

6. Beran J., Prymula R., Chlibek R. et al. Evaluation of reactogenicity and immunogenicity of two influenza vaccines (vaxigrip and fluarix) in the season 1996-1997. *Cent. Eur. J. Public Health*. 1998, 6(4): 269-273.
7. Beyer W., Palache A., Osterhaus A. Comparison of serology and reactogenicity between influenza subunit vaccines and whole virus or split vaccines: A review and metaanalysis of literature. *Clin Drug Invest*. 1998, 15(1):1-12.
8. Bricout H., Chabanon Al., Souverain A. et al. Passive enhanced safety surveillance for Vaxigrip and Intanza 15 µg in the United Kingdom and Finland during the northern hemisphere influenza season 2015/16. *Euro Surveill*. 2017, 22(18): 1-9.
9. Gessner B.D. et al. Seasonal influenza epidemiology in sub-Saharan Africa: a systematic review. *Lancet Infectious Disease*. 2011, 11:223-235.
10. Vaccines against influenza WHO position paper. November 2012. *Wkly Epidemiol. Rec*. 2012, 87(47):461-76. PMID:23210147.

Поступила 28.02.18

Контактная информация: Фельдблюм Ирина Викторовна, д.м.н., проф,
614000, Пермь, Петропавловская, 26, р.т. (342)218-16-68

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

А.С.Пименова¹, О.Ю.Борисова^{1,2}, М.С.Петрова¹, Е.В.Власов³, И.С.Воронина¹, А.Б.Борисова², С.С.Афанасьев¹, Е.Е.Донских², Л.И.Кафарская², В.А.Алешкин¹, А.В.Алешкин¹, М.С.Афанасьев⁴, А.В. Караулов⁴

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА УСКОРЕННОЙ ГЕНОДИАГНОСТИКИ КОКЛЮША НА ОСНОВЕ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ (LAMP)

¹Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского, ²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова, ³Инфекционная клиническая больница № 1 Департамента здравоохранения города Москвы, ⁴Первый московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова, Москва

Цель. Оптимизация ускоренного способа генодиагностики коклюша на основе изотермической амплификации для выявления ДНК возбудителя. *Материалы и методы.* Исследование проводилось на 35 типовых коллекционных штаммах и 169 штаммах *Bordetella pertussis*, *B.parapertussis*, *B. bronchiseptica*, выделенных в бактериологических лабораториях субъектов РФ. В исследование включено 329 клинических образцов, полученных от больных с подозрением на коклюш и контактных с ними лиц, госпитализированных в ИКБ № 1 ДЗМ. Хромосомную ДНК выделяли стандартным методом кипячения из штаммов, из клинических образцов с помощью коммерческих наборов. Выявление и дифференциацию специфических фрагментов генома возбудителей коклюша, паракоклюша и бронхисептикоза в клиническом материале осуществляли с использованием набора «АмплиСенс® *Bordetella multi-FL*» (ЦНИИЭ, Москва). *Результаты.* Проведена оптимизация ранее предложенного способа и разработан ускоренный метод генодиагностики коклюшной инфекции на основе LAMP с детекцией с помощью электрофореза, а также с помощью интеркалирующего красителя. Разработанный способ генодиагностики позволяет выявлять ДНК *B.pertussis* в течение 4-5 часов от начала исследования в клиническом материале. Аналитическая чувствительность — 10² ГЭ/мл. Оценка валидности показала, что разработанный способ обладает 99,6% чувствительностью и 98,7% специфичностью; прогностическая ценность положительного и отрицательного результата составила 99,6% и 98,7% соответственно; индекс точности (диагностическая эффективность) — 99,4%; отношение правдоподобия положительного и отрицательного результата — 76,6 и 0,004 соответственно. Оценка аналитической надежности в 100% случаев показала сходимость и воспроизводимость методики. *Заключение.* Диагностический тест по выявлению ДНК *B.pertussis* методом LAMP позволит увеличить эффективность лабораторной диагностики коклюшной инфекции.

