

На правах рукописи

Пименова Алена Сергеевна

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

03.02.03 - микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2018

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,
доцент

Борисова Ольга Юрьевна

Официальные оппоненты:

Маянский Николай Андреевич – доктор медицинских наук, профессор РАН, Научно-исследовательский институт педиатрии Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лабораторный отдел, заведующий

Андреевская Софья Николаевна – кандидат медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», отдел микробиологии, старший научный сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2018 года в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.046.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного 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 по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10, <http://www.gabrich.ru>

Автореферат разослан «_____» _____ 2018 года

Ученый секретарь

диссертационного совета,
доктор медицинских наук, доцент

Борисова Ольга Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 (Селезнева Т.С. и др., 2002; Таточенко В.К., 2004; Маркина С.С. и др., 2005; Максимова Н.М. и др., 2009, 2010; Якимова Т.Н. и др., 2012, 2013; Онищенко Г.Г., 2013).

С 1990-х годов в странах с высоким уровнем охвата профилактическими прививками регистрируется подъем заболеваемости коклюшем (Qin X. et al., 2007; <https://www.cdc.gov>), что связано с недостатками вакцинации ацеллюлярными вакцинами, изменением генотипических свойств возбудителя, а также широким внедрением молекулярно-генетических методов для идентификации *B.pertussis* (Qin X. et al., 2007; Qin X., 2015; <https://www.cdc.gov>). С 2012 года в России заболеваемость коклюшем стабилизировалась на уровне 3,0-5,0 на 100 тыс. населения (<http://www.rospotrebnadzor.ru>). 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 (Басов А.А., 2016). Кроме того, в последние годы в структуре заболеваемости увеличивается удельный вес стертых и легких форм болезни среди детей старшей возрастной группы и взрослых (Бабаченко И.В. и др., 2014; Борисов А.С. и др., 2017), а также участились случаи выявления бактерионосителей среди практически здоровых людей (Mattoo S., James J.D., 2005; Waters V. et al., 2009).

Несмотря на успехи вакцинопрофилактики, дифтерия по-прежнему является серьезной проблемой общественного здравоохранения в странах с недостаточным уровнем иммунизации. По данным ВОЗ и Центров по контролю и профилактике заболеваний США (CDC) в Иране, Непале, Пакистане, Индии, Индонезии, Гане, Бразилии, Гаити, Доминиканской Республике дифтерия по сей день остается эндемичным заболеванием (<http://www.who.int/en>; <https://www.cdc.gov>), регистрируются локальные вспышки в Таиланде, Лаосе и странах Африки. А также в странах Европы появились сообщения о случаях заболевания дифтерией среди мигрантов и туристов, посетивших эндемичные по этой инфекции территории. 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) (Якимова Т.Н., 2015). Однако актуальность проблемы дифтерии в условиях спорадической заболеваемости по сей день сохраняется (Маркина С.С. и др., 2005; Максимова Н.М. и др., 2009, 2010; Якимова Т.Н. и др., 2012, 2013; Фокина Е.Г., 2016), так как существует бактерионосительство, эпидемический процесс протекает среди привитого населения, а также утрачивается опыт клинического и бактериологического распознавания дифтерии (Якимова Т.Н., 2015). 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 трудовыми затратами позволят идентифицировать возбудителей дифтерии и коклюша. При коклюшной инфекции с 2014 года используется комплекс трех методов (бактериологический, серологический и молекулярно-генетический), применение которых определяется сроком развития заболевания. Наиболее эффективным среди них является молекулярно-генетический, позволяющий выявить фрагмент/фрагменты генома *B.pertussis*, в том числе геномов нескольких видов бордетелл, методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Вместе с тем, применение тест-систем в формате 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. 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 в нашей стране.

Степень разработанности темы исследования

Отечественными и зарубежными исследователями предложены разные методы амплификации нуклеиновых кислот (nested-ПЦР, ПЦР-РВ), с помощью которых возможно проводить идентификацию различных участков генома *B.pertussis*: гена коклюшного токсина (Houard S. et al., 1989; Grimprel E.P. et al., 1993; Birkebaek N.H. et al., 1994; Schlapfer G. et al., 1993, 1995; Mastrantonio P. Et al., 1996), аденилатциклазного токсина (Douglas E. et al., 1993), порина (Li Z.M. et al., 1991, 1994), повторяющихся последовательностей хромосомы (Glare E.M. et al., 1990; He Q. et al., 1993; Backman A. et al., 1994; van der Zee A. et al., 1993, 1996; Loeffelholz M., 2012; Медкова А.Ю., 2013). На территории РФ зарегистрирован один набор реагентов на основе метода ПЦР «АмплиСенс® *Bordetella* multi-FL» (Прадед М.Н. и др., 2013, 2014). Вместе с тем до сих пор нет международной унифицированной молекулярно-генетической тест-системы, существуют различия в выборе генов-мишеней, 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 (3-5 дней). Кроме того, проведение этих исследований сопряжено с использованием большого числа питательных сред и реагентов, что увеличивает стоимость анализа. Правильность проведения исследования в значительной степени зависит от качества постановки всех тестов, что в практических условиях вызывает большие сложности. Предпринятые попытки разработки тест-систем для ПЦР, ПЦР-РВ, ПЦР-мультиплекс, в том числе с дифференциацией *C.ulcerans* и *C.pseudotuberculosis*, направлены на определение токсигенных свойств у коринебактерий, выделенных в чистой культуре (Pallen M.J., 1991, 1994; Aravena-Roman M. et al. 1995; Mikhailovich V.M. et al., 1995; Nakao H., Popovic T., 1997; Masaaki I. et al., 2007; Pimenta F.P. et al., 2008; Schuegger R. et al., 2008; Sing A. et al., 2011; Torres Lde.F. et al., 2013). Единичные исследования, основанные на выявлении специфических фрагментов генома *C.diphtheriae* непосредственно в патологическом материале (Cassiday P.K. et al., 2008; Pimenta F.P. et al., 2008; Schuegger R. et al., 2008; Mancini F. et al., 2012; Яцышина С.Б. и др., 2014, 2017), требуют дальнейшего развития.

За последние 20 лет сотрудниками ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского были предложены два варианта генодиагностики дифтерии: ПЦР с электрофорезом, позволяющий в клиническом материале в течение 5-6 часов выявить фрагмент гена *tox* с дифференциацией НТТН-штаммов *C.diphtheriae* с делецией нуклеотида G (Комбарова С.Ю. и др., 2000; Мазурова И.К. и др., 2001), и, совместно с сотрудниками ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболensk), ПЦР-мультиплекс, позволяющий выявить фрагменты генов *tox* и *amy* с возможностью определения токсигенности и биовара возбудителя (Борисова О.Ю. и др., 2006, 2009, 2013).

