

18. Sambri V., Aldini R., Massaria F. et al. Uptake and killing of Lyme disease and relapsing fever borreliae in the perfused rat liver and by isolated Kupffer cells. *Infect. Immun.* 1996, 64 (5): 1858-1861.
19. Sarkisyan D.S., Platonov A.E., Karan L.S. et al. Probability of spirochete *Borrelia miyamotoi* transmission from ticks to humans. *Emerg. Infect. Dis.* 2015, 21 (12): 2273-2274.
20. Suhonen J., Hartiala K., Tuominen-Gustafsson H., Viljanen M.K. *Borrelia burgdorferi*-induced oxidative burst, calcium mobilization, and phagocytosis of human neutrophils are complement dependent. *J. Infect. Dis.* 2000, 181 (1): 195-202.
21. Wagemakers A., Koetsveld J., Narasimhan S. et al. Variable major proteins as targets for specific antibodies against *Borrelia miyamotoi*. *J. Immunol.* 2016, 196 (10): 4185-4195.
22. Woodman M.E., Cooley A.E., Avdiushko R. et al. Roles for phagocytic cells and complement in controlling relapsing fever infection. *J. Leukoc. Biol.* 2009, 86 (3): 727-736.

*Поступила 31.08.17*

Контактная информация: Платонов Александр Евгеньевич, д.б.н., проф.,  
111123, Москва, ул. Новогириевская, 3а, р.т. (495) 974-96-46

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*Е.А.Прокопьева*<sup>1,2</sup>, *К.А.Шаршов*<sup>1</sup>, *А.А.Романовская*<sup>3</sup>,  
*И.А.Соболев*<sup>1</sup>, *О.Г.Курская*<sup>1</sup>, *Е.И.Соловьева*<sup>1,2</sup>, *Л.В.Шестопалова*<sup>2</sup>,  
*А.В.Зайковская*<sup>4</sup>, *А.Ю.Алексеев*<sup>1</sup>, *А.М.Шестопалов*<sup>1</sup>

## **СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПАТОГЕННОСТИ ВИРУСОВ ГРИППА А(Н5N1) И А(Н1N1)pdm09 У ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ**

<sup>1</sup>НИИ экспериментальной и клинической медицины, Новосибирск; <sup>2</sup>Новосибирский национальный исследовательский государственный университет; <sup>3</sup>Университет Хельсинки, Финляндия; <sup>4</sup>ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», Новосибирск

*Цель.* Проведено экспериментальное инфицирование лабораторных мышей линии BALB/c высокопатогенным вирусом гриппа птиц А(Н5N1) и пандемическим вирусом гриппа А(Н1N1)pdm09, адаптированного к мышам, с целью сравнения степени патогенности вновь возникших штаммов вируса гриппа с пандемическим потенциалом. *Материалы и методы.* Первую группу мышей линии BALB/c (n=24) инфицировали высокопатогенным вирусом гриппа А(Н5N1) в дозе 5 ЛД<sub>50</sub>, а вторую группу (n=24) инфицировали адаптированным вариантом пандемического вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 в дозе 5 ЛД<sub>50</sub>. Определение ЛД<sub>50</sub> и ТСID<sub>50</sub> выполняли с помощью вирусологических методов. Морфологические изменения во внутренних органах (легкое, головной мозг, печень, почка, селезенка) исследовали методами световой и трансмиссионной электронной микроскопии. *Результаты.* Вирусологический анализ показал, что оба штамма являются высоколетальными для мышей. Микроскопическое исследование выявило развитие интерстициальной пневмонии в легких и генерализацию инфекции по внутренним органам. *Заключение.* Обнаружено развитие высоко летального заболевания в виде респираторной пневмонии у обеих групп экспериментально инфицированных мышей линии BALB/c как под воздействием высокопатогенного вируса гриппа птиц А(Н5N1), так и адаптированного пандемического вируса гриппа А(Н1N1)pdm09. При этом отмечается различный механизм развития патологического процесса: под воздействием адаптированного варианта вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 сперва развивается бронхит, который быстро усугубляется развитием альвеолита, в то время как под воздействием высокопатогенного вируса гриппа птиц А(Н5N1) сразу же развивается альвеолит. На 6 сутки после инфицирования регистрируется развитие генерализованной инфекции у мышей обеих экспериментальных групп.

