

ОАО «ИЗДАТЕЛЬСТВО
"МЕДИЦИНА"»

ОБЩЕРОССИЙСКАЯ
ОБЩЕСТВЕННАЯ
ОРГАНИЗАЦИЯ «НАУЧНО-
ПРАКТИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО
СПЕЦИАЛИСТОВ
ЛАБОРАТОРНОЙ МЕДИЦИНЫ»

Журнал зарегистрирован
Федеральной службой по надзору
в сфере связи, информационных
технологий и массовых коммуникаций.

КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Том 65
11 • 2020

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

Е Ж Е М Е С Я Ч Н Ы Й Н А У Ч Н О - П Р А К Т И Ч Е С К И Й Ж У Р Н А Л

НОЯБРЬ

Журнал основан в январе 1955 г.

Почтовый адрес
ОАО «Издательство "Медицина"»
115088, Москва, Новоостроповская ул.,
д. 5, строение 14

Телефон редакции:
8-495-430-03-63,
E-mail: clin.lab@yandex.ru

Зав. редакцией Л.А. Шанкина

**Ответственность за достоверность
информации, содержащейся в рекламных
материалах, несут рекламодатели**

Художественный редактор
Е.М. Архипова

Сдано в набор 10.11.2020.
Подписано в печать 25.11.2020.
Формат 60 × 88%.
Печать офсетная.
Печ. л. 8,00
Уч.-изд. л. 9,67.

E-mail: oao-meditsina@mail.ru
WWW страница: www.medlit.ru

ЛР N 010215 от 29.04.97 г.

Все права защищены. Ни одна часть этого издania не может быть занесена в память компьютера либо воспроизведена любым способом без предварительного письменного разрешения издателя.

Журнал представлен в базе данных Российского индекса научного цитирования (РИНЦ) и в следующих международных информационно-справочных изданиях: Abstracts of Microbiology, Adis International Ltd Reactions Weekly, Chemical Abstracts (Print), Chemical Titles, EBCOhost Biological Abstracts (Online), Elsevier BV EMBASE, Elsevier BV Scopus, Excerpta Medica, Abstract Journals, Index Medicus, Index to Dental Literature, National Library of Medicine PubMed, OCLC Article First, OCLC MEDLINE, Reactions Weekly (Print), Thomson Reuters Biological Abstracts (Online), Thomson Reuters BIOSIS Previews, VINITI RAN Referativnyi Zhurnal, Ulrich's International Periodicals Directory.

Индекс 71442 — для подписчиков
Подписка через Интернет: www.aks.ru,
www.pressa-rf.ru
Подписка на электронную версию:
eibrary.ru

ISSN 0869-2084. Клини. лаб. диагностика.
2020. № 11. 665–728.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор А.Ю. МИРОНОВ

А.Б. ДОБРОВОЛЬСКИЙ, В.В. ДОЛГОВ, Г.Н. ЗУБРИХИНА, А.А. ИВАНОВ, С.А. ЛУГОВСКАЯ, С.Г. МАРДАНЛЫ, В.Т. МОРОЗОВА, Л.М. СКУИНЫ, А.А. ТОТОЛЯН, Г.Г. ХАРСЕЕВА (ответственный секретарь), И.П. ШАБАЛОВА

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

А.Н. АРИПОВ (Ташкент), Т.В. ВАВИЛОВА (Санкт-Петербург), I. WATSON (Великобритания, Ливерпуль), А.Ж. ГИЛЬМАНОВ (Уфа), Д.А. ГРИЩЕНКО (Красноярск), В.С. ГУДУМАК (Кишинёв), Н.Г. ДАШКОВА (Москва), В.А. ДЕЕВ (Киев), Т.И. ДОЛГИХ (Омск), С.А. ЕЛЬЧАНИНОВА (Барнаул), А.В. ИНДУТНЫЙ (Омск), А. KALLNER (Швеция, Стокгольм), А.И. КАРПИЩЕНКО (Санкт-Петербург), К.П. КАШКИН (Москва), А.В. КОЗЛОВ (Санкт-Петербург), В.Г. КОЛЬ (Минск), Г.В. КОРШУНОВ (Саратов), Г.М. КОСТИН (Минск), А.Г. КОЧЕТОВ (Москва), Н.Е. КУШЛИНСКИЙ (Москва), Г.Г. ЛУНЕВА (Киев), А.Р. МАВЗЮТОВ (Уфа), В.Н. МАЛАХОВ (Москва), Д.Д. МЕНЬШИКОВ (Москва), Е.Н. ОВАНЕСОВ (Москва), Ю.В. ПЕРВУШИН (Ставрополь), И.В. ПИКАЛОВ (Новосибирск), Ю.П. РЕЗНИКОВ (Москва), Д.Б. САПРЫГИН (Москва), С.Н. СУПЛОТОВ (Тюмень), О.А. ТАРАСЕНКО (Москва), И.С. ТАРТАКОВСКИЙ (Москва), А.Б. УТЕШЕВ (Алматы), Л.А. ХОРОВСКАЯ (Санкт-Петербург), С.В. ЦВИРЕНКО (Екатеринбург), А.Н. ШИБАНОВ (Москва), В.Л. ЭМАНУЭЛЬ (Санкт-Петербург), Г.А. ЯРОВАЯ (Москва)