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 (Notomi T. et al., 2000). Этот метод был применен и для диагностики коклюша (Notomi T. et al., 2000, 2015; Kamachi K. et al., 2006). Однако предложенный зарубежными учеными вариант апробирован только на штаммах

B.pertussis, а во время проведения испытаний на ограниченном количестве клинических образцов регистрировали ложноположительные результаты. Кроме того, способ предусматривал использование дорогостоящих реагентов, что представляет определенные ограничения для широкого применения. В 2009 году в ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского разработан способ ускоренной генодиагностики коклюша на основе LAMP, позволяющий выявить ДНК *B.pertussis* в клиническом материале в течение 9-10 часов с эффективностью 84,9% (Борисова О.Ю. и др., 2009, 2010). Применение зарубежными исследователями технологии LAMP для идентификации возбудителя дифтерии было проведено только на чистых культурах *C.diphtheriae* (Masaaki I. et al., 2007).

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 и ускорит проведение исследования. Использование мультиплексных технологий расширит возможности выявления *C.ulcerans*, вызывающего дифтериеподобное заболевание, а также позволит проводить мониторинг генотипических свойств *C.diphtheriae* на более высоком методическом 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 свежeweделенных 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* (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), десять штаммов *B.pertussis* (В-7392; В-7393; В-7394; В-8011; В-8012; В-8013; В-8014; В-8015; В-8016;

В-8017), шесть штаммов *B. parapertussis* (В-7821; В-8006; В-8007; В-8008; В-8009; В-8010) и два штамма *B. bronchiseptica* (В-7822; В-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) (акты внедрения от 05.09.2017 г., 16.10.2017 г.).

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 35 типовых коллекционных штаммов, полученных из Государственных коллекций «ГКПМ – ОБОЛЕНСК» (Россия), ФГБУ «НЦЭСМП» МЗ РФ (Россия) и American Type Culture Collection (США), National Collection of Type Cultures (Англия); 409 свежевыделенных штаммов, полученных в период 2012-2016 гг. из бактериологических лабораторий ЛПО и ФБУЗ ЦГиЭ в субъектах РФ; 159 штаммов микроорганизмов, выделенных в период 2013-2014 гг. от 79 пациентов, госпитализированных в ГБУЗ «Научно-исследовательский клинический институт оториноларингологии им. Л.И. Свержевского» Департамента здравоохранения города Москвы (ГБУЗ НИКИО им. Л.И. Свержевского ДЗМ).

Образцы клинического материала. В исследование включено 379 клинических образцов, полученных от больных с подозрением на коклюш и контактных с ними лиц, госпитализированных в ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница №1 Департамента здравоохранения города Москвы» (ГБУЗ «ИКБ №1 ДЗМ»); 430 клинических образцов, полученных при обследовании контактных лиц из очагов коклюшной инфекции и организованных коллективов с длительно кашляющими детьми (учащиеся 1-9 и 11-х классов, работники образования различных категорий (администрация, педагоги, медицинские работники, работники столовой, обслуживающий персонал) из 8 общеобразовательных учреждений г. Москвы и Московской области). Клинический материал брали двумя сухими стерильными одноразовыми зондами-тампонами (СОРАН, Италия) с задней стенки ротоглотки. Обследовано 79 пациентов с различными формами хронического тонзиллита и патологией полости носа, поступивших в ГБУЗ НИКИО им. Л.И. Свержевского ДЗМ в 2013-2014 гг. Забирали материал из зева двумя сухими стерильными одноразовыми зондами-тампонами (СОРАН, Италия). Патологический материал с одного тампона засеивали на питательные среды с целью

последующей идентификации, а с другого – смывали в 0,5 мл физиологического раствора для выделения ДНК.

Микробиологические методы исследования

Идентификацию микроорганизмов видов *C.diphtheriae*, *C.ulcerans* и *C.pseudotuberculosis* проводили согласно МУ 4.2.698-98 и МУК 4.2.3065-13 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции». Исследуемый материал засеивали на кровяно-теллуритовый агар (КТА) на основе ГРМ-агара (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) или СПА (ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ, Махачкала) с добавлением 7% крови КРС (ООО «ЛейТран», Москва) и 0,02% теллурита калия (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) и инкубировали 24-48 часов при 37°C. Токсигенные свойства определяли в реакции преципитации в агаре по Фельдману с использованием Коринетоксагара (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с добавлением 20% сыворотки КРС (ООО «ЛейТран», Москва) и дисков, пропитанных дифтерийным антитоксином (НПО «Диагностические системы», Н. Новгород). Биохимические свойства (цистиназная, уреазная, сахаролитическая и нитратредуктазная активности) изучали на средах, приготовленных в лабораторных условиях, или с помощью биохимической тест-системы «ДС-ДИФ-КОРИНЕ» (НПО «Диагностические системы», Н. Новгород).

Идентификацию микроорганизмов видов *B.pertussis*, *B.parapertussis* и *B.bronchiseptica* проводили согласно МР 3.1.2.0072-13 «Диагностика коклюша и паракоклюша» и «Инструкции по бактериологическому и серологическому исследованиям при коклюше и паракоклюше» (1983 г.). Исследуемый материал засеивали на КУА (Филиал «Медгамал» ФГБУ «НИИЭМ Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ, Москва) или Бордетелагар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) и термостатировали 48-72 часов при 37°C. Биохимическую активность штаммов оценивали путем определения их способности продуцировать ферменты оксидазу, тирозиназу, уреазу, а также редуцировать нитраты в нитриты и ассимилировать цитраты на среде Симмонса. Серологические свойства (до 2013 г.) изучали путем постановки реакции агглютинации со специфическими монорецепторными факторными сыворотками (Филиал «Медгамал» ФГБУ «НИИЭМ Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ, Москва).

Идентификация микроорганизмов, выделенных при обследовании больных с различными формами хронического тонзиллита и патологией полости носа. Исследуемый материал с тампона засеивали на кровяной агар на основе ГРМ-агара (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с добавлением 10% крови КРС (ООО «ЛейТран», Москва) по методу Gould и инкубировали 24-120 часов при 37°C.

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).

Молекулярно-генетические методы исследования

Выделение хромосомной ДНК из бактерий проводили кипячением (Маниатис Т. и др., 1984). При проведении модельных экспериментов ДНК выделяли из бактериальной культуры контрольного токсигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis* №665 (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с помощью трех коммерческих наборов: «АмплиПрайм® ДНК-сорб-АМ» (ООО «НекстБио», Москва), «АмплиПрайм® РИБО-преп» (ООО «НекстБио», Москва) и «К-СОРБ» (СИНТОЛ, Москва).

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

ПЦР для выявления фрагментов гена *groB* и гена *16SrRNA* у микроорганизмов рода *Corynebacterium*, выделенных из клинического материала от пациентов с тонзиллярной патологией и патологией полости носа, осуществляли в соответствии (Mathieu A. et al., 2013). 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>).

ПЦР для выявления фрагментов гена *tox* у нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* с целью идентификации НТТН-штаммов проводили в соответствии (Pallen, M.J., 1991).