Журн. микробиол., 2018, № 2, С. 38—44

Ключевые слова: адаптированный вирус гриппа А(Н1N1)pdm09, А(Н5N1), генерализованная инфекция

*E.A.Prokopeva*<sup>1,2</sup>, *K.A.Sharshov*<sup>1</sup>, *A.A.Romanovskaya*<sup>3</sup>,  
*I.A.Sobolev*<sup>1</sup>, *O.G.Kurskaya*<sup>1</sup>, *E.I.Soloveva*<sup>1,2</sup>, *L.V.Shestopalova*<sup>2</sup>,  
*A.V.Zaykovskaya*<sup>4</sup>, *A.Yu.Alekseev*<sup>1</sup>, *A.M.Shestopalov*<sup>1</sup>

## COMPARATIVE ANALYSIS OF PATHOGENICITY OF INFLUENZA A(H5N1) AND A(H1N1)pdm09 VIRUSES IN MICE

<sup>1</sup>Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, Novosibirsk; <sup>2</sup>National Research State University, Novosibirsk; <sup>3</sup> University of Helsinki, Finland; <sup>4</sup>State Scientific Centre of Virology and Biotechnology «Vector», Novosibirsk, Russia

*Aim.* Compare the degree of pathogenicity of newly emerging influenza virus strains with pandemic potential by experimental infection of BALB/c mice with highly pathogenic avian influenza A(H5N1) virus and mouse adapted pandemic influenza A(H1N1)pdm09 virus. *Materials and methods.* The first group of BALB/c mice (n=24) were infected with highly pathogenic avian influenza A(H5N1) virus in a dose of 5 LD<sub>50</sub>, and the second group (n=24) were infected with mouse adapted pandemic influenza A(H1N1)pdm09 virus at a dose of 5 LD<sub>50</sub>. Determination of LD<sub>50</sub> and TCID<sub>50</sub> were performed by virological methods. Morphological changes in internal organs (lung, brain, liver, kidney, spleen) were examined by light and transmission electron microscopy. *Results.* Virologic analysis showed that both strains are highly lethal for mice. Microscopic examination revealed the development of interstitial pneumonia in the lungs and generalization of infection in the internal organs. *Conclusion.* In both groups of BALB/c mice experimentally infected with highly pathogenic avian influenza A(H5N1) and mouse adapted pandemic influenza A(H1N1)pdm09 virus were revealed the development of a highly lethal disease in the form of respiratory pneumonia. It is noted, different mechanisms of pathological process: in case of infection with mouse adapted pandemic influenza A(H1N1)pdm09 virus firstly developed bronchitis, which quickly exacerbated by the development of alveolitis, while in case of infection with highly pathogenic avian influenza A(H5N1) immediately developed alveolitis. On the 6th day after infection recorded the development of generalized infection in mice of both experimental groups.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 2, P. 38—44

Key words: mouse-adapted influenza virus A(H1N1)pdm09, A(H5N1), generalized infection