«Издательство "МЕДИЦИНА"»

ОАО ИЗДАТЕЛЬСТВО
"МЕДИЦИНА"

THE ALL-RUSSIAN
ORGANIZATION
"THEORETICAL AND
PRACTICAL SOCIETY
OF SPECIALISTS
OF LABORATORY
MEDICINE"

D KLINICHESKAYA LABORATORNAYA diagnostika

Volume 65
11 • 2020

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

NOVEMBER

The Journal is founded in 1955.

**Mailing address:
Izdatelstvo "MEDITSINA"**

115088, Moscow
Novoostapovskaya str., 5, building 14

Editorial office phone:
8-495-430-03-63,

E-mail: clin.lab@yandex.ru

Managing editor L.A. Shankina

**The responsibility for credibility of
information contained in advertising materials
is accounted for advertisers**

Art editor *E.M. Arkhipova*

E-mail: oao-meditsina@mail.ru

WWW page: www.medlit.ru

LR № 010215 of 29.04.1997

All rights reserved. Any part of this edition can not be entered computer memory nor be reproduced with any other mode without preliminary permission of editor in written form.

The Journal is presented in data base of the Russian index of scientific quotation (RiNZ) and in following I&R editions: Abstracts of Micology, Adis International Ltd Reactions Weekly, Chemical Abstracts (print), Chemical Titles, EBCOhost Biological Abstracts (Online), Elsevier BV EMBASE, Elsevier BV Scopus, Excerpta Medica, Abstract Journals, Index Medicus, Index to Dental Literature, National Library of Medicine PubMed, OCLC Article First, OCLC MEDLINE, Reactions Weekly (Print), Thomson Reuters Biological Abstracts (Online), Thomson Reuters BIOSIS Previews, VINITI RAN Referativnyi Zhurnal, Ulrich's International Periodicals Directory.

ISSN 0869-2084.

EDITOR BOARD:

Editor-in-Chief A.Yu. MIRONOV

A.B. DOBROVOLSKYI, V.V. DOLGOV, G.N. ZUBRIKHINA, A.A. IVANOV, S.A. LUGOVSKAYA, S.G. MARDANLY, V.T. MOROZOVA, L.M. SKUIN', A.A. TOTOLYAN, G.G. KHARSEEVA (executive editor), I.P. SHABALOVA

EDITORIAL COUNCIL:

A.N. ARIPOV (*Tashkent*), T.V. VAVILOVA (*Sankt-Peterburg*), I. WATSON (*Great Britain, Liverpool*), A.Zh. GIL'MANOV (*Ufa*), D.A. GRITCHENKO (*Krasnoyarsk*), V.S. GUDUMAK (*Kishinev*), N.G. DASHKOVA (*Moscow*), V.A. DEEV (*Kiev*), T.I. DOLGIKH (*Omsk*), S.A. ELCHANINOVA (*Barnaul*), A.V. INDUTNY (*Omsk*), V.A. KALLNER (*Sweden, Stockholm*), A.I. KARPITCHENKO (*Sankt-Peterburg*), K.P. KASHKIN (*Moscow*), A.V. KOZLOV (*Sankt-Peterburg*), V.G. KOLB (*Minsk*), G.V. KORSHUNOV (*Saratov*), G.M. KOSTIN (*Minsk*), A.G. KOCHETOV (*Moscow*), N.E. KUSHLINSKII (*Moscow*), G.G. LUNEVA (*Kiev*), A.R. MAVZYTTOV (*Ufa*), V.N. MALACHOV (*Moscow*), D.D. MEN'SHIKOV (*Moscow*), E.N. OVANESOV (*Moscow*), Yu.V. PERVUCHIN (*Stavropol'*), I.V. PICALOV (*Novosibirsk*), Yu.P. REZNIKOV (*Moscow*), D.B. SAPRIGIN (*Moscow*), S.N. SUPLOTOV (*Tyumen'*), O.A. TARASENKO (*Moscow*), I.S. TARTAKOVSKYI (*Moscow*), A.B. UTESHEV (*Almati*), L.A. KHOROVSKAYA (*Sankt-Peterburg*), S.V. TSVIRENKO (*Ekaterinburg*), A.N. SHIBANOV (*Moscow*), V.L. EMANUEL' (*Sankt-Peterburg*), G.A. YAROVAYA (*Moscow*)