Журн. мкробиол, 2018, № 5, С. 37—46

Ключевые слова: коклюш, *B.pertussis*, изотермальная амплификация, диагностика

A.S.Pimenova¹, O.Yu.Borisova^{1,2}, M.S.Petrova¹, E.V.Vlasov³, I.S.Voronina¹, A.B.Borisova²,
S.S.Afanasyev¹, E.E.Donskich², L.I.Kafarskaya², V.A.Aleshkin¹, A.V.Aleshkin¹,
M.S.Afanasyev⁴, A.V.Karaulov⁴

OPTIMIZATION OF A METHOD OF ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP) FOR DIAGNOSIS OF WHOOPING COUGH

¹Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology, ²Pirogov Russian National Research Medical University, ³Infectious Diseases Clinical Hospital No. 1 of the Moscow Department of Healthcare, ⁴Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Aim. Optimization of the accelerated whooping cough method of isothermal amplification for DNA *Bordetella pertussis*. *Materials and methods.* The research was conducted on 35 standard collection strains and 169 strains of *Bordetella* allocated in bacteriological laboratories of territorial subjects of the Russian Federation. The research included 329 clinical samples received from patients with whooping cough and the persons, contact with them, hospitalized in IDCH No. 1 DZM. Chromosomal DNA was extracted with a standard method of boiling from strains, from clinical samples by means of commercial sets. Identification of causative agents of whooping cough were performed with use of the АмплиСенс® *Bordetella* multi-FL. *Results.* We performed optimization method of a diagnostics of whooping cough by LAMP with detection by means of an electrophoresis and with naked-eye inspection under normal light is developed. The developed method allows to detect a DNA of *B.pertussis* within 4 — 5 hours in clinical material. The analytical sensitivity was 10² GE/ml. Assessment of validity showed that the developed method possesses 99,6% sensitivity and 98,7% specificity; predictive value positiveness and negative result was 99,6% and 98,7%, respectively; the index of accuracy (diagnostic efficiency) — 99,4%; the likelihood ratio of positive and negative result — 76,6 and 0,004, respectively. Assessment of analytical reliability in 100% of cases showed convergence and reproducibility of a technique. *Conclusion.* Diagnostic test on DNA of *B.pertussis* identification by LAMP method will allow to increase efficiency of laboratory diagnosis of whooping cough.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 5, P. 37—46

Key words: pertussis, *B.pertussis*, isothermal amplification, diagnostics

ВВЕДЕНИЕ

Коклюш является воздушно-капельной бактериальной инфекцией, управляемой средствами массовой иммунизации, введение которой в Российской Федерации с 1959 года привело к значительному улучшению эпидемиологической обстановки [7]. С 1990-х годов в странах с высоким уровнем охвата профилактическими прививками регистрируется подъем заболеваемости коклюшем (<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* [22, 23]. С 2012 года в России заболеваемость коклюшем стабилизировалась на уровне 3,0 — 5,0 на 100 тыс. населения (<http://www.rosпотребнадзор.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 [2]. Кроме того, в последние годы в структуре заболеваемости увеличивается удельный вес стертых и легких форм болезни среди детей старшей возрастной группы и взрослых [1, 9]. Поэтому совершенствование лабораторной диагностики будет способствовать раннему выявлению больных коклюшем и бактерионосителей, в том числе, в эпидемических очагах инфекции.

В нашей стране согласно санитарно-эпидемиологическим правилам (СП 3.1.2.3162-14) «Профилактика коклюша» при диагностике коклюшной инфекции используются три метода — 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. Поэтому разработка альтернативных более простых и надежных методов и тест-систем, направленных на выявление ДНК *B.pertussis*, остается перспективным направлением по улучшению диагностики коклюша, в том числе, и в направлении снижения стоимости самого исследования, что экономически целесообразно для региональных лабораторий с разными системами финансирования.