Детекцию продуктов амплификации осуществляли методом горизонтального электрофореза в агарозном геле (Lonza, США) в 50х ТАЕ-буфере (Thermo Fisher Scientific, Литва). В качестве маркера

молекулярных весов ДНК использовали GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Литва). Электрофорез проводили при напряжении 160 V в течение 60 мин. Продукты амплификации визуализировали с помощью геледокументирующей системы Quantum-ST4-1100/26M (Vilber Lourmat, Франция).

ПЦР-РВ с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации для выявления и дифференциации специфических фрагментов генома возбудителей коклюша, паракоклюша и бронхисептикоза в клиническом материале осуществляли с использованием набора «АмплиСенс® *Bordetella* multi-FL» / «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва). Амплификацию проводили с помощью 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).

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 EMBL/GenBank (<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. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Согласованность мнений двух испытателей, осуществляющих исследование, относительно наличия/отсутствия изучаемого качественного критерия оценивали по каппе Кохена. Расчет показателей, характеризующих валидность диагностического теста проводили по стандартным формулам (Гланц С., 1998; Платонов А.Е., 2000; Петри А., Сэбин К., 2010).

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* в ПЦР-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* в ПЦР-мультиплекс и 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 ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России. Апробацию ускоренного метода лабораторной диагностики коклюш проводили на базе ГБУЗ «ИКБ №1 ДЗМ» совместно с врачами 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 одновременно 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 «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).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, из них 3 статьи в рецензируемых изданиях, 1 – в другом издании, 2 тезисов в рецензируемых изданиях, 3 – в материалах конференций и 2 патента на изобретение РФ.

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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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

Одной из перспективных технологий в настоящее время является использование изотермической амплификации (LAMP) (Notomi T. et al., 2000, 2015). 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 (<http://www.freepatent.ru/patents/2346987>). Нами проведена оптимизация ранее предложенного способа (<http://www.freepatent.ru/patents/2346987>), и разработан ускоренный метод генодиагностики коклюшной инфекции на основе LAMP, который включает: 1 – взятие клинического материала с задней стенки ротоглотки; 2 – пробоподготовку образца; 3 – выделение ДНК сорбционным методом с помощью коммерческих наборов реагентов; 4 – проведение амплификации в изотермических условиях; 5 – детекцию методом горизонтального электрофореза.

Приготовление реакционной смеси проводили путем смешивания двух смесей. 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-VIP 5'-CGCAAAGTCGCGCGATGGTAACGGATCACACCATGGCA-3', BP-LF 5'-ACGGAAGAATCGAGGGTTTTGTAC-3' и BP-LB 5'-GTCACCGTCCGGACCGTG-3') (Kamachi K. et al., 2006). Состав смеси № 2: рабочее разведение (1:9) Bst ДНК-полимеразы в буферном растворе. В смесь №1 вносили пробы ДНК. Затем прогревали и охлаждали, и вносили смесь №2. В качестве положительного контроля использовали ДНК штамма *B.pertussis* №143. Амплификацию в изотермическом режиме проводили или в программируемом микротермостате «Гном», или в амплификаторе «Герцик»: 65°C – 60 мин., 80°C – 2 мин. Детекцию продуктов амплификации осуществляли методом горизонтального электрофореза в 2% агарозном геле. Дифференциацию проводили путем сравнения электрофоретической подвижности полученных фрагментов ДНК с подвижностью контрольного образца – ДНК штамма *B. pertussis* №143. Если у исследуемого ДНК-образца имелись специфические светящиеся профили, аналогичные профилю контрольного штамма *B.pertussis*, то данные образцы регистрировались как содержащие ДНК *B.pertussis* (Рисунок 1 А, В). На способ и набор ускоренной генодиагностики коклюша получен патент на изобретение РФ №2542396 от 21.01.2015 г.

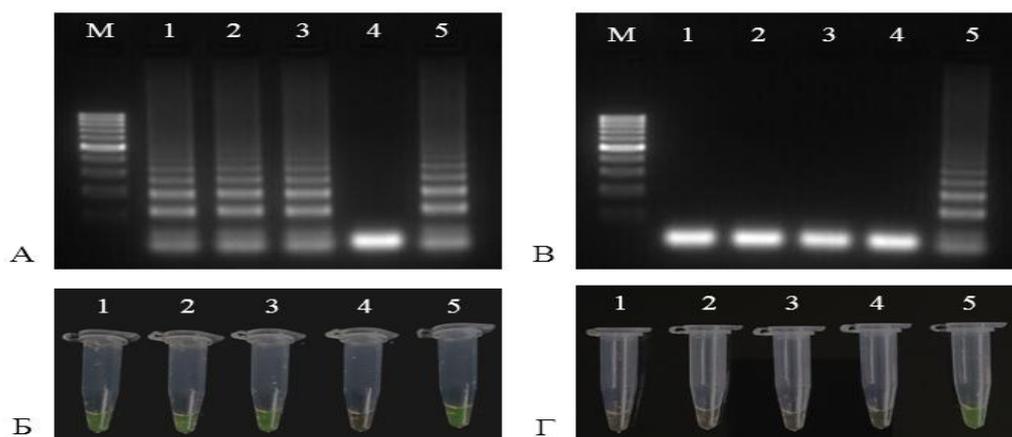


Рисунок 1 – Выявление ДНК *B.pertussis*: детекция методом горизонтального электрофореза (А, В) и с помощью интеркалирующего красителя (Б, Г) (пример)

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)

На ограниченном количестве проб клинического материала от больных с диагнозом «Коклюш» проведена апробация методики детекции продуктов амплификации с помощью интеркалирующего красителя. Для этого в каждую пробу вносили по 10 мкл 10 000x 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 1 Б, Г).

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». Применение интеркалирующего красителя при детекции результатов позволит сократить продолжительность исследования еще на 1 час.

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: 5×10^9 – 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 высеивание 100 мкл на Бордетеллагар и инкубировали при 37°C. Через 72 и 96 часов подсчитывали число выросших колоний (КОЕ/мл). Выделение ДНК из исследуемого материала осуществляли с помощью коммерческого набора «АмплиПрайм® ДНК-сорб-АМ». Аналитическая чувствительность составила 10^2 ГЭ/мл. Оценка аналитической специфичности проведена на типовых коллекционных и свежесекционированных штаммах других представителей рода *Bordetella* и микроорганизмах других родов. Установлено, что во всех изученных образцах положительные сигналы не регистрировали. Сходимость и воспроизводимость методики определяли при различных условиях, оценивая частоту совпадения обнаружения ДНК *B.pertussis* в многочисленных пробах одного и того же однородного образца. В 100% случаев были получены идентичные результаты.

Оценка валидности разработанного метода

В исследование включено 329 пациентов в возрасте от 27 дней до 40 лет, госпитализированных в ГБУЗ «ИКБ №1 ДЗМ» (2013-2016 гг.). Клинический диагноз устанавливался врачами-инфекционистами в соответствии с принятыми протоколами ведения больных. 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 (Таблица 1).

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*.