## ВВЕДЕНИЕ

Вновь возникшие вирусы гриппа — высокопатогенный А(Н5N1) и пандемический А(Н1N1)pdm09 — относительно недавно продемонстрировали значительную угрозу здоровью населения во многих странах мира. Благодаря появлению вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 в 2009 году мир стал свидетелем пандемической инфекции XXI века, которая быстро распространилась по всему Земному шару и поразила сотни тысяч людей [10]. Вирус гриппа А(Н1N1)pdm09 обладал высокой степенью трансмиссии, но относительно низкими вирулентными и летальными свойствами по сравнению с вирусом гриппа А(Н5N1). Уровень смертности от высокопатогенного вируса гриппа А(Н5N1) составляет более 60%. Он способен вызывать тяжелые повреждения респираторной системы человека, однако не способен эффективно передаваться от человека к человеку [Kortevag S., Gu J., 2010]. В настоящее время существует опасение, что если высокопатогенный вирус гриппа птиц А(Н5N1) приобретет способность эффективно передаваться от человека к человеку подобно пандемическому вирусу гриппа А(Н1N1)pdm09 и при этом сохранит свои высоковирулентные свойства, то, возможно, новый реассортант будет оказывать весьма значительный эффект на здоровье населения планеты. Между данными субтипами вируса гриппа А при тяжелых случаях заболевания реги-

стрируют сходные симптомы в клинической картине [Korteveg S., Gu J., 2010]. Известно также, что при тяжелой гипертоксической форме гриппа, вызванной субтипом А(Н5N1), наблюдается высокая виремия, обусловленная распространением вирионов по кровеносному руслу с последующим инфицированием различных органов (головной мозг, селезенка, тимус, кишечник, миокард, печень, почки, надпочечники и др.) [3]. По литературным данным, виремия вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 в такие органы, как головной мозг, селезенка, а также в кровь возможна только под воздействием адаптированных вариантов патогена [9].

Возникновение новых штаммов вируса гриппа А будет по-прежнему создавать проблемы для общественного здравоохранения. Детальное понимание механизмов, определяющих патогенность и межвидовую трансмиссию, имеет важное значение как для прогноза появления новых вирусов, так и для создания эффективных средств и способов профилактики и лечебных мероприятий, что необходимо для контроля над высокопатогенными и пандемичными инфекциями.

Цель работы — сравнительное исследование степени патогенности вируса гриппа птиц А(Н5N1) (А/goose/Krasnozerskoye/627/05) и пандемического вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 (штамм А/Russia/01/2009-МА, адаптированный к мышам) по характеру патологических изменений во внутренних органах и летальности в острый период при экспериментальном инфицировании мышей линии BALB/с.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на мышах линий BALB/с 6 — 7-недельного возраста массой тела 20 — 25 г. Животные были разделены на 3 группы. Первую группу животных (n=24) инфицировали вирусом гриппа А(Н5N1) штаммом А/goose/Krasnozerskoye /627/05 (GenBank EF205206.1, EF205199.1, EF205192.1, EF205157.1, EF205178.1, EF205171.1, EF205164.1, и EF205185.1) в дозе 5 ЛД<sub>50</sub> в объеме 50 мкл инфицирующей жидкости. Вторую группу животных (n=24) инфицировали вирусом гриппа А(Н1N1)pdm09 штаммом А/Russia/01/2009-МА, адаптированным к мышам (GenBank HQ661364 — HQ661371) [2]) в дозе 5 ЛД<sub>50</sub> в объеме 50 мкл инфицирующей жидкости. Третья группа служила контролем и была представлена 3 интактными мышами, которые интраназально получали фосфатно-солевой буфер (ФСБ) (рН 7.2) в объеме 50 мкл. Животных содержали в стандартных условиях. Ежедневно определяли вес животных.

На 1, 3, 6 и 10 сутки после заражения животных выводили из эксперимента путём дислокации шейных позвонков. Быстро извлеченные внутренние органы (лёгкое, головной мозг, печень, почка, селезенка) фиксировали в 4 % растворе формалина, затем обезвоживали по стандартной методике и заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 4 — 5 мкм получали с помощью ротационного микротомы НМ 340Е (Carl Zeiss, Германия), окрашивали гематоксилином и эозином. Светооптическое исследование и микрофотосъемку проводили на микроскопе Axioskop 40 (Carl Zeiss, Германия).