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 [20, 21]. Этот метод применен и для диагностики коклюша [12, 15, 16]. В 2009 году в МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского на основании этой технологии предложен способ ускоренной генодиагностики коклюша, позволяющий выявить ДНК *B.pertussis* в клиническом материале в течение 9 — 10 часов от начала исследования с эффективностью 84,9% [3]. Вместе с тем, этот способ требует совершенствования в направлении сокращения времени проведения исследования и увеличения диагностической эффективности. Поэтому целью исследования была оптимизация ускоренного способа генодиагностики коклюша на основе изотермической амплификации для выявления ДНК возбудителя.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовано 35 типовых коллекционных штаммов *A.viscosus*, *B.bronchiseptica*, *B.parapertussis*, *B.pertussis*, *C.albicans*, *H.influenzae*, *N.meningitidis*, *K.pneumoniae*, *S.aureus*, *S.epidermidis*, *S.hominis*, *S.mitis*, *S.oralis*, *S.parasanguinis*, *S.pneumoniae*, *S.pyogenes*, *S.salivarius* и 18 штаммов представителей рода *Corynebacterium*, полученных из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур (ГКПМ, Оболенск, Россия) и Государственной коллекции патогенных микроорганизмов НЦЭСМП (Россия); 169 свежевыделенных штаммов *B.pertussis*, *B.parapertussis*, *B. bronchiseptica*, полученных из бактериологических лабораторий ЛПО и ЦГиЭ в субъектах РФ в соответствии с письмом Роспотребнадзора от 19.06.2012 г. № 01/6830-12-32 «Об организации исследований культур возбудителей дифтерии и коклюша». В исследование включено 329 клинических образцов, полученных от больных с подозрением на коклюш и контактных с ними лиц, госпитализированных в Инфекционную клиническую больницу № 1 Департамента здравоохранения города Москвы (ИКБ № 1 ДЗМ). Клинический материал брали двумя сухими стерильными одноразовыми зондами-тампонами (СОРАН, Италия) с задней стенки ротоглотки. Идентификацию микроорганизмов видов *B.pertussis*, *B.parapertussis* и *B.bronchiseptica* проводили согласно методическим рекомендациям (МР 3.1.2.0072-13) «Диагностика коклюша и паракоклюша». Выделение хромосомной ДНК из бактерий проводили кипячением (Маниатис Т., 1984). Выделение ДНК из клинического материала осуществляли с помощью коммерческих наборов «ДНК-сорб-В» (ЦНИИЭ, Москва) (2013 г.) или «АмплиПрайм® ДНК-сорб-АМ» (ООО «НекстБио», Москва) (2014 — 2016 гг.). Детекцию продуктов амплификации осуществляли методом горизонтального электрофореза в агарозном геле (Lonza, США) в 50x TAE-буфере (Thermo Fisher Scientific, Литва) в камере SUB-CELL® GT (Bio-Rad Laboratories, США). В качестве маркера молекулярных масс использовали ДНК GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Литва). Электрофорез проводили при напряжении 160 V в течение 60 мин. Продукты амплификации ви-

зуализировали с помощью гельдокументирующей системы Quantum-ST4-1100/26M (Vilber Lourmat, Франция). Выявление и дифференциацию специфических фрагментов генома возбудителей коклюша, паракоклюша и бронхисептикоза в клиническом материале осуществляли с использованием набора реагентов «АмплиСенс® Bordetella multi-FL» (ЦНИИЭ, Москва). Амплификацию проводили с помощью прибора Rotor-Gene Q 5 plex HRM (QIAGEN GmbH, Германия). Статистическую обработку данных осуществляли с помощью пакета программ SPSS 19.0. Для признаков, имеющих распределение, отличное от нормального, данные представлены в виде медианы. Согласованность мнений двух испытателей, осуществляющих исследование, относительно наличия/отсутствия изучаемого качественного критерия оценивали по каппе Кохена [8, 10]. Расчет показателей, характеризующих валидность диагностического теста проводили по стандартным формулам [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Нами проведена оптимизация ранее предложенного способа [3] и разработан ускоренный метод генодиагностики коклюшной инфекции на основе изотермической амплификации (LAMP), который включает проведение следующих этапов: 1 — взятие клинического материала с задней стенки ротоглотки; 2 — пробоподготовка образца; 3 — выделение ДНК сорбционным методом; 4 — проведение амплификации при изотермических условиях; 5 — детекция продуктов амплификации методом горизонтального электрофореза в агарозном геле. Взятие клинического материала производили в соответствии с МР 3.1.2.0072-13. Рабочие части зондов помещали в одну пробирку типа эппендорф с 0,5 мл физиологического раствора. Пробоподготовку образца проводили путем смыва клинического материала с тампона в физиологический раствор. Выделение ДНК осуществляли сорбционным методом с помощью коммерческих наборов реагентов в соответствии с инструкцией по применению. Приготовление реакционной смеси проводили путем смешивания двух смесей: смеси № 1 и смеси № 2. Состав смеси № 1: 10х реакционный буфер для ПЦР, 2 мМ смесь нуклеотидов (dNTP), 25 мМ MgCl₂, раствор Betaine и три пары праймеров [15]. Состав смеси № 2: рабочее разведение (1:9) Bst ДНК-полимеразы в буферном растворе. В смесь № 1 вносили пробы ДНК (по 8 мкл) и минеральное масло. Затем прогревали в течение 5 мин. и охлаждали в течение 1 мин. После чего в каждую пробу вносили смесь № 2, перемешивали на вортексе и осаждали капли кратковременным центрифугированием. В качестве положительного контроля амплификации использовали ДНК штамма *V.pertussis* № 143. Амплификацию в изотермическом режиме проводили или в программируемом твердотельном термостате «Гном», или в амплификаторе «Терцик» при следующих условиях: 65 °С — 60 мин., 80 °С — 2 мин. Детекцию продуктов амплификации осуществляли методом горизонтального электрофореза в 50х ТАЕ-буфере в 2 % агарозном геле при 160 В в течение 40 мин. Дифференциацию проводили путем сравнения электрофоретической подвижности полученных фрагментов ДНК с подвижностью контрольного образца ДНК штамма *V. pertussis*. Если у исследуемого ДНК-образца имелись специфические светящиеся профили, аналогичные профилю контрольного штамма *V.pertussis* № 143, то данные образцы регистрировались как содержащие ДНК штамма *V.pertussis* (рис. А, Б).