Таблица 1 – Результаты обследования пациентов I и II групп при использовании разработанного диагностического теста

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

Тяжесть течения 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. У 49 (19,4%) больных наблюдали осложненное течение коклюша. 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. Обследование 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.

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.

Валидность разработанного способа оценивали в соответствии с (Гланц С., 1998; Платонов А.Е., 2000; Петри А., Сэбин К., 2010). Показано, 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.

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».

Разработанный метод был эффективен при любых формах клинического течения коклюша. 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. 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 96,0% 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. 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. У больных коклюшем как I, так и II группы ДНК *B.pertussis* обнаружена в высоком проценте случаев (96,6% и 95,3%, соответственно), и, следовательно, не зависит от приема антибактериальных препаратов (критерий хи-квадрат Пирсона, $p > 0,05$).

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. 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%.

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 в 8 образовательных учреждениях. Под медицинским наблюдением находилось 4930 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 (Таблицы 2, 3).

Таблица 2 – 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

Таблица 3 – 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 трех очагах (№1, 2 и 4) (Таблица 2) обследовано 84 контактных лица в возрасте от 8 до 74 лет, в том числе 6 человек с клиническими проявлениями в виде кашля. Случаи коклюша выявлены у 7 детей (ученики 1, 3, 4, 5 и 9-х классов). Лабораторное подтверждение получено с помощью бактериологии (1 случай) и серологии в ИФА и РНГА (6 случаев). При обследовании 84 контактных с ними лиц ДНК *B.pertussis* выявлена у 15 (17,9%) человек, в том числе у трех человек с наличием клинических проявлений.

В пяти организованных коллективах (Таблица 3) 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. С помощью разработанного теста ДНК *B.pertussis* выявлена у 18 (5,2%) человек, в том числе у двух человек с наличием клинических проявлений (кашля). При обследовании организованных коллективов ДНК-положительные образцы выявлялись не только у детей (54,5%), но и у взрослых (45,5%), среди которых в 33,3% случаев у педагогических работников, которые, по

причине своей профессиональной деятельности, находились в более тесном контакте с детьми.

Результаты применения разработанного метода для обследования семейных очагов коклюшной инфекции

Нами проведена апробация разработанного способа при обследовании 40 женщин, практически здоровых на момент госпитализации в ГБУЗ «ИКБ №1 ДЗМ» по уходу за больным коклюшем ребенком. Исследования проведены на разных сроках с момента появления у детей первых клинических симптомов болезни. У обследуемых с целью выявления ДНК *B.pertussis* брали мазки с задней стенки ротоглотки и для определения уровня специфических противокклюшных антител IgA, IgM и IgG в ИФА осуществляли забор венозной крови из локтевой вены.

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 (Таблица 4).

Таблица 4 – Результаты лабораторного обследования женщин, находившихся в контакте с больным коклюшем ребенком

Результаты лабораторного исследования	Группы обследуемых пациентов			
	I группа (n = 19), «Коклюш»		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

В I группу включено 19 (47,5%) женщин, у которых в период нахождения в стационаре появились клинические признаки коклюша. Из них у 14 (73,7%) женщин диагностирована типичная легкая форма и у 5 (26,3%) – атипичная стертая форма коклюша. 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. 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.

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.

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). 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).

Разработка метода ускоренной генодиагностики на основе изотермической амплификации (LAMP) для выявления ДНК возбудителя дифтерии

Нами разработан способ генодиагностики, основанный на технологии LAMP и позволяющий выявлять возбудителя дифтерийной инфекции в клиническом материале в течение 4-4,5 часов от начала исследования. Разработанный способ включает: 1 – взятие клинического материала; 2 – пробоподготовку и выделение ДНК из исследуемого материала; 3 – проведение амплификации в изотермическом режиме; 4 – детекцию продуктов методом горизонтального электрофореза.

Реакционная смесь для проведения амплификации состоит из двух смесей: смесь №1 – 10x ПЦР буфер, 2 mM смесь dNTP, 25 mM MgCl₂, раствор Betaine, ДТ-ВР-FIP (5'-GATTGGTCCCAGTAACGGTTTTTCATCAAACGGCATTAGAGC-3'), ДТ-ВР-BIP (5'-CTGTATTCGCTGGGGCTAACTCAAATTATCAGCTGTTTCGCTAT-3'), ДТ-F3 (5'-GGAAAAGCTAAACAATACCTAGA-3'), ДТ-B3 (5'-AAGAGCAGCAGTTGTCTT-3') и Loop (5'-ATGCAACGTGGGCAGTAAAC-3'); смесь №2 – рабочее разведение (1:9) Bst ДНК-полимеразы в буферном растворе. В каждую пробирку вносили смесь №1, затем 3 мкл ДНК пробы. Пробы прогревали 3-5 мин. при 90°C - 95°C и далее охлаждали. В каждую пробу вносили 1 мкл смеси №2, слегка перемешивали. Амплификацию проводили в режиме: 65°C – 60 мин, 80°C – 2 мин. В качестве положительного контроля использовали ДНК токсигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis* №665. Детекцию результатов реакции осуществляли в 2% агарозном геле. Дифференциацию осуществляли путем сравнения профиля исследуемого ДНК-образца со специфическим профилем ДНК-образца контрольного штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis* №665. Если профиль исследуемого ДНК-образца был аналогичен профилю ДНК-образца контрольного штамма, то данные образцы регистрировались как содержащие ДНК токсигенного штамма *C.diphtheriae*, т.е. свидетельствовало о наличии в клиническом материале ДНК возбудителя дифтерии (Рисунок 2А). На способ генодиагностики дифтерийной инфекции получен патент на изобретение РФ №2623149 от 22.06.2017 г.

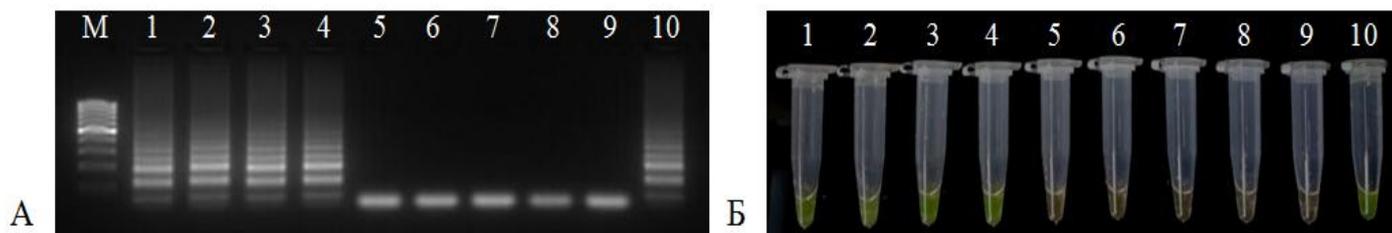


Рисунок 2 – Способ генодиагностики возбудителя дифтерии (LAMP): детекция методом горизонтального электрофореза (А) и с помощью интеркалирующего красителя (Б) (пример)

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)

Как и в разработанном способе генодиагностики коклюша в представленном методе также возможен переход на детекцию продуктов амплификации с помощью интеркалирующего красителя, что позволит сократить продолжительность исследования еще на 1 час. Результаты амплификации оценивали визуально по изменению цвета содержимого пробирки (Рисунок 2Б). Положительными

считали те пробы, в которых регистрировали светло-зеленое окрашивание. Отрицательные же образцы окрашивались в светло-оранжевый цвет.

