е.А. Бугаев, И.К. Мазурова // Проблемы инфекционных болезней: сб. науч. тр. Московского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского. - М., 2000. - Ч. 1. - С. 47-52.

39. Комбарова, С.Ю. Микробиологический и молекулярно-генетический мониторинг возбудителя дифтерийной инфекции: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.07 / Комбарова Светлана Юрьевна. - М., 2007. - 49 с.
40. Кондратьева, А.М. Характеристика возбудителя коклюша в период массовой специфической профилактики: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.00.07 / Кондратьева Алла Михайловна. - М., 1977. - 20 с.
41. Корженкова, М.П. Особенности клиники дифтерии в условиях циркуляции возбудителя дифтерии высокой степени токсигенности: пособие для врачей / М.П. Корженкова, Т.В. Платонова, В.В. Черкасова, Н.А. Малышев, О.В. Кудряшова, А.И. Берко, В.А. Арсеньев. - М., 2002. - 31 с.
42. Корженкова, М.П. Клиника дифтерии в период высокой и низкой заболеваемости / М.П. Корженкова // Вакцинация. Новости вакцинопрофилактики. - 2006. - № 14(3). - С. 4-6.
43. Костюкова, Н.Н. Дифтерийное бактерионосительство (микробиологическое и иммунологическое исследование): автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 096 / Костюкова Наталья Николаевна. - М., 1971. - 31 с.
44. Костюкова, Н.Н. Микробиологические факторы, определяющие носительство при воздушно-капельных инфекциях / Н.Н. Костюкова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 1997. - № 4. - С. 10-15.
45. Костюкова, Н.Н. Уроки дифтерии / Н.Н. Костюкова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 1999. - № 2. - С. 92-96.
46. Краева, Л.А. Этиологическое значение *Corynebacterium non diphtheriae* у больных с различной патологией / Л.А. Краева, Ж.Н. Манина, Г.Я. Ценева, А.Г. Радченко // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2007. - № 5. - С. - 3-7.
47. Красильникова, В.М. Восстановление «молчащего» гена *tox Corynebacterium diphtheriae* в модельных экспериментах / В.М. Красильникова, Н.В. Воложанцев, В.А. Баннов, В.П. Мякина // Идеи Пастера в борьбе с инфекциями; Санкт-Петербург, 4-5 сентября 2003 года: материалы Третьей междунар. конф., посвящ. 80-летию инст. им. Пастера. - СПб., 2003. - С. 27.

48. Крылова, М.Д. Дифтерийная инфекция (биологические, генетические и эпидемиологические аспекты): монография / М.Д. Крылова. - М.: Медицина, 1976. - 215 с.
49. Кузнецова, Л.С. Эпидемиология современного коклюша и вопросы рационализации его профилактики: автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 14.00.30 / Кузнецова Людмила Сергеевна. - М., 1979. - 25 с.
50. Кузнецова, Л.С. Вакцинопрофилактика острых детских инфекций в научных исследованиях нашего института / Л.С. Кузнецова, Н.М. Максимова, Т.Ф. Чернышова, Д.К. Садыкова // Эпидемиологический надзор как основа профилактики капельных и кишечных инфекций: сб. науч. тр. - М., 1990. - С. 22-30.
51. Курова, Н.Н. Молекулярно-биологическая характеристика *Bordetella pertussis*, циркулирующих в период подъема заболеваемости, и совершенствование лабораторной диагностики коклюша: дис. ... канд. мед. наук: 03.00.07 / Курова Наталия Николаевна. - СПб., 2003. - 135 с.
52. Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции: методические указания МУ 4.2.698-98: утверждены Главным государственным санитарным врачом РФ 09.01.1998. - М.: Интерсэн, 1998. - 47 с.
53. Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции: методические указания МУК 4.2.3065-13: утверждены Главным государственным санитарным врачом РФ 14.07.2013. - М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2013. - 63 с.
54. Лобзин, Ю.В. Клинико-эпидемиологическая характеристика коклюша у детей первых месяцев жизни / Ю.В. Лобзин, И.В. Бабаченко, О.В. Шамшева, А.А. Тетенкова, Н.В. Бахарева, В.П. Бойцов, Н.Н.Зверева // Детские инфекции. - 2011. - Т. 10, № 4. - С. 5-9.
55. Лыткина, И.Н. Заболеваемость коклюшем в Москве и организация мероприятий по ее снижению / И.Н. Лыткина, Г.Г. Чистякова, Н.Н. Филатов // Вакцинация. Новости вакцинопрофилактики. - 2004. - № 5(35). - С. 8-9.
56. Мазурова, И.К. Разработка и применение реакции пассивной

- гемагглютинации для обнаружения дифтерийных противомикробных антител у больных дифтерией и бактерионосителей: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 096 / Мазурова Изабелла Константиновна. - М., 1971. - 27 с.
57. Мазурова, И.К. Детекция токсина и оценка степени токсинообразования с помощью иммуноферментного анализа / И.К. Мазурова, Е.Е. Потемкина, В.В. Свиридов, Е.М. Зайцев // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 1989. - № 6. - С. 66-71.
58. Мазурова, И.К. Индикация дифтерийного токсина методами иммуноферментного анализа и реакции непрямой гемагглютинации: методические указания / И.К. Мазурова, Е.Е. Потемкина, С.Ю. Комбарова, А.Б. Жебрун, В.В. Свиридов, Е.М. Зайцев, И.М. Тымчаковская. - М., 1991. - 27 с.
59. Мазурова, И.К. Комплексная система лабораторной диагностики и наблюдения за возбудителем дифтерии: автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 03.00.07 / Мазурова Изабелла Константиновна. - М., 1993. - 62 с.
60. Мазурова, И.К. Лабораторная диагностика в системе эпиднадзора за дифтерийной инфекцией / И.К. Мазурова, В.Г. Мельников, С.Ю. Комбарова, О.Ю. Борисова // Идеи Пастера в борьбе с инфекциями; Санкт-Петербург, 6-10 июня 1995 года: материалы междунар. конф., посвящ. году Пастера. - СПб., 1995. - С. 16.
61. Мазурова, И.К. Современные методы лабораторной диагностики и наблюдения за возбудителем дифтерийной инфекции / И.К. Мазурова, С.Ю. Комбарова, В.Г. Мельников, О.Ю. Борисова // Материалы VII съезда Всероссийского съезда общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов; Москва, 28-31 января 1997 года: сб. ст. в 3 т. - М., 1997. - Т. 1. - С. 462-463.
62. Мазурова, И. К. Наблюдение за нетоксигенными штаммами *C.diphtheriae* в период снижения заболеваемости дифтерией в России / И.К. Мазурова, С.Ю. Комбарова, О.Ю. Борисова, В.Г. Мельников, Т.В. Платонова // Идеи Пастера в борьбе с инфекциями; Санкт-Петербург, 2-4 сентября 1998 года: материалы

- Второй междунар. конф., посвящ. 75-летию инст. им. Пастера. - СПб., 1998. - С. 186.
63. Мазурова, И.К. Характеристика *Corynebacterium diphtheriae*, циркулирующих в России в период 1984 - 1998 гг. (микробиологический мониторинг в системе эпиднадзора за дифтерийной инфекцией): пособие для врачей / И.К. Мазурова, С.Ю. Комбарова, В.Г. Мельников, О.Ю. Борисова. - М., 1999. - 20 с.
 64. Мазурова, И.К. Ускоренные методы лабораторной диагностики и наблюдения за возбудителем дифтерийной инфекции: методические рекомендации / И.К. Мазурова, С.Ю. Комбарова, В.Г. Мельников, О.Ю. Борисова, Т.В. Платонова, Е.А. Бугаев. - М., 2001. - 12 с.
 65. Мазурова, И.К. Динамика изменчивости основных генов патогенности штаммов *B.pertussis*, выделенных от больных коклюшем в Москве (1948 – 2005 гг.) / И.К. Мазурова, О.Ю. Борисова, С.Ю. Комбарова, Н.Т. Гадуа, В.А. Алешкин // Молекулярная медицина. - 2008. - № 1. - С. 40-45.
 66. Мазурова, И.К. Мониторинг возбудителя дифтерийной инфекции / И.К. Мазурова, С.Ю. Комбарова, О.Ю. Борисова, В.Г. Мельников, Н.М. Максимова, Н.Т. Гадуа, Л.С. Наумов, Н.В. Воложанцев // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2009. - № 3(46). - С. 17-22.
 67. Максимова, Н.М. Дифтерия / Н.М. Максимова, С.С. Маркина, Н.Н. Костюкова // Эволюция инфекционных болезней в России в XX веке: руководство для врачей / В.И. Покровский, Г.Г. Онищенко, Б.Л. Черкасский. - М.: Медицина, 2003. - Гл. 2. - С. 214-236.
 68. Максимова, Н.М. Развитие эпидемического процесса дифтерии в России в условиях высокого уровня специфического иммунитета / Н.М. Максимова, С.С. Маркина, К.А. Яцковский, Н.А. Кошкина // Медицинский альманах. - 2009. - № 2. - С. 105-108.
 69. Максимова, Н.М. Дифтерия в России в 2005 - 2009 годах / Н.М. Максимова, С.С. Маркина, К.А. Яцковский, В.В. Черкасова, М.П. Корженкова, А.В. Сафронова, Н.А. Кошкина // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2010. - № 3. - С. 31-36.

70. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук; пер. с англ. под ред. А.А. Баева и К.Г. Скрябина. - М.: Мир, 1984. - 480 с.
71. Маркина, С.С. Эпидемический процесс дифтерийной инфекции в РСФСР в условиях внедрения эпидемиологического надзора / С.С. Маркина, И.М. Тымчаковская, Н.М. Максимова, Н.Л. Сухорукова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 1989. - № 5. - С. 38-40.
72. Маркина, С.С. Заболеваемость дифтерией в России в 1993 - 1995 гг. / С.С. Маркина, Н.М. Максимова, Е.А. Котова, Н.Я. Жилина // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 1997. - № 4. - С. 8-10.
73. Маркина, С.С. Заболеваемость дифтерией в настоящее время / С.С. Маркина, Н.М. Максимова, Г.Ф. Лазикова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2005. - № 1. - С. 31-37.
74. Мاستиленко, А.В. Разработка системы дифференциации *B.bronchiseptica* и *B.pertussis* на основе мультиплексной ПЦР в режиме «реального времени» / А.В. Мастиленко, Д.А. Васильев, О.Ю. Борисова, Ю.Б. Васильева // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2014. - № 1(25). - С. 50-54.
75. Медкова, А.Ю. Распространенность стертых форм коклюша и анализ фазовых состояний бактерий *Bordetella pertussis* / А.Ю. Медкова, Ю.С. Аляпкина, Л.Н. Синяшина, И.П. Амелина, Я.И. Алексеев, Г.И. Каратаев, А.Г. Боковой // Детские инфекции. - 2010. - Т. 9, № 4. - С. 19-22.
76. Медкова, А.Ю. Инсерционная инактивация оперона вирулентности бактерий *Bordetella pertussis* в диагностике типичных и атипичных форм коклюша: дис. ... канд. мед. наук: 03.02.03, 14.01.09 / Медкова Алиса Юрьевна. - М., 2013. - 105 с.
77. Мельников, В.Г. Нетоксигенные штаммы *Corynebacterium diphtheriae*, несущие ген дифтерийного токсина: пособие для врачей / В.Г. Мельников, С.Ю. Комбарова, О.Ю. Борисова, И.К. Мазурова. - М., 2002. - 12 с.
78. Мельников, В.Г. Характеристика нетоксигенных штаммов *Corynebacterium*

- diphtheriae*, несущих ген дифтерийного токсина / В.Г. Мельников, С.Ю. Комбарова, О.Ю. Борисова, Н.В. Воложанцев, В.В. Веревкин, К.И. Волковой, И.К. Мазурова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2004. - № 1. - С. 3-7.
79. Михайлович, В.М. Использование метода ДНК-ДНК гибридизации для изучения штаммов *Corynebacterium diphtheriae* / В.М. Михайлович, В.Л. Заикин, И.К. Мазурова // Молекулярная генетика, микробиология, вирусология. - 1994. - № 6. - С. 27-29.
 80. Нарвская, О.В. Применение полимеразной цепной реакции для диагностики дифтерии и изучения возбудителя: пособие для врачей / О.В. Нарвская, И.В. Мокроусов. - СПб., 1995. - 20 с.
 81. Николаева, И.В. Коклюш: актуальные вопросы эпидемиологии, диагностики и профилактики / И.В. Николаева, А.Д. Царегородцев // Российский вестник перинатологии и педиатрии. - 2015. - Т. 60, № 5. - С. 162-167.
 82. Онищенко, Г.Г. Эпидемиологическое благополучие населения России / Г.Г. Онищенко // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2013. - №1. - С. 42-51.
 83. Организация и проведение серологического мониторинга состояния коллективного иммунитета к инфекциям, управляемым средствами специфической профилактики (дифтерия, столбняк, коклюш, корь, краснуха, эпидемический паротит, полиомиелит, гепатит В): методические указания МУ 3.1.2943-11: утверждены Главным государственным санитарным врачом РФ 15.07.2011. - М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011. - 19 с.
 84. Патент 2209831 Российская Федерация, МПК С 12 Q 1/68, G 01 N 33/48. Способ дифференциации *Corynebacterium diphtheriae*, содержащих функционально активный ген дифтерийного токсина, от *Corynebacterium diphtheriae*, содержащих функционально неактивный ген дифтерийного токсина / В.Г. Мельников, И.К. Мазурова, С.Ю. Комбарова; заявитель и патентообладатель ГУ МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского. - № 2001135409/09;

- заявл. 28.12.2001; опубл. 10.08.2003, Бюл. № 22 . - 4 с.
85. Патент 2247388 Российская Федерация, МПК⁷ G 01 N 33/569. Способ экспресс-диагностики коклюша / А.С. Кветная, О.С. Калиногорская; заявитель и патентообладатель НИИДИ. - № 2003119018/15; заявл. 24.06.2003; опубл. 27.02.2005, Бюл. № 6. - 7 с.
86. Патент 2316768 Российская Федерация, МПК G 01 N 33/569. Способ получения коклюшного диагностического реагента / В.Н. Сперанская, А.М. Николаева, А.В. Казьянин, Л.Ю. Пагнуева, Е.В. Зиновьева; заявитель и патентообладатель ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России. - № 2006127547/15; заявл. 31.07.2006; опубл. 10.02.2008, Бюл. № 4. - 5 с.
87. Патент 2346987 Российская Федерация, МПК C 12 Q 1/68, C 12 N 15/10. Способ и набор для ускоренной диагностики коклюша / О.Ю. Борисова, И.К. Мазурова, С.Ю. Комбарова, Н.Т. Гадуа, М.С. Петрова, О.П. Попова, А.В. Алешкин; заявитель и патентообладатель ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора. - № 2007147797/13; заявл. 25.12.2007; опубл. 10.02.2009, Бюл. № 5. - 6 с.
88. Патент 2351656 Российская Федерация, МПК C 12 Q 1/68. Способ дифференцирования штаммов *Corynebacterium diphtheriae* биовара *gravis* / О.Ю. Борисова, Н.В. Воложанцев, С.Ю. Комбарова, Н.Т. Гадуа, И.К. Мазурова; заявитель и патентообладатель ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора. - № 2007140879/13; заявл. 07.11.2007; опубл. 10.04.2009, Бюл. № 10. - 5 с.
89. Петри, А. Наглядная медицинская статистика: учебное пособие для вузов / А. Петри, К. Сэбин; пер. с англ. под ред. В.П. Леонова. - 2-е изд., перераб. и доп. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. - 168 с.
90. Петрова М.С. Коклюш в 70-е годы по материалам очагов инфекции: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.09 / Петрова Марина Семеновна. - М., 1978. - 24 с.
91. Петрова, М.С. Коклюш и паракоклюш (профилактика, клиника, лечение): методические рекомендации / М.С. Петрова, О.П. Попова, Т.Н. Москалева. -