С целью сокращения времени исследования нами проведена апробация методики детекции продуктов амплификации с помощью интеркалирующего красителя на ограниченном количестве проб клинического материала от больных с диагнозом «Коклюш». Для этого в каждую пробу вносили по 10 мкл 10 000х SYBR Green I. Результаты амплификации оценивали визуально по изменению цвета содержимого пробирки. Положительными считали те пробы, в которых регистрировали светло-зеленое окрашивание, отрицательные образцы имели светло-оранжевое окрашивание.

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

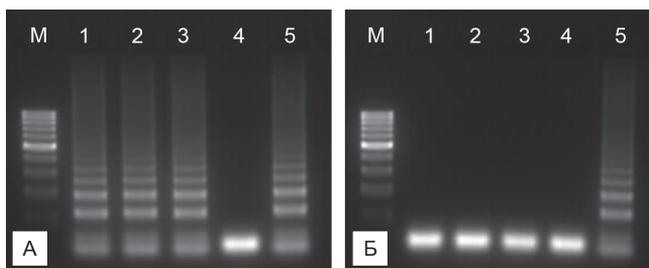
С целью оценки аналитической чувствительности разработанного способа готовили три линейки последовательных разведений бактериальной культуры типового контрольного штамма *V.pertussis* № 143: 5×10^9 — 10^1 м.к. в 1 мл. Далее из 100 мкл каждого разведения суспензии выделяли ДНК. Параллельно с этим для определения общего количества жизнеспособных микроорганизмов в 1 мл бактериальной взвеси из каждого разведения производили высев 100 мкл на чашки Петри с бордетеллагаром. Засеянные чашки инкубировали при 37 °С. 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 разработанного способа генодиагностики возбудителя коклюша проведена на типовых коллекционных и свежевыделенных штаммах представителей рода *Bordetella* и микроорганизмов других родов. Установлено, что положительные сигналы отмечали только в образцах, содержащих ДНК *V.pertussis*, в то время как во всех других изученных образцах ДНК положительные сигналы не регистрировали.

Аналитическую надежность диагностического теста оценивали также по частоте совпадения обнаружения ДНК *V.pertussis* в многочисленных пробах одного и того же однородного образца, определяя таким образом сходимость и воспроизводимость методики. Однородный образец (как положительный, так и отрицательный) готовили в лабораторных условиях: в 1 мл 0,9 % раствора хлорида натрия (рН 7,0) суспендировали полную микробиологическую петлю бактериальной культуры. В качестве положительного контрольного образца использовали типовой штамм *V.pertussis* № 688, в качестве отрицательного — *S.aureus* Wood-46. Затем из положительного контрольного материала готовили 10 одинаковых проб, содержащих по 100 мкл бактериальной взвеси. Аналогичная процедура была выполнена и с отрицательным контрольным образцом. На этапе проведения амплификации каждую пробу тестировали в трех повторах.

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

Воспроизводимость методики внутри одной лаборатории определяли на многочисленных пробах одного и того же однородного образца, тестирование которых проводили одним и тем же методом разными операторами с использованием разных партий реактивов и различного оборудования в различные рабочие дни. Проведена оценка согласия между независимыми результатами исследований двух испытателей. При этом между участниками эксперимента наблюдалось полное согласие от-



Выявление ДНК *V.pertussis* методом LAMP: детекция продуктов амплификации методом горизонтального электрофореза в агарозном геле (А, Б).

М — маркер молекулярных масс ДНК GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific.

А: 1—3 — ДНК штаммов *V.pertussis*; 4 — отрицательный контроль (ПЦР-смесь); 5 — положительный контроль (ДНК штамма *V.pertussis* № 143). Б: 1, 2 — ДНК штаммов *V.parapertussis*; 3 — ДНК штамма *V.bronchiseptica*; 4 — отрицательный контроль (ПЦР-смесь); 5 — положительный контроль (ДНК штамма *V.pertussis* № 143).