Для проведения исследования с помощью трансмиссионной электронной микроскопии были взяты образцы лёгких на 1, 3 сутки после заражения животных, которые фиксировались в 2,5% растворе глутарового альдегида на фосфатном буфере (рН 7,4) в течение 4 ч при температуре 4°С, дофиксировали в 1% растворе четырёхоксида осмия, обезвоживали в спирте возрастающей концентрации (50°, 70°, 96°, абсолютный), смеси спирта и ацетона и заверша-

ли проводку в ацетоне. Образцы лёгких заливали в смесь аральдита-эпона (1:6) с добавлением катализатора DMP-30 и полимеризовали их при 60°С. Ультратонкие срезы готовили на ультрамикротоме UC-6 (Leica, Германия), контрастировали насыщенным раствором уранилацетата и раствором Рейнгольда. Образцы исследовали под электронным микроскопом Libra 120 (Carl Zeiss, Германия) при ускоряющем напряжении 120 кВт.

Определение наличия вируса гриппа А субтипа А(Н5N1) и субтипа А(Н1N1) pdm09 в лёгких проводили путём инфицирования культуры клеток MDCK. Значение 50% тканевой цитопатической инфекционной дозы (TCID<sub>50</sub>) рассчитывали по методу Рида-Менча и выражали как среднее  $\lg\text{TCID}_{50} \pm \text{SE}$  [9].

Все работы с животными проводили в соответствии с протоколом исследования, утверждённым биоэтическим комитетом «Вектор» в условиях вивария ГНЦ ВБ «Вектор» с уровнем биологической безопасности BSL2.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Клинические признаки заболевания гриппом у мышей линий BALB/c, инфицированных высокопатогенным вирусом гриппа птиц штаммом A/goose/Krasnozerskoye/627/05, а также у мышей, инфицированных адаптированным вариантом пандемического вируса гриппа штаммом A/Russia/01/2009-MA, были отмечены уже в 1 сутки и проявлялись конъюнктивитами, снижением физической активности, снижением массы тела, ухудшением качества шерсти, одышкой, а на 10 сутки в обеих экспериментальных группах летальность составляла 50%. Результаты вирусологического анализа показали, что у мышей первой экспериментальной группы наибольший титр вируса в лёгком отмечали с 3 по 10 сутки, а во второй группе — с 1 по 6 сутки после инфицирования (рис. 1).

Морфологическое исследование лёгких мышей выявило в 1 сутки полнокровие капилляров в обеих группах, однако увеличение секреции муцин-продуцирующих клеток бронхиального эпителия отмечали только под воздействием штамма A/Russia/01/2009-MA. С 3 по 6 сутки в обеих группах отмечали десквамацию эпителия средних и мелких бронхов, активную трансэпителиальную миграцию лимфоцитов, активированных макрофагов, а также гранулоцитоз, гемолиз эритроцитов в мелких кровеносных сосудах, встречались явления микротромбоза и обнаруживались признаки ДВС-синдрома (резкое полнокровие, сосудистый отёк, кровоизлияния в альвеолы, образование фибриновых масс и геморрагии). В первой группе животных отмечали эхиноцитоз эритроцитов, а во второй — сладж эритроцитов. К концу первой недели наблюдений в обеих группах отмечали развитие интерстициальной пневмонии, которая к 10 суткам приобретала характер многоочаговости.