- М., 2000. - 25 с.
92. Петрова, М.С. Особенности эпидемиологии и клиники коклюша в период эпидемического неблагополучия / М.С. Петрова, Л.А. Сигаева, О.П. Попова, В.П. Маркелов, С.В. Звонарева // Проблемы инфекционных болезней: сб. науч. тр. Московского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского. - М., 2000. - Ч. 1. - С. 80-86.
 93. Петрова, М.С. Коклюш у детей раннего возраста / М.С. Петрова, О.П. Попова, О.Ю. Борисова, Е.Н. Абрамова, Р.В. Вартанян, Е.И. Келли // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2012. - № 6. - С. 12-24.
 94. Платонов, А.Е. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы / А.Е. Платонов. - М.: РАМН, 2000. - 52 с.
 95. Покровский, В.И. Эволюция инфекционных болезней в России в XX веке: руководство для врачей / В.И. Покровский, Г.Г. Онищенко, Б.Л. Черкасский. - М.: Медицина, 2003. - 664 с.
 96. Попова, О.П. Клинико-эпидемиологические аспекты коклюшной инфекции в современных условиях / О.П. Попова, Т.С. Селезнева, В.И. Милюкова // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 1999. - № 3. - С. 24-26.
 97. Попова, О.П. Клинические особенности коклюша у взрослых / О.П. Попова, М.С. Петрова, О.Ю. Борисова, Т.А. Скирда, Н.М. Грачева, Н.А. Малышев // Терапевтический архив. - 2014. - Т. 86, № 11. - С. 78-81.
 98. Попова, О.П. Коклюш у детей: клинико-иммунологические аспекты, диагностика и лечение: автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 14.01.09 / Попова Ольга Петровна. - М., 2014. - 45 с.
 99. Попова, О.П. Особенности специфического гуморального ответа и цитокиновой регуляции при коклюше у детей / О.П. Попова, Т.А. Скирда, И.М. Федорова, С.И. Котелева // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2015. - Т. 20, № 5. - С. 42-48.
 100. Попова, О.П. Диагностическая ценность метода ИФА при коклюше у детей / О.П. Попова, Т.А. Скирда, И.М. Федорова, М.С. Петрова, О.Ю. Борисова,

- С.Ю. Комбарова, С.В. Бунин, М.В. Пенкина // Детские инфекции. - 2016. - Т. 15, № 2. - С. 36-40.
101. Прадед, М.Н. ПЦР-диагностика инфекций, вызванных *B.pertussis*, *B.parapertussis* и *B.bronchiseptica* / М.Н. Прадед, С.Б. Яцышина, Т.С. Селезнева, С.В. Малинина, Н.В. Бирюлева, Т.Е. Любимова, Н.С. Воробьева // Клиническая лабораторная диагностика. - 2013. - № 1. - С. 53-56.
102. Прадед, М.Н. Клиническая апробация набора реагентов для диагностики коклюша методом ПЦР / М.Н. Прадед, С.Б. Яцышина, Т.С. Селезнева, Н.С. Воробьева, С.В. Малинина, Т.Е. Любимова, Л.А. Наумова, Т.Т. Козыренко, Л.В. Королева, Т.Т. Лазарова, Т.А. Гречанинова, Г.В. Забулаева, Т.В. Демакова, Н.С. Григорьева, М.А. Юферова, В.С. Лямина, Л.Н. Сушкова, И.Б. Блимман, Н.Н. Зверякина, Л.Ю. Жирнова // Молекулярная диагностика 2014: сб. тр. VIII Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием в 2 т. - М.: ООО «Издательство МБА», 2014. - Т. 1. - Разд. 10. - С. 325-326.
103. Профилактика дифтерии: санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.2.3109-13: утверждены Главным государственным санитарным врачом РФ 09.10.2013. - М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2015. - 27 с.
104. Профилактика коклюша: санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.2.3162-14: утверждены Главным государственным санитарным врачом РФ 17.03.2014. - М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2015. - 23 с.
105. Савинова, А.Н. Эффективность новых иммунологических методов выявления *Bordetella pertussis* и секреторных антител: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.00.07 / Савинова Альфия Николаевна. - Казань, 1991. - 20 с.
106. Селезнева, Т.С. Влияние вакцинопрофилактики на эпидемический процесс управляемых инфекций в Российской Федерации / Т.С. Селезнева, Н.С. Титова, А.И. Заргарьянц, Н.М. Максимова, С.С. Маркина // Эпидемиология и инфекционные болезни - 2002. - №2. - С. 6-11.
107. Семенов, Б.Ф. Подъем заболеваемости коклюшем на фоне массовой

- вакцинации. Гипотезы, объясняющие этот феномен / Б.Ф. Семенов, Н.С. Захарова, И.К. Мазурова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2003. - № 6. - С. 70-73.
108. Сигаева, Л.А. Заболеваемость коклюшем в условиях отмены второй ревакцинации / Л.А. Сигаева, Л.С. Кузнецова // Эпидемиология, микробиология и профилактика капельных инфекций: сб. науч. тр. - М.: МНИИЭМ, 1983. - С. 67-73.
109. Сигаева, Л.А. Заболеваемость коклюшем и состояние привитости / Л.А. Сигаева, Л.С. Кузнецова, Е.А. Окиншевич // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 1986. - № 3. - С. 43-47.
110. Сперанская, В.Н. Совершенствование лабораторной диагностики коклюша / В.Н. Сперанская, А.М. Николаева, И.В. Фельдблюм, А.В. Казьянин, Е.В. Гореликова // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2011. - № 3. - С. 46-50.
111. Степаншина, В.Н. Взаимосвязь состава питательных сред с ростовыми и биологическими свойствами *B.pertussis* / В.Н. Степаншина, Л.Н. Алексеева, О.В. Коробова, Л.В. Логачева, А.П. Шепелин, Г.А. Анисимов, К.И. Волковой // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 1994. - № 6. - С. 26-27.
112. Таточенко, В.К. Коклюш – управляемая инфекция / В.К. Таточенко // Вакцинация. Новости вакцинопрофилактики. - 2004. - № 5(35). - С. 2-3.
113. Тимченко, В.Н. Клинико-эпидемиологическая эволюция коклюшной инфекции в Санкт-Петербурге с 1925 по 2001 годы / В.Н. Тимченко, О.В. Парков, И.В. Бабаченко, Е.В. Тимофеева, В.А. Иванович // Детские инфекции. - 2003. - № 1. - С. 24-26.
114. Туморина, С. З. Эпидемиологическая характеристика дифтерийной инфекции у взрослых людей: автореф. ... дис. канд. мед. наук:14.00.30 / Туморина Светлана Захаровна. - Л., 1989. - 23 с.
115. Тюкавкина, С.Ю. Коклюш: эпидемиология, биологические свойства *Bordetella pertussis*, принципы лабораторной диагностики и специфической

- профилактики / С.Ю. Тюкавкина, Г.Г. Харсеева // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2014. - Т. 19, № 4. - С. 50-59.
116. Фаворова, Л.А. Об эпидемиологическом надзоре / Л.А. Фаворова, Н.Л. Сухорукова, Л.М. Иванова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 1981. - № 8. - С. 8-13.
117. Фаворова, Л.А. Дифтерия: монография / Л.А. Фаворова, Н.В. Астафьева, М.П. Корженкова, Л.С. Кузнецова, Н.М. Максимова, В.В. Михайлов, Н.Л. Сухорукова, В.В. Черкасова, Е.А. Шмелева. - М.: Медицина, 1988. - 208 с.
118. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Инфекционная заболеваемость в Российской Федерации за январь-декабрь 2015 года [Электронный ресурс] // Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. - М., 2016. - URL: http://rospotrebnadzor.ru/activities/statisticalmaterials/statistic_details.php?ELEMENT_ID=5525 (дата обращения: 17.11.2016).
119. Феклисова, Л.В. Применение новой тест-системы для диагностики коклюшной инфекции / Л.В. Феклисова, Г.В. Спирина, Т.С. Шобухова, М.Ю. Кириллов, Е.В. Кабишева, В.М. Шебекова, Т.А. Митрофанова // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2000. - № 2. - С. 59-61.
120. Фокина, Е.Г. Современное состояние проблемы дифтерийной инфекции. Ч. 1 / Е.Г. Фокина // Врач. - 2016. - № 9. - С. 6-9.
121. Фокина, Е.Г. Современное состояние проблемы дифтерийной инфекции. Необходимость замены действующей российской квалификации. Ч. 2 / Е.Г. Фокина // Врач. - 2016. - № 10. - С. 8-12.
122. Ценева, Г.Я. Применение полимеразной цепной реакции в диагностике дифтерийной инфекции / Г.Я. Ценева, Е.Е. Щедеркина // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2000. - № 5. - С. 72-74.
123. Ценева, Г.Я. Микробиологическая характеристика возбудителя коклюша и лабораторная диагностика коклюша / Г.Я. Ценева, Н.Н. Курова // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2003. - Т. 5, № 4. - С. 329-341.