носителем правильности интерпретации результатов при визуализации фрагментов амплифицированной ДНК в агарозном геле (критерий каппа Кохена, $K = 1$). Таким образом, двумя исследователями были получены идентичные результаты.

В исследование было включено 329 пациентов в возрасте от 27 дней до 40 лет, госпитализированных в ИКБ № 1 ДЗМ. Клинический диагноз устанавливался врачами-инфекционистами в соответствии с принятыми протоколами ведения больных. Обследование пациентов проведено с использованием двух методов: метода сравнения и разработанного метода. В качестве метода сравнения использовали коммерческий диагностический тест по выявлению специфических фрагментов генома *V.pertussis* методом ПЦР-РВ. В соответствии с эпидемиологическим анамнезом, анамнезом заболевания, клинической картиной болезни и результатами лабораторного обследования, проведенного методом сравнения, пациенты были разделены на две группы.

В I группу включено 252 больных в возрасте от 0 месяцев до 30 лет, у которых при постановке клинического диагноза в качестве основного заболевания фигурировал диагноз «коклюш» и при использовании метода сравнения в образцах клинического материала была обнаружена ДНК *V.pertussis*. Возраст пациентов I группы: от 0 до 12 месяцев — 165 (65,5%) человек, от 1 года до 7 лет — 68 (27%) человек, от 7 до 18 лет — 12 (4,7%) человек, 18 лет и старше — 7 (2,8%) человек, то есть основную группу составили дети в возрасте от 0 до 12 месяцев (медиана 4 месяца). Тяжесть и течение коклюша оценивали согласно общепринятой классификации, в соответствии с которой у 41 (16,3%) больного коклюш протекал в легкой, у 186 (73,8%) — в среднетяжелой, у 24 (9,5%) — в тяжелой, у 1 (0,4%) — в стертой формах. Следует отметить тот факт, что степень тяжести течения коклюша зависела от возраста больного. Тяжелые формы были только у детей в возрасте 0 — 12 месяцев, в то время как взрослые переболели коклюшем исключительно в легкой форме, а дети ясельного, дошкольного и школьного возрастов — в меньшей степени в стертой или легкой (17 пациентов; 6,8%) и в большей степени в среднетяжелой (63 пациента; 25%) формах.

Обследование пациентов I группы проведено с диагностической целью на разных сроках от начала заболевания: 12 (4,8%) человек — на 1, 72 (28,6%) — на 2, 96 (38,1%) — на 3, 48 (19%) — на 4, 16 (6,3%) — на 5, 4 (1,6%) — на 6, 3 (1,2%) — на 7, 1 (0,4%) — на 8 неделях болезни, то есть большинство (216; 85,7%) больных было обследовано на 2 — 4 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 *V.pertussis* не была выявлена. Возраст пациентов II группы: от 1 до 12 месяцев — 37 (48%) человек, от 1 года до 7 лет — 26 (33,8%) человек, от 7 до 18 лет — 4 (5,2%) человека, 18 лет и старше — 10 (13%) человек.

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

Валидность разработанного способа по выявлению ДНК *V.pertussis* в биологическом материале методом LAMP оценивали в соответствии с [4, 8, 10] по следующим критериям: чувствительность и специфичность, прогностическая ценность положительного результата и прогностическая ценность отрицательного результата, индекс точности (диагностическая эффективность), отношение правдоподобия положительного результата и отношение правдоподобия отрицательного результата. Вышеперечисленные критерии рассчитывали по стандартным формулам с использованием полученных данных при распространенности коклюша среди пациентов изученной выборки в 76,6%. Результаты оценки валидности разработанного способа представлены в табл.

Результаты оценки валидности разработанного способа

Критерий (Гринхалх Т., 2006)	Величина критерия	Характеристика (Гринхалх Т., 2006)
Чувствительность	99,6 %	Способность теста определять наличие данного заболевания у пациента
Специфичность	98,7 %	Способность теста определять отсутствие данного заболевания у пациента
Прогностическая ценность положительного результата, ПЦ ⁺	99,6 %	Вероятность того, что при положительном результате теста пациент на данный момент действительно болен
Прогностическая ценность отрицательного результата, ПЦ ⁻	98,7 %	Вероятность того, что при отрицательном результате теста пациент на данный момент действительно здоров
Индекс точности, ИТ (диагностическая эффективность)	99,4 %	Доля истинных результатов (истинно положительных и истинно отрицательных) по отношению ко всем
Отношение правдоподобия положительного результата, ОП ⁺	76,6	Насколько более вероятен положительный результат у больного по сравнению с вероятностью положительного результата у здорового
Отношение правдоподобия отрицательного результата, ОП ⁻	0,004	Насколько более вероятен отрицательный результат у больного по сравнению с вероятностью отрицательного результата у здорового