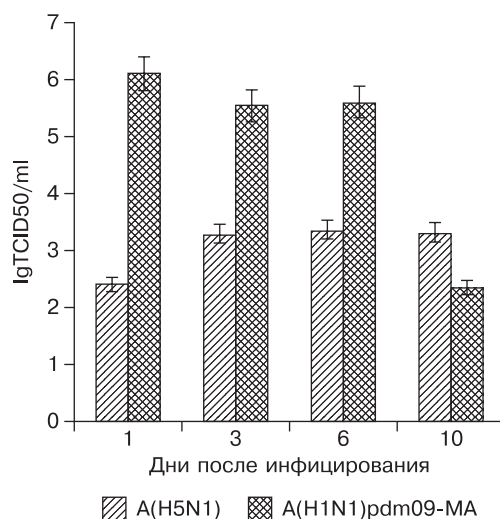
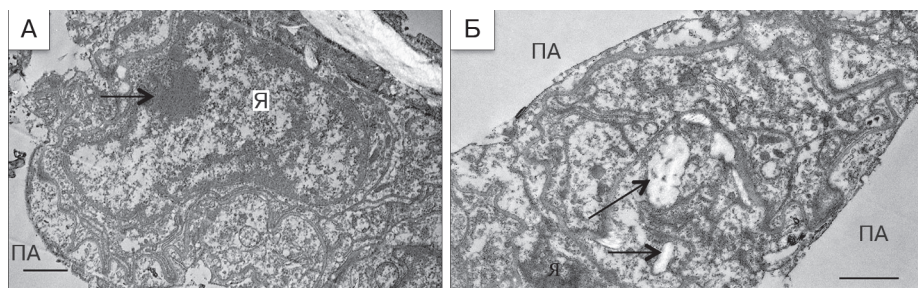


Рис. 1. Величина титров вируса в лёгких мышей, инфицированных высокопатогенным вирусом гриппа А(Н5N1) и адаптированным вариантом пандемического вируса гриппа А(Н1N1) pdm09.



**Рис. 2.** Изменения ультраструктур клеток лёгких мышей линии BALB/с, инфицированных вирусом гриппа А(Н5N1).

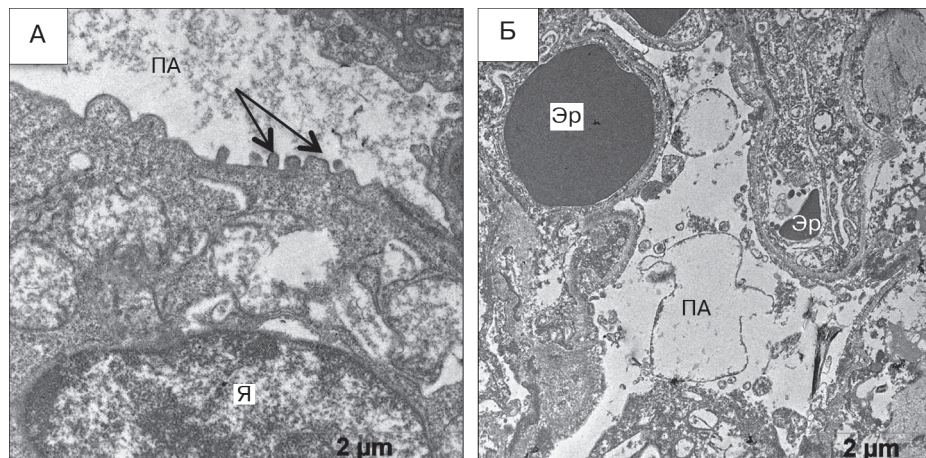
Примечание: А — на 1 сутки видны глыбки гетерохроматина на периферии ядра (стрелка) (ПА — полость альвеолы; Я — ядро); Б — на 3 сутки отмечается вакуолизация клетки альвеолярного эпителия (стрелка). Бар соответствует 1 мкм.

Трансмиссионная электронная микроскопия позволила визуализировать отшнуровку вирусных частиц с поверхности альвеолоцитов 1 типа с первых суток после инфицирования (рис. 2А, 3А). На третьи сутки в лёгких мышей обеих групп деструктивный процесс усугублялся: наблюдалось хлопьевидное содержимое в альвеолярных мешках (рис. 2Б, 3Б).