124. Чагина, И.А. Антибиотикочувствительность и молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Corynebacterium diphtheriae*: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.02.03 / Чагина Ирина Алексеевна. - М., 2016. - 26 с.
125. Чистякова, Г.Г. Дифтерия у взрослых: эпидемиология и вакцинопрофилактика: дис. ... канд. мед. наук: 14.00.30 / Чистякова Галина Геннадиевна. - М., 2002. - 149 с.
126. Шагинян, И.А. Идентификация и типирование патогенных бактерий: современные подходы / И.А. Шагинян // Вестник РАМН. - 2000. - № 1. - С. 22-28.
127. Шагинян, И.А. Молекулярно-генетические технологии в изучении эволюции возбудителей инфекционных заболеваний / И.А. Шагинян, А.Л. Гинцбург // Генодиагностика инфекционных болезней: сб. тр. 5-ой Всерос. науч.-практ. конф. в 2 т. - М.: Медицина для всех, 2004. - Т. 2. - С. 145-149.
128. Эпидемиологический надзор за дифтерией: методические указания МУ 3.1.3018-12: утверждены Главным государственным санитарным врачом РФ 07.06.2012. - М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012. - 27 с.
129. Якимова, Т.Н. Эпидситуация по дифтерии в России и в субъектах Российской Федерации с 2005 - 2011 гг. / Т.Н. Якимова, С.С. Маркина, Н.М. Максимова // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. - 2012. - № 5(87). - С. 151-154.
130. Якимова, Т.Н. Дифтерия сегодня / Т.Н. Якимова, С.С. Маркина, Н.М. Максимова // Здоровье населения и среда обитания. - 2013. - № 12. - С. 18-19.
131. Якимова, Т.Н. Эпидемиологический надзор за дифтерией в России в период регистрации единичных случаев заболевания: дис. ... канд. мед. наук: 14.02.02 / Якимова Татьяна Николаевна. - М., 2015. - 191 с.
132. Ясинский, А.А. Вакцинопрофилактика управляемых инфекционных заболеваний в Российской Федерации (1995 - 2004 гг.) / А.А. Ясинский, Е.А. Котова, О.П. Чернявская, А.Е. Ершов, А.Л. Перовощикова // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2005. - № 5(24). - С. 8-14.

133. Ясинский, А.А. Эпидемиологическая ситуация в Российской Федерации в 2004 году / А.А. Ясинский, Е.А. Котова, А.Л. Перевощикова, Е.Г. Скворцова, Г.Ф. Лазикова // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2005. - № 2(21). - С. 6-14.
134. Яцышина, С.Б. Разработка набора реагентов для диагностики дифтерии методом ПЦР и мониторинга за *C.diphtheriae* и токсигенными *C.ulcerans* / С.Б. Яцышина, М.Н. Прадед, Т.С. Селезнева, В.Г. Щелокова, К.А. Коновалова, Н.С. Воробьева, М.Н. Елькина // Молекулярная диагностика 2014: сб. тр. VIII Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием в 2 т. - М.: ООО «Издательство МБА», 2014. - Т. 1. - Разд. 10. - С. 332-333.
135. Яцышина, С.Б. Валидизация набора реагентов для ПЦР-диагностики дифтерии / С.Б. Яцышина, М.М. Елькина, Т.С. Селезнева, В.Г. Щелокова, К.А. Коновалова, М.А. Вайтович, О.А. Краус, Л.А. Липатова, Л.В. Белоусова, С.В. Куземцева, А.И. Кобяков // Молекулярная диагностика 2017: сб. тр. IX Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием в 2 т. - Тамбов: ООО фирма «Юлис», 2017. - Т. 1. - Разд. 4. - С. 215-216.
136. Aravena-Roman, M. Polymerase chain reaction for the detection of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* / M. Aravena-Roman, R. Bowman, G. O'Neill // Pathology. - 1995. - Vol. 27, № 1. - P. 71-73.
137. Babu, M. Virulence factors of *Bordetella pertussis* / M. Babu, J. Bhargavi, R.S. Saun, S.K. Singh // Current Science. - 2001. - Vol. 80, № 12. - P. 1512-1522.
138. Backman, A. Nested PCR optimized for detection of *Bordetella pertussis* in clinical nasopharyngeal samples / A. Backman, B. Johansson, P. Olcen // Journal of Clinical Microbiology. - 1994. - Vol. 32, № 10. - P. 2544-2548.
139. Betsou, F. The C-terminal domain is essential for protective activity of the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase-hemolysin / F. Betsou, P. Sebo, N. Guiso // Infection and Immunity. - 1995. - Vol. 63, № 9. - P. 3309-3315.
140. Birkebaek, N.H. *Bordetella pertussis* diagnosed by polymerase chain reaction / N.H. Birkebaek, I. Heron, K. Skjodt // APMIS. - 1994. - Vol. 102, № 4. - P. 291 - 294.

141. Borisova, O.Yu. Investigation of the amylase gene structure of *Corynebacterium diphtheriae* / O.Yu. Borisova, S.Yu. Kombarova, N.V. Volozhantsev, I.K. Mazurova // Ninth International Meeting of the European Laboratory Working Group on Diphtheria (ELWGD) and Diphtheria Surveillance Network (DIPNET); Vouliagmeni, Greece, 15-17 November 2006: programme and abstracts book. - Vouliagmeni, 2006. - P. 67.
142. Borisova, O. Antigenic divergence between *Bordetella pertussis* clinical isolates from Moscow, Russia, and vaccine strains / O. Borisova, S.Yu. Kombarova, N.S. Zakharova, M. van Gent, V.A. Aleshkin, I. Mazurova, F.R. Mooi // Clinical and Vaccine Immunology. - 2007. - Vol. 14, № 3. - P. 234-238.
143. Brotons, P. Validation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid diagnosis of pertussis infection in nasopharyngeal samples / P. Brotons, H.D. de Paz, C. Esteva, I. Latorre, C. Munoz-Almagro // Expert Review of Molecular Diagnostics. - 2016. - Vol. 16, № 1. - P. 125-130.
144. Cassiday, P.K. Analysis of toxigenic *Corynebacterium ulcerans* strains revealing potential for false-negative real-time PCR results / P.K. Cassiday, L.C. Pawloski, T. Tiwari, G.N. Sanden, P.P. Wilkins // Journal of Clinical Microbiology. - 2008. - Vol. 46, № 1. - P. 331-333.
145. Centers for Disease Control and Prevention. Diphtheria [Электронный ресурс] // Manual for the surveillance of vaccine-preventable diseases. - 5th ed. - Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 2011. - Chap. 1. - 9 p. - URL: <https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/surv-manual/chpt01-dip.pdf> (дата обращения: 05.01.2017).
146. Centers for Disease Control and Prevention. Diphtheria [Электронный ресурс] // Yellow Book 2018: health information for international travel. - New York: Oxford University Press, 2017. - Chap. 3. - URL: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2018/infectious-diseases-related-to-travel/diphtheria> (дата обращения: 03.06.2017).
147. Centers for Disease Control and Prevention. Pertussis Epidemic – Washington, 2012 [Электронный ресурс] // Morbidity and mortality weekly report (MMWR). -

2012. - Vol. 61, № 28. - P. 517-522. - URL: <https://www.cdc.gov/mmwr/pdf/wk/mm6128.pdf> (дата обращения: 17.11.2016).
148. Centers for Disease Control and Prevention. Pertussis Epidemic – California, 2014 [Электронный ресурс] // Morbidity and mortality weekly report (MMWR). - 2014. - Vol. 63, № 48. - P. 1129-1132. - URL: <https://www.cdc.gov/mmwr/pdf/wk/mm6348.pdf> (дата обращения: 17.11.2016).
149. Centers for Disease Control and Prevention. Pertussis [Электронный ресурс] // Manual for the surveillance of vaccine-preventable diseases. - Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 2015. - Chap. 10. - 12 p. - URL: <https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/surv-manual/chpt10-pertussis.pdf> (дата обращения: 17.11.2016).
150. Cianciotto, N.P. Characterization of bacteriophages from tox-containing non-toxigenic isolates of *Corynebacterium diphtheriae* / N.P. Cianciotto, N.B. Groman // Microbial Pathogenesis. - 1997. - Vol. 22, № 6. - P. 343-351.
151. Corti, M.A. Rare human skin infection with *Corynebacterium ulcerans*: transmission by a domestic cat / M.A. Corti, G.V. Bloembergen, S. Borelli, H. Kutzner, G. Eich, L. Hoelzle, S. Lautenschlager // Infection. - 2012. - Vol. 40, № 5. - P. 575-578.
152. Cummings, C.A. *Bordetella* species are distinguished by patterns of substantial gene loss and host adaptation / C.A. Cummings, M.M. Brinig, P.W. Lepp, S. van de Pas, D.A. Relman // Journal of Bacteriology. - 2004. - Vol. 186, №5. - P. 1484-1492.
153. Diez-Aguilar, M. Non-diphtheriae *Corynebacterium* species: an emerging respiratory pathogen / M. Diez-Aguilar, P. Ruiz-Garbajosa, A. Fernandez-Olmos, P. Guisado, R. del Campo, C. Quereda, R. Canton, M.A. Meseguer // European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. - 2013. - Vol. 32, № 6. - P. 769-772.
154. Douglas, E. Identification of *Bordetella pertussis* in nasopharyngeal swabs by PCR amplification of a region of the adenylate cyclase gene / E. Douglas, J.G. Coote, R. Parton, W. McPheat // Journal of Medical Microbiology. - 1993. - Vol. 38, № 2. - P.