ОБСУЖДЕНИЕ

Молекулярно-генетические методы лабораторной диагностики коклюша стали применяться в различных странах мира с конца 1980-х годов [13, 14, 17 — 19, 22 — 24]. По данным многочисленных источников, чувствительность метода ПЦР при обнаружении ДНК *B.pertussis* в исследуемом материале варьирует от 73 % до 100 % [13, 14, 17, 18]. При этом унифицированной ПЦР тест-системы для диагностики коклюша на сегодняшний день не существует, так как различия в выборе генов-мишеней и систем для их детектирования препятствуют стандартизации метода и созданию единой концепции диагностики коклюша с помощью амплификационных технологий. Тем не менее, применение методов генодиагностики обеспечивает быструю и раннюю диагностику коклюша.

В последнее десятилетие разработаны разные варианты молекулярно-генетических методов для идентификации возбудителя коклюша, основанные на выявлении различных мишеней в геноме *B. pertussis*: гена коклюшного токсина, порина, аденилатциклазного токсина, повторяющихся последовательностей хромосомы [13, 14, 17—19, 22—24]. Опыт применения ПЦР для идентификации возбудителей бордетеллез показал, что наиболее точные результаты получают при использовании праймеров, расположенных в промоторной зоне коклюшного токсина, повторяющихся последовательностях IS481 и IS1001 или гене *суаА*. На данный момент многие исследователи ведут работу по созданию мультиплексных диагностических тест-систем, позволяющих выявлять в биологическом материале и дифференцировать до вида представителей рода *Bordetella* путем одновременной амплификации нескольких специфических ДНК-матриц и последующей их детекцией в режиме реального времени, что увеличивает специфичность исследования [17, 18, 22].

На территории РФ официально зарегистрирован лишь один набор реагентов для выявления и дифференциации ДНК возбудителей коклюша, паракоклюша и бронхисептикоза в биологическом материале методом ПЦР-РВ с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Bordetella multi-FL*» [11]. Вместе с тем, вывод о том, что в образце присутствует ДНК *B.parapertussis*, можно сделать при наличии положительного результата амплификации по области гена *ptxA*, и отрицательного по областям, специфичным для геномов *B.pertussis* и *B.bronchiseptica*. Кроме того, результаты ПЦР-исследования по выявлению и идентификации возбудителей коклюша, паракоклюша и бронхисептикоза часто интерпретируются как «Обнаружена ДНК одного из представителей рода *Bordetella*» (многолетние данные, полученные

в МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского). В таких случаях для видовой идентификации требовалось повторное взятие клинического материала и выполнение всех этапов ПЦР-исследования, что приводило к увеличению стоимости анализа или было невозможно по причине выписки пациента из стационара.

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

Коллективом авторов НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи в 2010-х годах была разработана видоспецифичная тест-система на основе ПЦР-РВ, позволяющая выявлять в клинических образцах *V.pertussis*, содержащие интеграции IS481 и IS1002 в опероне вирулентности *bvgAS* [5, 6]. В качестве исследуемого субстрата используется смыв с носоглоточного тампона. С помощью предложенной тест-системы ПЦР-РВ осуществляют диагностику типичных и атипичных форм коклюша, бактерионосительства и изучают изменения фазового состава популяции возбудителя. Также результаты исследования могут быть полезны для определения тактики лечения заболевания, особенно, в случаях атипичных форм коклюша, затяжного течения и смешанных с коклюшем респираторных инфекций.

В последнее время популярность приобрели технологии на основе изотермической амплификации, одной из которых является LAMP [20, 21]. Метод петлеобразующей изотермической амплификации, обладающий высокой чувствительностью, специфичностью и амплификационной эффективностью, был применен и при диагностике коклюша [12, 15, 16]. Ранее в МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского на основе изотермической амплификации был разработан способ для ускоренной лабораторной диагностики коклюша [3], который позволял выявить ДНК *V.pertussis* в течение 9 — 10 часов от начала исследования в клиническом материале. Нами проведена оптимизация этого способа и разработан новый ускоренный способ, отличающийся от предыдущего сокращением времени пробоподготовки клинического образца, составом реакционной смеси, внедрением процедуры первичного отжига праймеров, возможностями перехода на детекцию с помощью интеркалирующего красителя и, в целом, повышением эффективности выявления ДНК *V.pertussis*. Применение разработанного нами способа позволяет выявлять ДНК *V.pertussis* в клиническом материале в течение 4—5 часов с 99,4 % диагностической эффективностью, в то время как проведение исследования с помощью ранее предложенного способа занимало до 9—10 часов и позволяло выявлять ДНК возбудителя в 84,9 % случаях.