Апробация способа генодиагностики возбудителя дифтерии проведена на типовых коллекционных штаммах *C.diphtheriae* и на штаммах *C.diphtheriae*, выделенных из клинического материала от пациентов с подозрением на дифтерию. В работу включено 50 токсигенных и 130 нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* двух биоваров, а также 15 НТТН-штаммов *C.diphtheriae*. Установлено, что положительные сигналы регистрировались во всех образцах, содержащих ДНК токсигенных штаммов *C.diphtheriae* двух биоваров, а также в образцах ДНК НТТН-штаммов *C.diphtheriae*, содержащих делецию или мобильный генетический IS-1 элемент в гене *tox*. При этом в образцах ДНК НТТН-штаммов *C.diphtheriae*, содержащих в гене *tox* мобильный генетический IS-2 элемент, положительные сигналы не были обнаружены. Во всех образцах с ДНК нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* двух биоваров положительные сигналы отсутствовали. Следовательно, разработанный способ в 100% случаев выявлял ДНК токсигенных штаммов *C.diphtheriae*. При этом НТТН-штаммы *C.diphtheriae* с IS-2 элементом идентифицировались как нетоксигенные, а НТТН-штаммы коринебактерий с делецией или IS-1 элементом – как токсигенные (Рисунок 3).

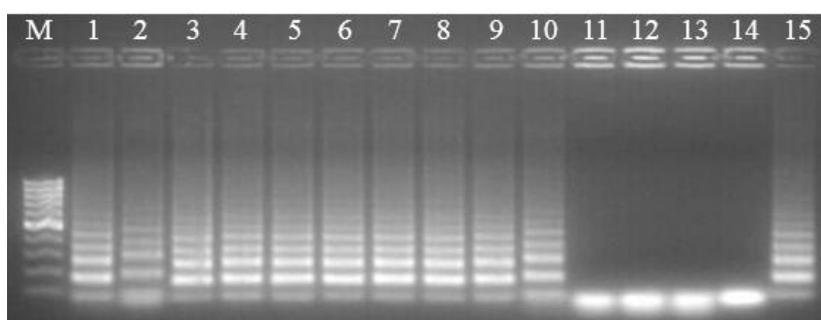


Рисунок 3 – Электрофореграмма продуктов изотермической амплификации: ДНК 6 токсигенных штаммов *C.diphtheriae* и ДНК 7 НТТН-штаммов *C.diphtheriae* (пример)

Примечание: М – маркер молекулярных весов ДНК GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific; 1 - 3 – ДНК токсигенных штаммов *C.diphtheriae* биовара *gravis*; 4 - 6 – ДНК токсигенных штаммов *C.diphtheriae* биовара *mitis*; 7 - 8 – ДНК НТТН-штаммов *C.diphtheriae*, содержащих делецию нуклеотида G в позиции 55 в гене *tox*; 9 - 10 – ДНК НТТН-штаммов *C.diphtheriae*, содержащих мобильный генетический IS-1 элемент в гене *tox*; 11 - 13 – ДНК НТТН-штаммов *C.diphtheriae*, 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)

Оценка аналитической чувствительности и специфичности разработанного метода генодиагностики

С целью оценки аналитической чувствительности разработанного метода готовили три линейки последовательных разведений бактериальной культуры типового штамма *C.diphtheriae* №665. Далее из каждого разведения делали серию одинаковых проб, из которых выделяли ДНК с помощью трех наборов. Параллельно с этим, из каждого разведения производили высеv на КТА. Через 24 и 48 часов подсчитывали число выросших колоний (КОЕ/мл). Показано, что при использовании наборов «К-СОРБ» и «АмплиПрайм® ДНК-сорб-АМ» аналитическая чувствительность метода составила 5×10^3 ГЭ/мл, а набора «АмплиПрайм® РИБО-преп» – 10^3 ГЭ/мл. При сопоставлении с данными бактериологического исследования наибольшая аналитическая чувствительность разработанного способа была достигнута при использовании набора «АмплиПрайм® РИБО-преп» – $4,5 \times 10^2$ ГЭ/мл.

Оценка аналитической специфичности разработанного метода проведена на типовых коллекционных и свежесделанных штаммах представителей рода *Corynebacterium* и микроорганизмов других родов. Показано, что во всех образцах, содержащих ДНК микроорганизмов представителей рода *Corynebacterium* и ДНК микроорганизмов других родов, положительные сигналы отсутствовали, т.е. разработанный способ генодиагностики дифтерии обладает 100% аналитической специфичностью.

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. В ходе исследования установлено, что аналитическая чувствительность на иммитантах клинических образцов составила 5×10^3 ГЭ/мл (Рисунок 4). При сопоставлении полученных данных с результатами бактериологического исследования истинное значение аналитической чувствительности соответствовало $2,3 \times 10^3$ ГЭ/мл.

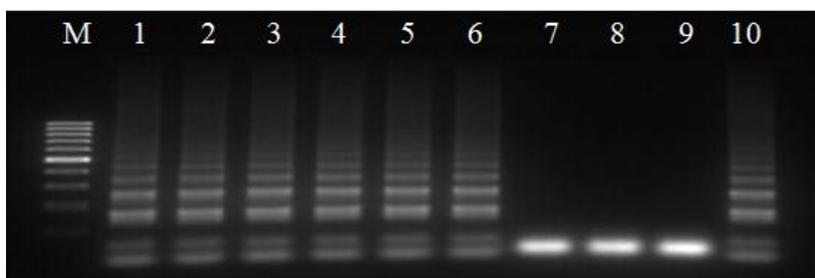


Рисунок 4 – Электрофореграмма: порог аналитической чувствительности при работе с иммитантами клинических образцов (пример)

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* (Efstratiou A. et al., 1998; Nhan T.X. et al., 2012), проведена апробация разработанного способа генодиагностики на клиническом материале, который получен от 79 пациентов с различными формами хронического тонзиллита и патологией полости носа из ГБУЗ НИКИО им. Л.И. Свержевского ДЗМ. Установлено, что во всех пробах положительные сигналы отсутствовали, т.е. 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.

Разработка метода генодиагностики в мультиплексном формате для выявления ДНК возбудителя дифтерии

Представленный в предыдущем разделе метод генодиагностики на основе LAMP 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* при проведении мониторинга возбудителя в системе эпиднадзора за дифтерийной инфекцией. Поэтому разработан способ выявления и дифференциации ДНК токсигенных и нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* и *C.ulcerans*, и НТТН-штаммов *C.diphtheriae* на основе метода ПЦР в формате мультиплекса.