- 140-144.
155. Efstratiou, A. Comparison of phenotypic and genotypic methods for detection of diphtheria toxin among isolates of pathogenic corynebacteria / A. Efstratiou, K.H. Engler, C.S. Dawes, D. Sesardic // *Journal of Clinical Microbiology*. - 1998. - Vol. 36, № 11. - P. 3173-3177.
 156. Farrell, D.J. Nested duplex PCR to detect *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* and its application in diagnosis of Pertussis in Nonmetropolitan Southeast Queensland, Australia / D.J. Farrell, G. Daggard, T.K.S. Mukkur // *Journal of Clinical Microbiology*. - 1999. - Vol. 37, № 3. - P. 606-610.
 157. Gerlach, G. Evolutionary trends in the genus *Bordetella* / G. Gerlach, F. von Wintzingerode, B. Middendorf, R. Gross // *Microbes and Infection*. - 2001. - Vol. 3, № 1. - P. 61-72.
 158. Giammanco, A. European sero-epidemiology network 2: standardisation of immunoassay results for pertussis requires homogeneity in the antigenic preparations / A. Giammanco, A. Nardone, R. Pebody, G. Kafatos, N. Andrews, A. Chiarini, S. Taormina, F. de Ory, K. Prosenc, B. Krize, H. Hallander, M. Ljungman, E. Marva, A. Tsakris, D. O'Flanagan, F. Schneider, A. Griskevicius, R. Vranckx, I. Karacs // *Vaccine*. - 2008. - Vol. 26, № 35. - P. 4486-4493.
 159. Glare, E.M. Analysis of a repetitive DNA sequence from *Bordetella pertussis* and its application to the diagnosis of pertussis using the polymerase chain reaction / E.M. Glare, J.P. Paton, R.R. Premier, A.J. Lawrence, I.T. Nisbet // *Journal of Clinical Microbiology*. - 1990. - Vol. 28, №9. - P. 1982-1987.
 160. Glushkevich, T.G. The etiology of diphtheria in the Ukraina / T.G. Glushkevich, L.S. Nekrasova, N.N. Zherebko // *Sixth International Meeting of the European Laboratory Working Group on Diphtheria (ELWGD); Brussels, Belgium, 21-24 June 2000: programme and abstracts book*. - Brussels, 2000. - P. 37.
 161. Granstrom, G. Evaluation of serologic assays for diagnosis of whooping cough / G. Granstrom, B. Wretling, C.R. Salenstedt, M. Granstrom // *Journal of Clinical Microbiology*. - 1988. - Vol. 26, № 9. - P. 1818-1823.
 162. Grimpel, E.P. Comparison of polymerase chain reaction, culture and Western

- immunoblot serology for diagnosis of *Bordetella pertussis* infections / E.P. Grimpel, P. Begue, I. Anjak, F. Betsou, N. Guiso // Journal of Clinical Microbiology. - 1993. - Vol. 31, № 10. - P. 2745-2750.
163. Groman, N. B. Detection and expression of DNA homologous to the toxin nontoxigenic isolates of *Corynebacterium diphtheriae* / N. B. Groman, N. Cianciotto, M. Bjorn, M. Rabin // Infection and Immunity. - 1983. - Vol. 42, № 1. - P. 48-56.
164. Harnden, A. Whooping cough in school age children with persistent cough: prospective cohort study in primary care / A. Harnden, C. Grant, T. Harrison, R. Perera, A.B. Brueggemann, R. Mayon-White, D. Mant // BMJ. - 2006. - Vol. 333, № 7560. - P. 174-177.
165. He, Q. Comparison of polymerase chain reaction with culture and enzyme immunoassay for diagnosis of pertussis / Q. He, J. Mertsola, H. Soini, M. Skurnik, O. Ruuskanen, M.K. Viljanen // Journal of Clinical Microbiology. - 1993. - Vol. 31, № 3. - P. 642-645.
166. He, Q. Evaluation of pooled and individual components of *Bordetella pertussis* as antigens in an enzyme Immunoassay for diagnosis of pertussis / Q. He, J. Mertsola, J.P. Himanen, O. Ruuskanen, M.K. Viljanen // European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. - 1993. - Vol. 12, № 9. - P. 690-695.
167. Heininger, U. A controlled study of the relationship between *Bordetella pertussis* infection and sudden unexpected deaths in German infants / U. Heininger, W.J. Kleemann, J.D. Cherry // Pediatrics. - 2004. - Vol. 114, № 1. - P. 9-15.
168. Hoppe, J.E. Methods for isolation of *Bordetella pertussis* from patients with whooping cough / J.E. Hoppe // European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. - 1988 - Vol. 7, № 5. - P. 616-620.
169. Hoppe, J. E. Comparison of three kinds of blood and two incubation atmospheres for cultivation of *Bordetella pertussis* on charcoal agar / J.E. Hoppe, M. Scblagenhauf // Journal of Clinical Microbiology. - 1989. - Vol. 27, № 9. - P. 2115-2117.
170. Hoppe, J.E. Comparison of cefsulodin and cephalixin as selective agents in agar

- for *Bordetella pertussis* / J.E. Hoppe, M. Schlagenhauf // Immunität und Infektion. - 1990. - Vol. 18, № 2. - P. 40-41.
171. Hot, D. Differential modulation of *Bordetella pertussis* virulence genes as evidenced by DNA microarray analysis / D. Hot, R. Anotine, G. Renauld-Mongenie, V. Caro, B. Hennuy, E. Levillain, L. Huot, G. Wittmann, D. Poncet, F. Jacob-Dubuisson, C. Guyard, F. Rimlinger, L. Aujame, E. Godfroid, N. Guiso, M.J. Quentin-Millet, Y. Lemoine, C. Loch // Molecular Genetics and Genomics. - 2003. - Vol. 269, № 4. - P. 475-486.
 172. Houard, S. Specific identification of *Bordetella pertussis* by the polymerase chain reaction / S. Houard, C. Hackel, A. Herzog, A. Bollen // Research in Microbiology. - 1989. - Vol. 140, № 7. - P. 477-487.
 173. Indumathi, V.A. Diphtheria-like illness in a fully immunised child caused by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* / V.A. Indumathi, R. Shikha, D.R. Suryaprakash // Indian Journal of Medical Microbiology. - 2014. - Vol. 32, № 4. - P. 443-445.
 174. Kamachi, K. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid diagnosis of *Bordetella pertussis* infection / K. Kamachi, H. Toyozumi-Ajisaka, K. Toda, S.C. Soeung, S. Sarath, Y. Nareth, Y. Horiuchi, K. Kojima, M. Takahashi, Y. Arakawa // Journal of Clinical Microbiology. - 2006. - Vol. 44, № 5. - P. 1899-1902.
 175. Kamachi, K. Laboratory-based surveillance of pertussis using multitarget real-time PCR in Japan: evidence for *Bordetella pertussis* infection in preteens and teens / K. Kamachi, S. Yoshino, C. Katsukawa, N. Otsuka, Y. Hiramatsu, K. Shibayama // New Microbes and New Infections. - 2015. - Vol. 8. - P. 70-74.
 176. Kamada, T. Case of acute pharyngitis caused by *Corynebacterium ulcerans* in Ibaraki Prefecture / T. Kamada, A. Hatanaka, A. Tasaki, K. Honda, A. Tsunoda, K. Kitamura // Journal of Otolaryngology of Japan. - 2012. - Vol. 115, № 7. - P. 682-686.
 177. Kersters, K. *Bordetella avium* sp. nov., isolated from the respiratory tracts of turkeys and other birds / K. Kersters, K.H. Hinz, A. Hertle, P. Segers, A. Lievens,