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

Работа выполнена в рамках Государственной НИР МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабаченко И.В., Харит С.М., Курова Н.Н. и др. Коклюш у детей: монография. М., Комментарий, 2014.
2. Басов А.А., Цвиркун О.В., Герасимова А.Г. и др. Особенности распространения коклюша в организованном коллективе с высоким уровнем привитости против этой инфекции. Жизнь без опасностей. Здоровье. Профилактика. Долголетие. 2013, 8(4): 60-64.
3. Борисова О.Ю., Петрова М.С., Гадуа Н.Т. и др. Прямой ускоренный метод выявления возбудителя коклюша. Клиническая лабораторная диагностика. 2010, (5): 53-55.
4. ГОСТ Р 53022.3-2008. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов. Введ. 2010-01-01. М.: Стандартинформ, 2009.
5. Каратаев Г.И., Синяшина Л.Н., Медкова А.Ю. и др. Инсерционная инактивация оперона вирулентности в популяции персистирующих бактерий *Bordetella pertussis*. Генетика. 2016, 52(4): 422.
6. Медкова А.Ю., Аляпкина Ю.С., Синяшина Л.Н. и др. Распространенность стертых форм коклюша и анализ фазовых состояний бактерий *Bordetella pertussis*. Детские инфекции. 2010, 9(4): 19-22.
7. Онищенко Г.Г. Эпидемиологическое благополучие населения России. Журн. микробиол. 2013, (1): 42-51.
8. Петри А., Сэбин К. Наглядная медицинская статистика: учебное пособие для вузов. М., ГЭОТАР-Медиа, 2010.
9. Петрова М.С., Попова О.П., Борисова О.Ю. и др. Коклюш у детей раннего возраста. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2012, (6): 12-24.
10. Платонов А.Е. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы. М., РАМН, 2000.
11. Прадед М.Н., Яцышина С.Б., Селезнева Т.С. и др. ПЦР-диагностика инфекций, вызванных *B.pertussis*, *B.parapertussis* и *B.bronchiseptica*. Клиническая лабораторная диагностика. 2013, (1): 53-56.
12. Brotons P., de Paz H.D., Esteva C. et al. Validation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid diagnosis of pertussis infection in nasopharyngeal samples. Expert Rev. Mol. Diagn. 2016, 16(1): 125-130. doi: 10.1586/14737159.2016.1112741.
13. Douglas E., Coote J.G., Parton R. et al. Identification of *Bordetella pertussis* in nasopharyngeal swabs by PCR amplification of a region of the adenylate cyclase gene. J. Med. Microbiol. 1993, 38(2): 140-144. doi: 10.1099/00222615-38-2-140.
14. Grimprel E.P., Begue P., Anjak I. et al. Comparison of polymerase chain reaction, culture and Western immunoblot serology for diagnosis of *Bordetella pertussis* infections. J. Clin. Microbiol. 1993, 31(10): 2745-2750.
15. Kamachi K., Toyozumi-Ajisaka H., Toda K. et al. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. J. Clin. Microbiol. 2006, 44(5): 1899-1902. doi: 10.1128/JCM.44.5.1899-1902.2006.
16. Kamachi K., Yoshino S., Katsukawa C. et al. Laboratory-based surveillance of pertussis using multitarget real-time PCR in Japan: evidence for *Bordetella pertussis* infection in preteens and teens. New Microbes New Infect. 2015, (8): 70-74. doi: 10.1016/j.nmni.2015.10.001.
17. Lanotte Ph., Plouzeau C, Burucoa C. et al. Evaluation of four commercial Real-Time PCR assays for detection of *Bordetella* spp. in nasopharyngeal aspirates. J. Clin. Microbiol. 2011, 49(11): 3943-3946. doi: 10.1128/JCM.00335-11.
18. Litt D.J., Jauneikaite E., Tchipeva D. et al. Direct molecular typing of *Bordetella pertussis* from clinical specimens submitted for diagnostic quantitative (real-time) PCR. J. Med. Microbiol. 2012, 61(12): 1662-1668. doi: 10.1099/jmm.0.049585-0.
19. Loeffelholz M. Towards improved accuracy of *Bordetella pertussis* nucleic acid amplification tests. J. Clin. Microbiol. 2012, 50(7): 2186-2190. doi: 10.1128/JCM.00612-12.
20. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res. 2000, 28(12): E63.
21. Notomi T., Mori Y., Tomita N. et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. J. Microbiol. 2015, 53(1): 1-5. doi: 10.1007/s12275-015-4656-9.
22. Qin X., Galanakis E., Martin E.T. et al. Multitarget PCR for diagnosis of pertussis and its clinical implications. J. Clin. Microbiol. 2007, 45(2): 506-511. doi: 10.1128/JCM.02042-06.