Первоначально осуществлен подбор ДНК-мишеней – пяти генов: *16SrRNA*, кодирующего рибосомальную РНК; *tox*, кодирующего синтез главного фактора патогенности возбудителя дифтерии – дифтерийного токсина (два фрагмента); *rpoB*, кодирующего β -субъединицу РНК-полимеразы; *dtxR*, кодирующего DtxR белок, осуществляющий железо-опосредованную репрессию; *amy*, кодирующего фермент амилазу, участвующий в процессе разложения крахмала. На основании последовательностей выбранных фрагментов генов 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. Последовательности праймеров: 16S F 5'-ACCGCACTTTAGTGTGTGTG-3' и 16S R 5'-TCTCTACGCCGATCTTGTAT-3'

(Torres Lde.F. et al., 2013); DT F, DT 514 F и DT R (оригинальные); C 2700 F 5'-CGTATGAACATCGGCCAGGT-3' и C 3130 R 5'-TCCATTTTCGCCGAAGCGCTG-3' (Torres Lde.F. et al., 2013); dtxR1 F 5'-GGGACTACAACGCAACAAGAA-3' и dtxR1 R 5'-CAACGGTTTGGCTAACTGTA-3' (Nakao H. et al., 1996); New Amy F 5'-CGTGTGGTCAGTCGAAGGAA-3' и New Amy R1 5'-TGGACAGGCCAACGGAATAC-3' (оригинальные). 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). Программа амплификации: 95°C – 3 мин., 95°C – 60 сек, 55°C – 40 сек., 68°C – 90 сек. (34 цикла), 68°C – 5 мин. На этапе амплификации в пробирке №1 одновременно проводилась амплификация генов *rpoB*, *dtxR*, *amy*, *16SrRNA* и *tox* (размером 514 п.н.) (Рисунок 5А). В пробирке №2 – гена *tox* (размером 624 п.н.) (Рисунок 5Б). Детекцию ПЦР-продуктов осуществляли методом горизонтального электрофореза в 2% агарозном геле.

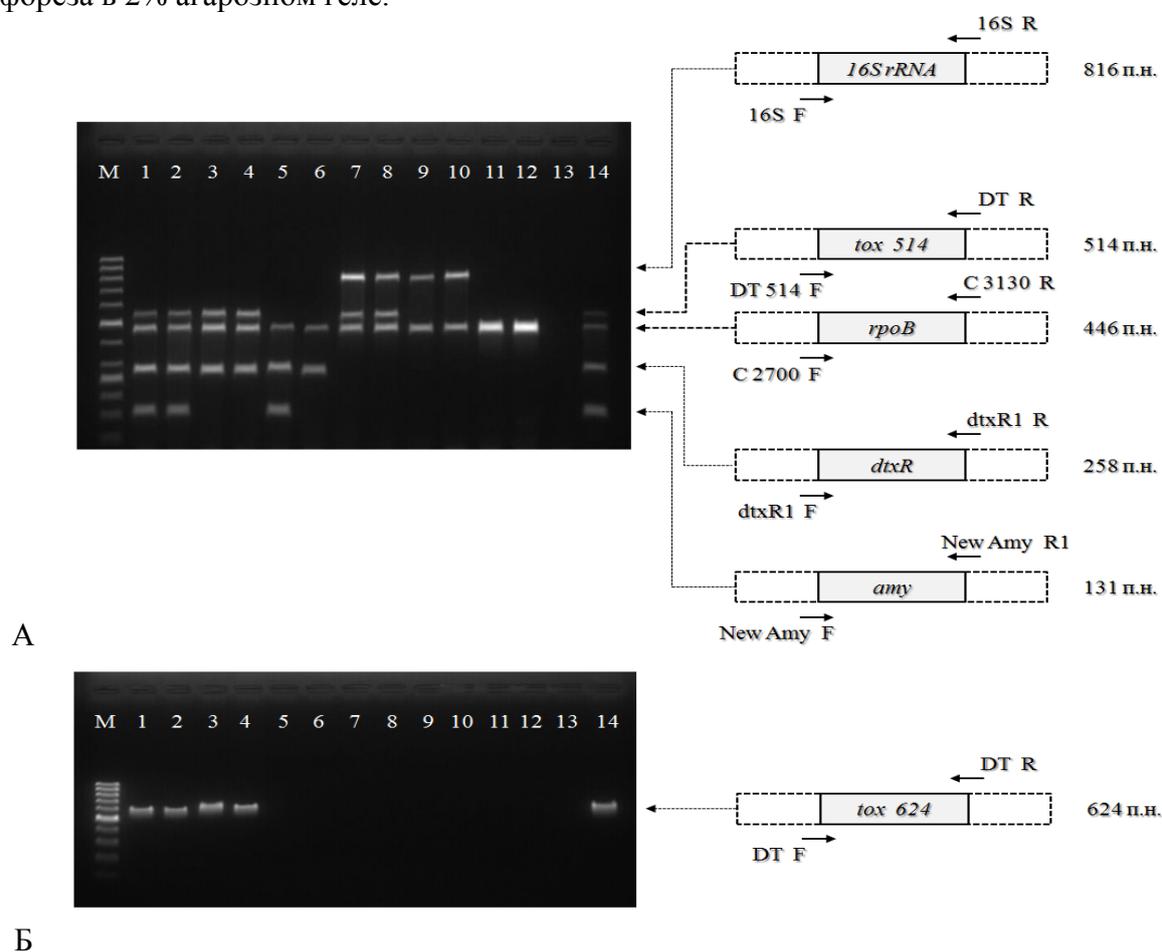


Рисунок 5 – Электрофореграмма продуктов ПЦР в формате мультиплекс в пробирке №1 (А) и пробирке №2 (Б): ДНК 12 штаммов рода *Corynebacterium* («расширенный вариант») (пример)
Примечание: М – маркер молекулярных весов ДНК: А – GeneRuler 50 DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific (фрагмент длиной 50 п.н. на 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 (ПЦР-смесь); 14 – положительный контроль (ДНК токсигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis* №665)

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, содержащих делецию или мобильный генетический IS-1 элемент 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 с выделенными чистыми культурами микроорганизмов, и он может быть использован в рамках мониторинга за возбудителем в системе эпиднадзора за дифтерийной инфекцией.

Для применения ПЦР-мультиплекс 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.

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.) (Рисунок 6). 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: 95°C – 5 мин., 94°C – 30 сек., 58°C – 30 сек., 72°C – 30 сек. (30 циклов), 72°C – 5 мин.