Светооптическое исследование внутренних органов мышей обеих групп выявило следующие патологические изменения: в головном мозге — нейрональную дегенерацию, очаговые некрозы, кровоизлияния и отеки кровеносных сосудов; в печени — гиперемию центральных и воротных вен; в почках — умеренную гиперемию; в селезёнке — гиперемию и экссудацию белков плазмы крови.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что высокопатогенный вирус гриппа птиц А(Н5N1) способен вызывать тяжёлую гриппозную инфекцию у экспериментальных мышей линии BALB/с без предварительной адаптации, в то время как пандемическому вирусу гриппа А(Н1N1)рdm09 для увеличения патогенных свойств требуется



**Рис. 3.** Изменения ультраструктур клеток лёгких мышей линии BALB/с, инфицированных адаптированным вариантом вируса гриппа А(Н1N1)рdm09.

Примечание: А — на 1 сутки отмечали отпочковывание вирионов с поверхности альвеолоцитов (ПА — полость альвеолы; Я — ядро); Б — на 3 сутки отмечали клеточный детрит в альвеолярной полости, дистрофию альвеолярного эпителия. Бар соответствует 1 мкм.

предварительная адаптация путём пассирования в лёгких экспериментальных животных [2, 11, 12].

Наблюдаемые различия на 1 сутки в лёгких экспериментально инфицированных мышей в виде гиперсекреции муцин-продуцирующих клеток бронхиального эпителия, вероятно, связаны с высоким титром штамма A/Russia/01/2009-MA именно на начальном этапе воспаления, а также с большей тропностью пандемического вируса A(H1N1)pdm09 к бронхиальному эпителию [6, 7]. В период с 3 по 6 сутки было выявлено сходство в развитии патологического процесса на ультраструктурном уровне в лёгких обеих исследуемых групп животных: зарегистрированы деструктивные процессы не только в альвеолоцитах 1 типа, но также и в альвеолоцитах 2 типа. По последним данным, птичий тип рецепторов (SA $\alpha$ 2,3Gal) регистрируют в нижних отделах дыхательных путей респираторной ткани — преимущественно на альвеолоцитах 2 типа [13]. Вероятно, за счёт такого распределения рецепторов высокопатогенный вирус гриппа птиц A(H5N1), который преимущественно распознаёт SA $\alpha$ 2,3Gal рецепторы [8], в первую очередь, инфицирует альвеолоциты 2 типа и макрофаги лёгких, а пандемичный вирус гриппа A(H1N1)pdm09 преимущественно распознаёт человеческий тип (SA $\alpha$ 2,6Gal) рецепторов и чаще вызывает воспаление верхних дыхательных путей [4, 13]. В нашей работе было отмечено, что в случае инфицирования адаптированным вариантом пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 также регистрируются деструктивные процессы в альвеолоцитах 2 типа, что, в свою очередь, говорит о возможном увеличении патогенных свойств у данного субтипа вируса гриппа во время адаптации к мышам за счёт увеличения сродства к SA $\alpha$ 2,3Gal рецепторам.

Явления микротромбозов, зарегистрированных в обеих экспериментальных группах, к 6 суткам, возможно, сопряжены с повреждающим воздействием вирусов гриппа на эндотелий сосудов лёгких, что наиболее часто встречается при инфицировании высокопатогенным вирусом гриппа A(H5N1) [1], а также за счёт изменения реологических свойств крови, проявляющихся в виде сладжа эритроцитов и эхиноцитоза.

При сравнительном анализе структурных изменений во внутренних органах экспериментально инфицированных мышей были обнаружены патологические изменения не только в мозге и в селезенке, как это было описано в литературе ранее [6], но также в печени и почках, что, вероятно, объясняется развитием генерализованной инфекции под воздействием адаптированного варианта пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 подобно высокопатогенному гриппу птиц A(H5N1) [5].