- O. Siegmann, J. De Ley // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. - 1984. - Vol. 34, № 1. - P. 56-70.
178. King, A.J. Changes in the genomic content of circulating *Bordetella pertussis* strains isolated from the Netherlands, Sweden, Japan and Australia: adaptive evolution or drift? / A.J. King, T. van Gakom, H.G. van der Heide, A. Advani, S. van der Lee // BMC Genomics. - 2010. - Vol. 11:64. - P. 1-15.
 179. Klement, E. An outbreak of pertussis among young Israeli soldiers / E. Klement, L. Uliel, I. Engel, T. Hasin, M. Yavzori, N. Orr, N. Davidovitz, N. Lahat, I. Srugo, E. Zangvil, D. Cohen // Epidemiology and Infection. - 2003. - Vol. 131, № 3. - P. 1049-1054.
 180. Ko, K.S. New species of *Bordetella*, *Bordetella ansorpii* sp. nov., isolated from the purulent exudate of an epidermal cyst / K.S. Ko, K.R. Peck, W.S. Oh, N.Y. Lee, J.H. Lee, J.H. Song // Journal of Clinical Microbiology. - 2005. - Vol. 43, № 5. - P. 2516-2519.
 181. Kolodkina, V. Multiplex real-time PCR assay for detection and differentiation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* / V. Kolodkina, M. Martinov, A. Babenko // Iranian Journal of Microbiology. - 2014. - Vol. 6, № 3. - P. 140-148.
 182. Konrad, R. Possible human-to-human transmission of toxigenic *Corynebacterium ulcerans* / R. Konrad, S. Hormansdorfer, A. Sing // Clinical Microbiology and Infection. - 2015. - Vol. 21, № 8. - P. 768-771.
 183. Lanotte, Ph. Evaluation of four commercial Real-Time PCR assays for detection of *Bordetella spp.* in nasopharyngeal aspirates / Ph. Lanotte, Ch. Plouzeau, Ch. Burucoa, C. Grelaud, S. Guillot, N. Guiso, F. Garnier // Journal of Clinical Microbiology. - 2011. - Vol. 49, № 11. - P. 3943-3946.
 184. Leininger, E. Comparative roles of the Arg-Gly-Asp sequence present in the *Bordetella pertussis* adhesions pertactin and filamentous hemagglutinin / E. Leininger, C.A. Ewanowich, A. Bhargava, M.S. Peppler, J.G. Kenimer, M.J. Brennan // Infection and Immunity. - 1992. - Vol. 60, № 6. - P. 2380-2385.
 185. Li, Z.M. Cloning and sequencing of the structural gene for the porin protein of *Bordetella pertussis* / Z.M. Li, J.H. Hannah, S. Stibitz, N.Y. Nguyen, C.R.

- Manclark, M.J. Brennan // *Molecular Microbiology*. - 1991. - Vol. 5, № 7. - P. 1649-1656.
186. Li, Z.M. Identification of *Bordetella pertussis* infection by shared-primer PCR / Z.M. Li, D.L. Jansen, T.M. Finn, S.A. Halperin, A. Kasina, S.P. O'Connor, T. Aoyama, C.R. Manclark, M.J. Brennan // *Journal of Clinical Microbiology*. - 1994. - Vol. 32, № 3. - P. 783-789.
187. Lind-Brandberg, L. Evaluation of PCR for diagnosis of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* infections / L. Lind-Brandberg, C. Welinder-Olsson, T. Lagergard, J. Taranger, B. Trollfors, G. Zackrisson // *Journal of Clinical Microbiology*. - 1998. - Vol. 36, № 3. - P. 679-683.
188. Litt, D.J. Detection of anti-pertussis toxin IgG in oral fluids for use in diagnosis and surveillance of *Bordetella pertussis* infection in children and young adults / D.J. Litt, D. Samuel, J. Duncan, A. Harnden, R.C. George, T.G. Harrison // *Journal of Medical Microbiology*. - 2006. - Vol. 55, № 9. - P. 1223-1228.
189. Litt, D.J. Direct molecular typing of *Bordetella pertussis* from clinical specimens submitted for diagnostic quantitative (real-time) PCR / D.J. Litt, E. Jauneikaite, D. Tchipeva, T.G. Harrison, N.K. Fry // *Journal of Medical Microbiology*. - 2012. - Vol. 61, № 12. - P. 1662-1668.
190. Loeffelholz, M. Towards improved accuracy of *Bordetella pertussis* nucleic acid amplification tests / M. Loeffelholz // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2012. - Vol. 50, № 7. - P. 2186-2190.
191. Mancini, F. Identification and molecular discrimination of toxigenic and nontoxigenic diphtheria *Corynebacterium* strains by combined real-time polymerase chain reaction assays / F. Mancini, M. Monaco, M. Pataracchia, C. von Hunolstein, A. Pantosti, A. Ciervo // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. - 2012. - Vol. 73, № 2. - P. 111-120.
192. Markina, S.S. Diphtheria in the Russian Federation in the 1990s / S.S. Markina, N.M. Maksimova, C.R. Vitek, E.Y. Bogatyreva, A.A. Monisov // *The Journal of Infection Diseases*. - 2000. - Vol. 181 Suppl. 1. - P. S27-S34.
193. Martini, H. Improving specificity of *Bordetella pertussis* detection using a four

- target real-time PCR / H. Martini, L. Detemmerman, O. Soetens, E. Yusuf, D. Pierard // PLoS One. - 2017. - Vol. 12, № 4. - e0175587.
194. Mastrantonio, P. Polymerase chain reaction for the detection of *Bordetella pertussis* in clinical nasopharyngeal aspirates / P. Mastrantonio, P. Stefanelli, M. Giuliano // Journal of Medical Microbiology. - 1996. - Vol. 44, № 4. - P. 261-266.
 195. Mathieu, A. Life on human surfaces: skin metagenomics / A. Mathieu, T.O. Delmont, T.M. Vogel, P. Robe, R. Nalin, P. Simonet // PLoS One. - 2013. - Vol. 8, № 6. - e65288.
 196. Mattoo, S. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies / S. Mattoo, J.D. James // Clinical Microbiology Reviews. - 2005. - Vol. 18, № 2. - P. 326-382.
 197. Mazurova, I.K. Characterization of non-toxigenic tox-bearing *Corynebacterium diphtheriae* the waning Russian epidemic / I.K. Mazurova, O.J. Borisova, S.J. Kombarova, V.G. Melnikov, T.V. Platonova, J. Reiss, C. Kim, T. Popovic // Fifth International Meeting of the European Laboratory Working Group on Diphtheria (ELWGD); Thessaloniki, Greece, June 1998: programme and abstracts book. - Thessaloniki, 1998. - P. 33.
 198. Mazurova, I.K. Laboratory diagnosis of diphtheria as part of diphtheria surveillance in Russia / I.K. Mazurova, V. Melnikov, S.J. Kombarova, O. Borisova, E.A. Bugaev // Seventh International meeting of the European Laboratory Working Group on Diphtheria (ELWGD) and Diphtheria Surveillance Network (DIPNET); Vienna, Austria, 12-14 June 2002: programme and abstracts book. - Vienna, 2002. - P. 53.
 199. McNicol, P. Evaluation and validation of a monoclonal immunofluorescent reagent for direct detection of *Bordetella pertussis* / P. McNicol, S.M. Giercke, M. Gray, D. Martin, B. Brodeur, M.S. Peppler, T. Williams, G. Hammond // Journal of Clinical Microbiology. - 1995. - Vol. 33, № 11. - P. 2868-2871.
 200. Melnikov, V.G. Molecular screening for the «identification» of non-toxigenic tox bearing strains of *Corynebacterium diphtheriae* from the Russian Federation / V.G.

- Melnikov, A. De Zoysa, I.K. Mazurova, S.J. Kombarova, O.J. Borisova, K.H. Engler, A. Efstratiou // Sixth International Meeting of the European Laboratory Working Group on Diphtheria (ELWGD); Brussels, Belgium, 21-24 June 2000: programme and abstracts book. - Brussels, 2000. - P. 60-61.
201. Melnikov, V. Etiological value of non-toxigenic tox-bearing (NTTB) *Corynebacterium diphtheriae* strains / V. Melnikov, S. Kombarova, O. Borisova, I.K. Mazurova // Seventh International meeting of the European Laboratory Working Group on Diphtheria (ELWGD) and Diphtheria Surveillance Network (DIPNET); Vienna, Austria, 12-14 June 2002: programme and abstracts book. - Vienna, 2002. - P. 80.
202. Mertsola, J. Serologic diagnosis of pertussis: evaluation of pertussis toxin and other antigens in enzyme-linked immunosorbent assay / J. Mertsola, O. Ruuskanen, T. Kuronen, O. Meurman, M.K. Viljanen // The Journal of Infection Diseases. - 1990. - Vol. 161, № 5. - P. 966-971.
203. Mikhailovich, V.M. Application of PCR for detection of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains isolated during the Russian diphtheria epidemic, 1990 through 1994 / V.M. Mikhailovich, V.G. Melnikov, I.K. Mazurova, I.K. Wachsmuth, J.D. Wenger, M. Wharton, H. Nakao, T. Popovic // Journal of Clinical Microbiology. - 1995. - Vol. 33, № 11. - P. 3061-3063.
204. Moore, L.S. *Corynebacterium ulcerans* cutaneous diphtheria / L.S. Moore, A. Leslie, M. Meltzer, A. Sandison, A. Efstratiou, S. Sriskandan // The Lancet. Infectious diseases. - 2015. - Vol. 15, № 9. - P. 1100-1107.
205. Morril, W.E. Effects of transport temperature and medium on recovery of *Bordetella pertussis* from nasopharyngeal swabs / W.E. Morril, J.M. Barbaree, B.S. Fields, G.N. Sanden, W.T. Martin // Journal of Clinical Microbiology. - 1988. - Vol. 26, № 9. - P. 1814-1817.
206. Nakao, H. Heterogeneity of diphtheria toxin gene, *tox*, and its regulatory element, *dtxR*, in *Corynebacterium diphtheriae* strains causing epidemic diphtheria in Russia and Ukraine / H. Nakao, J.M. Pruckler, I.K. Mazurova, O.V. Narvskaja, T.G. Glushkevich, V.F. Marijevski, A.N. Kravetz, B.S. Fields, I.K. Wachsmuth, T.