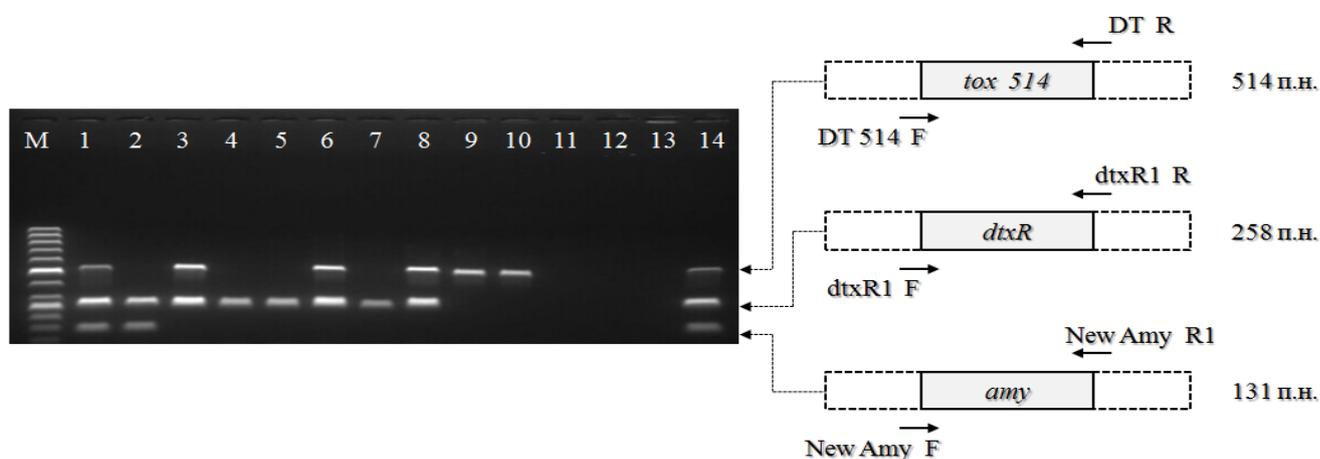


Рисунок 6 – Электрофореграмма продуктов ПЦР в формате мультиплекс на I этапе: ДНК 8 штаммов *C.diphtheriae* и 4 штаммов *C.ulcerans* («сокращенный вариант») (пример)

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*, содержащих делецию нуклеотида G в позиции 55 в гене *tox*; 6 – ДНК НТТН-штамма *C.diphtheriae*, содержащего мобильный генетический IS-1 элемент в гене *tox*; 8 – ДНК НТТН-штамма *C.diphtheriae*, 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.) (Рисунок 7). 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. На II этапе 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 Tox- 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.

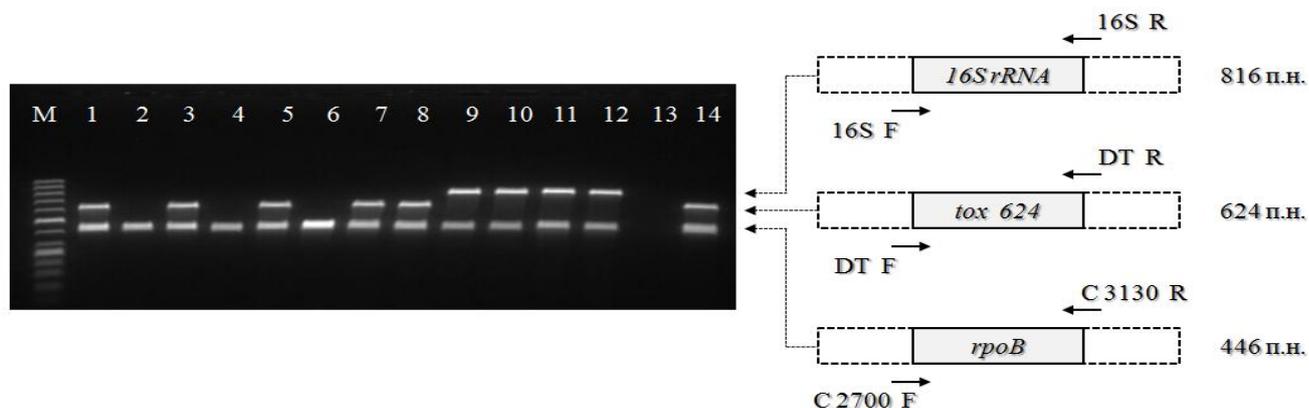


Рисунок 7 – Электрофореграмма продуктов ПЦР в формате мультиплекс на II этапе: ДНК 8 штаммов *C.diphtheriae* и 4 штаммов *C.ulcerans* («сокращенный вариант») (пример)

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*, содержащих делецию нуклеотида G в позиции 55 в гене *tox*; 6 – ДНК НТТН-штамма *C.diphtheriae*, содержащего мобильный генетический IS-1 элемент в гене *tox*; 8 – ДНК НТТН-штамма *C.diphtheriae*, 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)

Разработанный способ для выявления ДНК возбудителя дифтерии методом ПЦР в формате мультиплекс в «расширенном» и «сокращенном» вариантах апробирован на типовых коллекционных штаммах *C.diphtheriae* и на штаммах *C.diphtheriae*, выделенных из клинического материала от пациентов с подозрением на дифтерию. Изучено 50 токсигенных и 130 нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* биоваров *gravis* и *mitis*, а также 15 НТТН-штаммов *C.diphtheriae*. 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 с IS-2 элементом в гене *tox* – как токсигенные.

Оценка аналитической специфичности двух вариантов проведена на свежесыведенных и типовых коллекционных штаммах представителей рода *Corynebacterium* и микроорганизмах других родов. Выявлено, что во всех образцах, содержащих ДНК штаммов представителей рода *Corynebacterium*, положительные сигналы регистрировали только по фрагменту гена *rpoB* (446 п.н.); при тестировании ДНК штаммов микроорганизмов других родов, положительные сигналы отсутствовали, т.е. разработанные варианты ПЦР-мультиплекс обладают 100% аналитической специфичностью.

Результаты апробации метода генодиагностики на иммитантах клинических образцов

Аналитическая чувствительность «сокращенного варианта» ПЦР в формате мультиплекс при использовании коммерческого набора «АмплиПрайм® РИБО-преп» на этапе экстракции ДНК из

изучаемого субстрата (штаммы) составила 5×10^3 ГЭ/мл. При сопоставлении с результатами бактериологического исследования истинное значение аналитической чувствительности соответствовало $2,3 \times 10^3$ ГЭ/мл.

Апробацию разработанного способа на иммитантах клинических образцов осуществляли в модельных экспериментах в лабораторных условиях. Исследования показали, что аналитическая чувствительность на иммитантах составила 5×10^3 ГЭ/мл. При сопоставлении с результатами бактериологического исследования истинное значение аналитической чувствительности соответствовало $2,3 \times 10^3$ ГЭ/мл.

Учитывая данные литературы о возможной этиологической роли нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* в развитии ЛОР-патологии (Efstratiou A. et al., 1998; Nhan T.X. et al., 2012), разработанный способ также был апробирован на 79 образцах клинического материала (2 тампона), полученного от пациентов с различными формами хронического тонзиллита и патологией полости носа. С первого тампона производили смыв и выделение ДНК, а со второго – бактериологическое исследование с идентификацией колоний с помощью MALDI-TOF MS и секвенирования генов *proB* и *16SrRNA*. Установлено, что при использовании разработанного «сокращенного варианта» ПЦР-мультиплекс в 47 пробах регистрировались положительные сигналы только по фрагменту гена *proB* (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) также были идентифицированы штаммы микроорганизмов рода *Corynebacterium*.