Таким образом, обнаружено, что пандемический вирус гриппа A(H1N1)pdm09 способен вызывать высоко летальное заболевание в виде респираторной пневмонии среди экспериментально инфицированных мышей линии BALB/c аналогично высокопатогенному вирусу гриппа птиц A(H5N1) только после предварительной адаптации к мышам. При этом отмечается различный механизм развития патологического процесса: под воздействием адаптированного варианта вируса гриппа A(H1N1)pdm09 сперва развивается бронхит, который быстро усугубляется развитием альвеолита, в то время как под воздействием высокопатогенного вируса гриппа птиц A(H5N1) сразу же развивается альвеолит. На 6 сутки после инфицирования регистрируется развитие генерализованной инфекции у мышей обеих экспериментальных групп.

*Работа выполнена при поддержке гранта РНФ номер проекта 17-44-07001.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ковнер А.В., Потапова О.В., Шкурупий В.А. Морфофункциональные изменения эндотелиоцитов сосудов легких при гриппе А/Н5N1 А/goose/Krasnoozerskoe/627/05 у мышей. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2012, 154 (10): 472-475.
2. Романовская А.А., Шаршов К.А., Зайковская А.В. Дурьманов А.Г., Шестопалов А.М. Штамм вируса гриппа А/Russia/01/2009-МА субтипа Н1N1 для исследования лечебной и профилактической активности противовирусных препаратов *in vitro* и *in vivo*. Патент на изобретение. RUS 2451072 18.10.2010.
3. Belsler J.A., Szretter K.J., Katz J.M., Tumpey T.M. Use of animal models to understand the pandemic potential of highly pathogenic avian influenza viruses. *Advances in virus research*. 2009, 73: 55-97. doi: 10.1016/S0065-3527(09)73002-7.
4. Connor R.G., Kawaoka Y., Webster R.G., Paulson J.C.I. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology*. 1994, 205(1): 17-23.
5. Garigliany M.M., Habyarimana A., Lambrecht B. et al. Influenza A strain-dependent pathogenesis in fatal H1N1 and H5N1 subtype infections of mice. *Emerging Infectious diseases*. 2010, 16(4): 595-603. doi: 10.3201/eid1604.091061.
6. Ilyushina N.A., Khalenkov A.M., Seiler J.P. et al. Adaptation of pandemic H1N1 influenza viruses in mice. *J. Virology*. 2010, 84 (17): 8607-8616. doi: 10.1128/JVI.00159-10.
7. Ito T., Couceiro J.N., Kelm S. et al. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J. Virol*. 1998, 72 (9): 7367-7373.
8. Kuiken T., Taubenberger J. Pathology of human influenza revisited. *Vaccine*. 2008, 26: D59-D66.
9. Manual on animal influenza diagnosis and surveillance. World Health Organization. 2002.
10. Pandemic (H1N1) 2009—update 102. World Health Organization. [http://www.who.int/csr/don/2010\\_05\\_28/en/index.html](http://www.who.int/csr/don/2010_05_28/en/index.html) (Дата обращения 25.08.2014).
11. Prokopyeva E.A., Romanovskaya A.A., Sharshov K.A. et al. Pathogenicity assessment of A(H1N1)pdm09 and A(H5N1) viruses. *Histology and Histopathology*. 2017, 32: 1057-1063. doi: 10.14670/HH-11-866.
12. Prokopyeva E.A., Sobolev I.A., Prokopyev M.V., Shestopalov A.M. Adaptation of influenza A(H1N1)pdm09 virus in experimental mouse models. *Infection Genetic Evolution*. 2016, 29. pii: S1567-1348(16)30022-3. doi: 10.1016/j.meegid.2016.01.022.
13. Shinya K., Ebina M., Yamada S. et al. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature*. 2006, 440 (7083): 435-436.