23. Qin X. Resurgence of Pertussis and its laboratory diagnosis. Clin. Microbiol. Newsletter. 2015, 37(9): 69-76. doi: 10.1016/j.clinmicnews.2015.04.001.
24. Stone B.L., Daly J., Srivastava R. Duration of Bordetella pertussis polymerase chain reaction positivity in confirmed pertussis illness. J. Pediatric Infect. Dis. Soc. 2014, 3(4): 347-349. doi: 10.1093/jpids/piu004.

Поступила 05.03.18

Контактная информация: Борисова Ольга Юрьевна, д.м.н.,
125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, р.т. (499)747-64-84

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*Г.И.Алаторцева¹, А.В.Сидоров¹, Л.Н.Нестеренко¹, Л.Н.Лухверчик¹, А.В.Милованова¹,
Ю.И.Аммур¹, М.И.Михайлов^{1,2}, К.К.Кюрегян^{1,2}, С.В.Жаворонок³, В.В.Зверев¹*

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА ORF3 ВИРУСА ГЕПАТИТА Е 3 ГЕНОТИПА И ОЦЕНКА ЕГО АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, ²Российская медицинская академия последиplomного образования, Москва, Россия; ³Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

Цель. Разработка рекомбинантного полипептида — аналога полноразмерного белка ORF3 вируса гепатита Е (ВГЕ) 3 генотипа. *Материалы и методы.* Штаммы Escherichia coli, плазмидные векторы, биологические и клинические образцы, молекулярно-биологические, биоинформационные, биохимические, биотехнологические, серологические методы. *Результаты.* Из фекальных экстрактов от свиней из хозяйств Белгородской обл. выделена РНК, которая использована в ОТ-ПЦР для получения фрагмента гена orf3 ВГЕ 3 генотипа. С помощью А/Т-клонирования получена рекомбинантная плаزمиды со вставкой фрагмента ДНК (230 п.н.), кодирующего N-концевой участок белка ORF3. Рассчитана первичная структура недостающего С-концевого участка белка. Для повышения выхода целевого продукта в клетках E.coli проведена оптимизация кодонов последовательности ДНК, кодирующей полноразмерный белок ORF3. Рассчитанный фрагмент ДНК был химически синтезирован и использован при конструировании рекомбинантной плазмиды экспрессии. Получен рекомбинантный штамм E.coli — продуцент белка ORF3 в составе слитного с β-галактозидазой полипептида. Рекомбинантный белок выделен из телец-включений биомассы штамма-продуцента и хроматографически очищен. Антигенная специфичность полученного рекомбинантного полипептида подтверждена в иммунохимических реакциях (ИФА, Вестерн-блоттинг) с образцами сывороток крови больных гепатитом Е и контрольных групп пациентов. *Заключение.* Разработан рекомбинантный антиген ORF3 ВГЕ 3 генотипа и показана возможность его применения в диагностических тестах.

Журн. микробиол., 2018, № 5, С. 46—53

Ключевые слова: вирус гепатита Е, ВГЕ 3 генотипа, ген orf3, рекомбинантный антиген ORF3, иммуноферментный анализ, ИФА, Вестерн-блоттинг

*G.I.Alatortseva¹, A.V.Sidorov¹, L.N.Nesterenko¹, L.N.Luhverchik¹, A.V.Milovanova¹,
Yu.I.Ammur¹, M.I.Mikhailov^{1,2}, K.K.Kyuregyan^{1,2}, S.V.Zhavoronok³, V.V.Zverev¹*

OBTAINING THE RECOMBINANT ORF3 PROTEIN OF HEPATITIS E GENOTYPE 3 AND EVALUATION OF ITS ANTIGENIC PROPERTIES

¹Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, ²Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow, Russia; ³Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Aim. Design and construction of the hepatitis E virus (HEV) genotype 3 full-size ORF3 recombinant polypeptide. *Materials and methods.* Escherichia coli strains, plasmid vectors, serological