Следовательно, разработан способ идентификации токсигенных штаммов *C.diphtheriae* биоваров *gravis* и *mitis* и *C.ulcerans* методом ПЦР в формате мультиплекс с постановкой в два этапа и электрофоретической детекцией продуктов амплификации.

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 неустановленным 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 одновременно дифференцировать ДНК токсигенных и нетоксигенных *C.diphtheriae* двух биоваров, НТТН-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 НГТН-штаммы *C.diphtheriae*, содержащие мобильный генетический IS-1 элемент в гене *tox*.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

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.

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

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.

Обоснована целесообразность подготовки методических рекомендаций по применению молекулярно-генетических методов в лабораторной диагностике дифтерийной инфекции.

Необходимы дальнейшие исследования по оптимизации всех разработанных способов на этапе детекции с целью исключения возможности контаминации продуктами амплификации.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Пименова, А.С.** Применение ускоренного молекулярно-генетического метода лабораторной диагностики при обследовании больных с подозрением на коклюш / **А.С. Пименова, О.Ю. Борисова, М.С. Петрова, О.П. Попова, В.А. Алешкин** // Диагностика и профилактика инфекционных болезней: материалы науч.-практ. конф. (Новосибирск, 26-28 сентября 2013 года). - Новосибирск: Издательство «АРЕАЛ», 2013. - С. 150-151.
2. **Пименова, А.С.** Молекулярно-генетический метод лабораторной диагностики коклюша / **А.С. Пименова, И.А. Чагина, О.Ю. Борисова, М.С. Петрова, О.П. Попова, Е.Н. Абрамова** // Актуальные вопросы инфекционной патологии и вакцинопрофилактики: материалы XII Конгресса детских инфекционистов России (Москва, 11-13 декабря 2013 года). - М., 2013. - С. 54.
3. **Борисова, О.Ю.** Разработка метода мультиплексной полимеразной цепной реакции для идентификации возбудителя дифтерийной инфекции / **О.Ю. Борисова, А.С. Пименова, Н.В. Воложанцев, В.А. Баннов, В.А. Алешкин** // 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. 315-316.
4. **Борисова, О.Ю.** Микробный состав микрофлоры ротоглотки у больных с тонзиллярной патологией / **О.Ю. Борисова, В.А. Алешкин, А.С. Пименова, А.И. Крюков, Н.Л. Кунельская, А.В. Гуров, Г.Б. Шадрин, А.С. Товмасын, Б.А. Ефимов, Л.И. Кафарская** // **Инфекция и иммунитет. - 2015. - Т. 5, № 3. - С. 225-232.**
5. **Пименова, А.С.** Состояние лабораторной диагностики коклюша и мониторинг возбудителя на территории РФ / **А.С. Пименова, О.Ю. Борисова, Н.Т. Гадуа, М.С. Петрова, О.П. Попова, Т.А. Скирда, А.П. Шепелин, Я.В. Подкопаев, Е.Е. Донских, Л.И. Кафарская, В.А. Алешкин** // **Инфекция и иммунитет. - 2016. - Т. 6, № 3. - С. 283.**
6. **Грачева, Н.М.** Коклюш (клиника, диагностика, лечение) / **Н.М. Грачева, А.В. Девяткин, М.С. Петрова, О.Ю. Борисова, Т.А. Скирда, Л.И. Новикова, И.С. Воронова, Н.Т. Гадуа, А.С. Пименова, Е.И. Келли, Е.Н. Абрамова, С.В. Бунин** // Поликлиника. - 2016. - № 2-1. - С. 13-25.
7. **Пименова, А.С.** Эффективность применения молекулярно-генетической диагностики при обследовании очагов коклюшной инфекции / **А.С. Пименова, О.Ю. Борисова, О.В. Цвиркун, А.А. Басов, В.А. Алешкин, С.С. Афанасьев, Е.Е. Донских, А.П. Пикина, Л.И. Кафарская, М.С. Афанасьев, А.В. Караулов** // **Инфекция и иммунитет. - 2017. - Т. 7, № 2. -**

С. 162-170.

8. **Пименова, А.С.** Применение изотермальной амплификации в лабораторной диагностике дифтерийной инфекции / **А.С. Пименова, О.Ю. Борисова, А.В. Чаплин, Л.И. Кафарская, С.С. Афанасьев, В.А. Алешкин, А.В. Алешкин, М.С. Афанасьев, А.В. Караулов** // Проблемы медицинской микологии. - 2017. - Т. 19, № 2. - С. 117-118.
9. **Борисова, О.Ю.** Ускоренный способ генодиагностики дифтерии на основе изотермальной амплификации для выявления ДНК возбудителя / **О.Ю. Борисова, А.С. Пименова, А.В. Чаплин, Л.И. Кафарская, С.С. Афанасьев, В.А. Алешкин, А.В. Алешкин, М.С. Афанасьев, А.В. Караулов** // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2017. - № 5. - С. 24-32.

Изобретения

10. Патент 2542396 Российская Федерация, МПК G 01 N 33/569. Способ и набор для ускоренной лабораторной диагностики коклюшной инфекции / **О.Ю. Борисова, А.С. Пименова, А.В. Алешкин, М.С. Петрова, В.А. Алешкин**; заявитель и патентообладатель **ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора**. - № 2013149234/15; заявл. 06.11.2013; опубл. 20.02.2015, Бюл. № 5. - 8 с.
11. Патент 2623149 Российская Федерация, МПК G 01 N 33/50. Способ и набор для диагностики дифтерии с верификацией токсигенных штаммов возбудителя / **О.Ю. Борисова, А.С. Пименова, А.В. Чаплин, В.А. Алешкин, С.С. Афанасьев, Л.И. Кафарская, М.С. Афанасьев**; заявитель и патентообладатель **ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора**. - № 2016146369; заявл. 25.11.2016; опубл. 22.06.2017, Бюл. № 18. - 11 с.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГЭ	—	геном-эквивалент
ИФА	—	иммуноферментный анализ
КОЕ	—	колониеобразующая единица
КРС	—	крупный рогатый скот
КТ	—	коклюшный токсин
м.к.	—	микробная клетка
НТТН	—	нетоксигенные токснесущие штаммы
п.н.	—	пара нуклеотидов
ПЦР	—	полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ	—	ПЦР в режиме реального времени
РНГА	—	реакция непрямой гемагглютинации
ФГА	—	филаментозный гемагглютинин
<i>16SrRNA</i>	—	ген, кодирующий рибосомальную РНК
<i>amy</i>	—	ген, кодирующий фермент амилазу
<i>dtxR</i>	—	ген, кодирующий DtxR белок
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
<i>rpoB</i>	—	ген, кодирующий β -субъединицу РНК-полимеразы
<i>tox</i>	—	ген, кодирующий дифтерийный токсин