- Popovic // Journal of Clinical Microbiology. - 1996. - Vol. 34, № 7. - P. 1711-1716.
207. Nakao, H. Development of a direct PCR assay for detection of the diphtheria toxin gene / H. Nakao, T. Popovic // Journal of Clinical Microbiology. - 1997. - Vol. 35, № 7. - P. 1651-1655.
208. Nhan, T.X. Microbiological investigation and clinical significance of *Corynebacterium spp.* in respiratory specimens / T.X. Nhan, J.J. Parienti, G. Badiou, R. Leclercq, V. Cattoir // Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. - 2012. - Vol. 74, № 3. - P. 236-241.
209. Notomi, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA / T. Notomi, H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino, T. Hase // Nucleic Acids Research. - 2000. - Vol. 28, № 12. - P. E63.
210. Notomi, T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects / T. Notomi, Y. Mori, N. Tomita, H. Kanda // The Journal of Microbiology. - 2015. - Vol. 53, № 1. - P. 1-5.
211. Pallen, M.J. Rapid screening for toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* by the polymerase chain reaction / M.J. Pallen // Journal of Clinical Pathology. - 1991. - Vol. 44, №12. - P. 1025-1026.
212. Pallen, M.J. Polymerase chain reaction for screening clinical isolates of corynebacteria for the production of diphtheria toxin / M.J. Pallen, A.J. Hay, L.H. Puckey, A. Efstratiou // Journal of Clinical Pathology. - 1994. - Vol. 47, № 4. - P. 353-356.
213. Patent JP 2007228868 A, IPC C 12 N 15/09, C 12 Q 1/68, G 01 N 21/78, G 01 N 21/83. Method for detecting diphtheria toxin gene by LAMP method and primer set therefor / I. Masaaki, T. Motohide, A. Yoshichika; applicant Japan Health Science Foundation. - № JP20060054058 2006-02-28, 2007-03-13. - 9 p.
214. Perez-Parra, S. Letal endocarditis due to *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* / S. Perez-Parra, A. Pena, E. Blanca, F. Garcia // Revista Chilena de Infectologia. - 2016. - Vol. 33, № 2. - P. 229-31.
215. Pimenta, F.P. A multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Corynebacterium diphtheriae* and differentiation between non-toxigenic and

- toxigenic isolates / F.P. Pimenta, R.Jr. Hirata, A.C. Rosa, L.G. Milagres, A.L. Mattos-Guaraldi // *Journal of Medical Microbiology*. - 2008. - Vol. 57, № 11. - P. 1438-1439.
216. Qin, X. Multitarget PCR for diagnosis of pertussis and its clinical implications / X. Qin, E. Galanakis, E.T. Martin, J.A. Englund // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2007. - Vol. 45, № 2. - P. 506-511.
217. Qin, X. Resurgence of Pertussis and its laboratory diagnosis / X. Qin // *Clinical Microbiology Newsletter*. - 2015. - Vol. 37, № 9. - P. 69-76.
218. Regan, J. Enrichment medium for the isolation of *Bordetella* / J. Regan, F. Lowe // *Journal of Clinical Microbiology*. - 1977. - Vol. 6, №3. - P. 303-309.
219. Riffelmann, M. Performance of commercial enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to *Bordetella pertussis* / M. Riffelmann, K. Thiel, J. Schmetz, C. H. Wirsing von Koenig // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2010. - Vol. 48, № 12. - P. 4459-4463.
220. Rodgers, L. Epidemiologic and laboratory features of a large outbreak of pertussis-like illnesses associated with cocirculating *Bordetella holmesii* and *Bordetella pertussis* - Ohio, 2010-2011 / L. Rodgers, S.W. Martin, A. Cohn, J. Budd, M. Marcon, A. Terranella, S. Mandal, D. Salamon, A. Leber, M.L. Tondella, K. Tatti, K. Spicer, A. Emanuel, E. Koch, L. McGlone, L. Pawloski, M. Lemaile-Williams, N. Tucker, R. Iyer, T.A. Clark, M. Diorio // *Clinical Infectious Diseases*. - 2013. - Vol. 56, № 3. - P. 322-331.
221. Rothstein, E. Health burden of pertussis in adolescents and adults / E. Rothstein, K. Edwards // *The Pediatric Infectious Disease Journal*. - 2005. - Vol. 24 Suppl. 5. - P. S44-S47.
222. Saeki, J. The detection of toxigenic *Corynebacterium ulcerans* from cats with nasal inflammation in Japan / J. Saeki, C. Katsukawa, M. Matsubayashi, H. Nakanishi, M. Furuya, H. Tani, K. Sasai // *Epidemiology and Infection*. - 2015. - Vol. 143, № 12. - P. 2660-2665.
223. Sangal, V. Diphtheria-like disease caused by toxigenic *Corynebacterium ulcerans* strain / V. Sangal, L. Nieminen, B. Weinhardt, J. Raeside, N.P. Tucker, C.D.

- Florea, K.G. Pollok, P.A. Hoskisson // *Emerging Infectious Diseases*. - 2014. - Vol. 20, № 7. - P. 1257-1258.
224. Sanz Moreno, J.C. Laboratory diagnosis of pertussis. Role of serology / J.C. Sanz Moreno, F. de Ory Manchon, A.J. Gonzalez, J.L. de La Torre, F. Salmeron, A. Limia, O. Tello, I. Pachon, C. Amela, J. Vazquez, F. de Ory, J.C. Sanz // *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica*. - 2002. - Vol. 20, № 5. - P. 212-218.
225. Schlapfer, G. Use of the polymerase chain reaction to detect *Bordetella pertussis* in patients with mild or atypical symptoms of infection / G. Schlapfer, H.P. Senn, R. Berger, M. Just // *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. - 1993. - Vol. 12, № 6. - P. 459-463.
226. Schlapfer, G. Polymerase chain reaction identification of *Bordetella pertussis* infections in vaccinees and family members in a pertussis vaccine efficacy trial in Germany / G. Schlapfer, J.D. Cherry, U. Heininger, M. Ueberal, S. Schmitt-Grohe, S. Laussucq, M. Just, K. Stehr // *The Pediatric Infectious Disease Journal*. - 1995. - Vol. 14, № 3. - P. 209-214.
227. Schuhegger, R. Detection of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* strains by a novel real-time PCR / R. Schuhegger, M. Lindermayer, R. Kugler, J. Heesemann, U. Bursch, A. Sing // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2008. - Vol. 46, № 8. - P. 2822-2823.
228. Sing, A. Rapid detection and molecular differentiation of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* strains by LightCycler PCR / A. Sing, A. Berger, W. Schneider-Brachert, T. Holzmann, U. Reischl // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2011. - Vol. 49, № 7. - P. 2485-2489.
229. Skoff, T.H. Sources of infant pertussis infection in the United States / T.H. Skoff, C. Kenyon, N. Cocoros, J. Liko, L. Miller, K. Kudish, J. Baumbach, S. Zansky, A. Faulkner, S.W. Martin // *Pediatrics*. - 2015. - Vol. 136, № 4. - P. 635-641.
230. Stone, B.L. Duration of *Bordetella pertussis* polymerase chain reaction positivity in confirmed pertussis illness / B.L. Stone, J. Daly, R. Srivastava // *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*. - 2014. - Vol. 3, № 4. - P. 347-349.