*Поступила 05.11.17*

Контактная информация: Прокопьева Елена Александровна,  
630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 2, р.т. (383)333-64-56

---

## АЛГОРИТМ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ CLOSTRIDIUM DIFFICILE-АССОЦИИРОВАННОЙ ДИАРЕИ

Государственный научный центр колопроктологии им. А.Н.Рыжих, Москва

*Цель.* Разработка оптимального алгоритма лабораторной диагностики Clostridium difficile-ассоциированной диареи для достижения максимально достоверных результатов. *Материалы и методы.* В исследование были включены 211 пациентов с клинической картиной C.difficile-ассоциированной диареи. Материалом для исследования служили просветные фекалии. Все образцы исследовались одновременно иммунологическими (определение глутаматдегидрогеназы — ГДГ, токсинов А и В C. difficile иммуноферментным и иммунохроматографическим анализом), бактериологическим и молекулярно-биологическими (полимеразная цепная реакция с использованием системы «GENEexpert rtPCR system», Cepheid, США) методами. *Результаты.* Из 211 образцов просветных фекалий были изолированы 126 штаммов C. difficile. В образцах просветных фекалий, из которых был выделен возбудитель, ГДГ определялась в 54% (68) случаев методом иммунохроматографического анализа (ИХА), и в 11,1% (14) случаев методом иммуноферментного анализа (ИФА). При возрастании степени обсемененности фекалий C. difficile увеличивалась чувствительность иммунологических тестов выявления ГДГ ( $p < 0,05$ ). Начиная со степени обсемененности  $10^7$  КОЕ/г наблюдается резкое увеличение чувствительности обнаружения ГДГ иммуноферментным методом. Использование для диагностики C. difficile-ассоциированной инфекции только иммунологических тестов определения токсинов А и В приведет к ложноотрицательным результатам в 19,8% и 55,6% случаев при присутствии токсина А и в 35,7% и 44,4% случаев при наличии токсина В. *Заключение.* Трехступенчатый алгоритм лабораторной диагностики антибиотикоассоциированной диареи характеризуется высокой воспроизводимостью результатов исследований, чувствительностью и специфичностью. Основан на поэтапном выполнении тестов для детекции токсигенной C. difficile. Использование такого алгоритма диагностики обеспечит своевременную постановку диагноза, локальный микробиологический мониторинг и эпидемиологический надзор за C.difficile-ассоциированной инфекцией.

Журн. микробиол., 2018, № 2, С. 45—53

Ключевые слова: C. difficile-ассоциированная инфекция, глутаматдегидрогеназа, токсин А, токсин В, бинарный токсин, антибиотикоассоциированная диарея, чувствительность, специфичность

М.А.Sukhina, I.V.Obraztsov, V.I.Mikhalevskaya, S.I.Achkasov, A.L.Safin, Yu.A.Shelygin

## ALGORITHM FOR LABORATORY DIAGNOSTICS OF CLOSTRIDIUM DIFFICILE ASSOCIATED DIARRHEA

Ryzhikh State Scientific Centre of Coloproctology, Moscow, Russia

*Aim.* To develop an optimal algorithm for laboratory diagnosis of C. difficile associated diarrhea in context of obtaining the most reliable analysis results. *Materials and methods.* 211 patients with clinically significant C. difficile associated diarrhea participated in the study. Luminal faeces were analysed by immunological (immune chromatographic assay, ICA; ELISA) bacteriological and molecular (GENEexpert rtPCR system, Cepheid, USA) methods. *Results.* We isolated 126 C. difficile strains from 211 samples of luminal faeces. We identified glutamate dehydrogenase (GDH) in 54% of cases ( $n=68$ ) by means of immune ICA, and in 11.1% of cases ( $n=14$ ) by means of ELISA. The increase of bacterial concentration is associated with the growth of sensitivity of GDH detection by immunological tests ( $p < 0.05$ ). We defined a dramatic increase of GDH detection sensitivity starting from  $10^7$  CFU/g concentration. Toxins A and B evaluation by immunological tests only leads to false-negative results in 19,8% (ICA) and 55,6% (ELISA) of toxin A positive