231. Tatti, K.M. Novel multitarget real-time PCR assay for rapid detection of *Bordetella* species in clinical specimens / K.M. Tatti, K.N. Sparks, K.O. Boney, M.L. Tondella // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2011. - Vol. 49, № 12. - P. 4059-4066.
232. Titov, L. Biological properties of non-toxigenic *Corynebacterim diphtheriae* isolates circulating in Belarus (1996 - 1997) / L. Titov, V. Kolodkina, A. Dronina, P. Grimont, C. Andronescu // Sixth International Meeting of the European Laboratory Working Group on Diphtheria (ELWGD); Brussels, Belgium, 21-24 June 2000: programme and abstracts book. - Brussels, 2000. - P. 59.
233. Torres, Lde.F. Multiplex polymerase chain reaction to identify and determine the toxigenicity of *Corynebacterium spp* with zoonotic potential and an overview of human and animal infections / Lde.F. Torres, D. Ribeiro, Jr.R. Hirata, L.G. Pacheco, M.C. Souza, L.S. dos Santos, C.S. dos Santos, M. Salah, M.M. Costa, M.G. Ribeiro, S.A. Selim, V.A. Azevedo, A.L. Mattos-Guaraldi // *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. - 2013. - Vol. 108, № 3. - P. 272-279.
234. van Amersfoort, S.C.M. Analysis of *Bordetella pertussis* populations in European countries with different vaccination policies / S.C.M. van Amersfoort, L.M. Schouls, H.G.J. van der Heide, A. Advani, H.O. Hallander, K. Bondeson, C.H.W. von Konig, M. Riffelmann, C. Vahrenholz, N. Guiso, V. Caro, E. Njamkepo, Q. He, J. Mertsola, F.R. Mooi // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2005. - Vol. 43, № 6. - P. 2837-2843.
235. van der Zee, A. Polymerase chain reaction assay for pertussis: simultaneous detection and discrimination of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* / A. van der Zee, C. Agterberg, M. Peeters, J. Schellekens, F.R. Mooi // *Journal of Clinical Microbiology*. - 1993. - Vol. 31, № 8. - P. 2134-2140.
236. van der Zee, A. A clinical validation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* polymerase chain reaction: comparison with culture and serology using samples from patients with suspected whooping cough from a highly immunized population / A. van der Zee, C. Agterberg, M. Peeters, F. Mooi, J. Schellekens // *The Journal of Infectious Diseases*. - 1996. - Vol. 174, №1. - P. 89-

- 96.
237. van der Zee, A. Laboratory diagnosis of Pertussis / A. van der Zee, J.F. Schellekens, F.R. Mooi // *Clinical Microbiology Reviews*. - 2015. - Vol. 28, № 4. - P. 1005-1026.
238. Vandamme, P. *Bordetella hinzii* sp. nov., isolated from poultry and humans / P. Vandamme, J. Hommez, M. Vancanneyt, M. Monsieurs, B. Hoste, B. Cookson, C.H. Wirsing von Konig, K. Kersters, P.J. Blackall // *International Journal of Systematic Bacteriology*. - 1995. - Vol. 45, № 1. - P. 37-45.
239. Vandamme, P. *Bordetella trematum* sp. nov., isolated from wounds and ear infections in humans, and reassessment of *Alcaligenes denitrificans* Rüger and Tan 1983 / P. Vandamme, M. Heyndrickx, M. Vancanneyt, B. Hoste, P. De Vos, E. Falsen, K. Kersters, K.H. Hinz // *International Journal of Systematic Bacteriology*. - 1996. - Vol. 46, № 4. - P. 849-858.
240. Vandamme, P.A. *Bordetella bronchialis* sp. nov., *Bordetella flabilis* sp. nov. and *Bordetella sputigena* sp. nov., isolated from human respiratory specimens, and reclassification of *Achromobacter sediminum* Zhang et al. 2014 as *Verticia sediminum* gen. nov., comb. nov. / P.A. Vandamme, C. Peeters, M. Cnockaert, E. Inganas, E. Falsen, E.R. Moore, O.C. Nunes, C.M. Manaia, T. Spilker, J.J. LiPuma // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. - 2015. - Vol. 65, № 10. - P. 3674-3682.
241. Vandentorren, S. Toxigenic *Corynebacterium ulcerans* in a fatal human case and her feline contacts, France, March 2014 / S. Vandentorren, N. Guiso, E. Badell, P. Boisrenoult, M. Micaelo, G. Troche, P. Lecouls, M.J. Moquet, O. Patey, E. Belchior // *Euro surveillance: European communicable disease bulletin*. - 2014. - Vol. 25, № 19(38). - P. 20910.
242. Versteegh, F.G. *Bordetella pertussis* and mixed infections / F.G. Versteegh, T.A. Mooi-Kokenberg, J.F. Schellekens, J.J. Roord // *Minerva Pediatrica*. - 2006. - Vol. 58, № 2. - P. 131-137.
243. Viljanen, M.K. Serological diagnosis of pertussis: IgM, IgA and IgG antibodies against *Bordetella pertussis* measured by enzymelinked immunosorbent assay

- (ELISA) / M.K. Viljanen, O. Ruuskanen, C. Granberg, T.T. Salmi // *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. - 1982. - Vol. 14, № 2. - P. 117-122.
244. Vitek, C.R. Risk of diphtheria among schoolchildren in the Russian Federation in relation to time since last vaccination / C.R. Vitek, M.B. Brennan, C.A. Gotway, V.Y. Bragina, N.V. Govorukina, O.N. Kravtsova, P.H. Rhodes, K.M. Bisgard, P.M. Strebel // *The Lancet*. - 1999. - Vol. 353, № 9150. - P. 355-358.
245. Volozhantsev, N. V. Mechanism of blockage of *tox* gene expression in NTTB *Corynebacterim diphtheriae* strains and reactivation of the «silent» *tox* gene / N. V. Volozhantsev, V. M. Bannov, V. M. Krasilnikova, A. Efstratiou // Eighth International Meeting of the European Laboratory Working Group on Diphtheria (ELWGD) and Diphtheria Surveillance Network (DIPNET); Copenhagen, Denmark, 16-18 June 2004: programme and abstracts book. - Copenhagen, 2004. - P. 41.
246. von Wintzingerode, F. *Bordetella petrii* sp. nov., isolated from an anaerobic bioreactor, and emended description of the genus *Bordetella* / F. von Wintzingerode, A. Schattke, R.A. Siddiqui, U. Rosick, U.B. Gobel, R. Gross // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. - 2001. - Vol. 51, № 4. - P. 1257-1265.
247. Waters, V. Outbreak of atypical pertussis detected by polymerase chain reaction in immunized preschool-aged children / V. Waters, F. Jamieson, S.E. Richardson, M. Finkelstein, A. Wormsbecker, S.A. Halperin // *The Pediatric Infectious Disease Journal*. - 2009. - Vol. 28, № 7. - P. 582-587.
248. Wensley, A. Risk factors for pertussis in adults and teenagers in England / A. Wensley, G.J. Hughes, H. Campbell, G. Amirthalingam, N. Andrews, N. Young, L. Coole // *Epidemiology and Infection*. - 2017. - Vol. 145, № 5. - P. 1025-1036.
249. Weyant, R.S. *Bordetella holmesii* sp. nov., a new gram-negative species associated with septicemia / R.S. Weyant, D.G. Hollis, R.E. Weaver, M.F. Amin, A.G. Steigerwalt, S.P. O'Connor, A.M. Whitney, M.I. Daneshvar, C.W. Moss, D.J. Brenner // *Journal of Clinical Microbiology*. - 1995. - Vol. 33, № 1. - P. 1-7.
250. Wood, N. Pertussis: review of epidemiology, diagnosis, management and

- prevention / N. Wood, P. McIntyre // Paediatric Respiratory Reviews. - 2008. - Vol. 9, № 3. - P. 201-211.
251. World Health Organization. Infections and infectious diseases [Электронный ресурс] // A manual for nurses and midwives in the WHO European Region. - Copenhagen: World Health Organization, 2001. - 271 p.- URL: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0013/102316/e79822.pdf?ua=1 (дата обращения: 05.01.2017).
252. World Health Organization. Pertussis (whooping cough) [Электронный ресурс] // WHO-recommended standards for surveillance of selected vaccine-preventable diseases. - Geneva: World Health Organization, 2003. - P. 28-30. - URL: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/68334/1/WHO_V-B_03.01_eng.pdf?ua=1 (дата обращения: 05.01.2017).
253. Zackrisson, G. Immunoglobulin A antibodies to pertussis toxin and filamentous hemagglutinin in saliva from patients with pertussis / G. Zackrisson, T. Lagergard, B. Trollfors, I. Krantz // Journal of Clinical Microbiology. - 1990. - Vol. 28, № 7. - P. 1502-1505.