ИЗДАТЕЛЬСТВО "МЕДИЦИНА"

СОДЕРЖАНИЕ

БИОХИМИЯ

- Кушлинский Н.Е., Алферов А.А., Булычева И.В., Тимофеев Ю.С., Короткова Е.А., Хван О.Т., Кузьмин Ю.Б., Кузнецов И.Н., Бондарев А.В., Щупак М.Ю., Соколов Н.Ю., Ефимова М.М., Герштейн Е.С., Сушенцов Е.А., Алиев М.Д., Мусаев Э.Р.*
Сравнительный анализ уровней растворимых форм рецептора и лиганда контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 в сыворотке крови больных типичными остеосаркомой и хондросаркомой кости. 669

ГЕМАТОЛОГИЯ

- Бородулина Е.А., Васнева Ж.П., Бородулин Б.Е., Вдоушкина Е.С., Поваляева Л.В., Матеев К.А.*
Гематологические показатели при поражениях легких, вызванных инфекцией COVID-19 676

ИММУНОЛОГИЯ

- Марданлы С. Г., Авдонина А. С., Мамедова С. Г.*
Разработка иммуноферментной тест-системы для выявления антител класса IgG к возбудителю COVID-19 в сыворотке (плазме) крови человека. 683

- Акиншина Ю.А., Марданлы С.С., Киселева В.А.*
Иммунохроматографический тест для дифференцированного выявления антител классов М и G к коронавирусу SARS-COV-2 688

- Марданлы С.Г., Авдонина А.С.*
Иммунный блоттинг как метод диагностики токсоплазменной инфекции. 693

ЗАОЧНАЯ АКАДЕМИЯ ПОСЛЕДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ

- Харсеева Г.Г., Тюкавкина С.Ю., Миронов А.Ю.*
Дифтерия: характеристика возбудителя и лабораторная диагностика (лекция) 699

МИКРОБИОЛОГИЯ

- Макарова М.А., Кафтырева Л.А.*
Генетическое разнообразие штаммов энтероаггративных *Escherichia coli*. 707

- Червинец В.М., Червинец Ю.В., Кравчук Э.С.*
Микробиом полости рта и толстой кишки у юношей призывного возраста с артериальной гипертензией и метаболическими нарушениями 712

ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

- Борисова О.Ю., Гадуа Н.Т., Пименова А.С., Афанасьев С.С., Афанасьев М.С., Миронов А.Ю., Алёшкин В.А.*
Состояние и проблемы бактериологической диагностики дифтерийной инфекции в Российской Федерации 717

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Лубова В.А., Леонова Г.Н., Шутикова А.Л., Бондаренко Е.И.*
Индикация возбудителя Ку-лихорадки на юге Дальнего Востока 724

CONTENTS

BIOCHEMISTRY

- Kushlinskii N.E., Alferov A.A., Boulytcheva I.V., Timofeev Yu.S., Korotkova E.A., Khvan O.T., Kuzmin Yu.B., Kuznetsov I.N., Bondarev A.V., Shchupak M.Yu., Sokolov N.Yu., Efimova M.M., Gershtein E.S., Sushentsov E.A., Aliev M.D., Musaev E.R.*
Comparative analysis of the levels of soluble forms of receptor and ligand of the PD-1/PD-L1 immune checkpoint in blood serum of patients with typical bone osteosarcoma and chondrosarcoma 669

HEMATOLOGY

- Borodulina E.A., Vasneva Zh.P., Borodulin B.E., Vdoushkina E.S., Povalyaeva L.V., Mateesku K.A.*
Hematological indicators for lung damage caused by COVID-19 infection 676

IMMUNOLOGY

- Mardanly S.G., Avdonina A.S., Mamedova S.G.*
Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of IgG-antibodies to the causative agent of COVID-19 in human serum (plasma) 683
- Akinshina Yu.A., Mardanly S.S., Kiseleva V.A.*
Immunochemical test for differentiation detection of IgM and IgG to SARS-COV-2 688
- Mardanly S.G., Avdonina A.S.*
Immune blotting as a method for diagnosis of toxoplasmosis 693

REMOTE ACADEMY OF POST-GRADUATE EDUCATION

- Kharseeva G.G., Tyukavkina S.Yu., Mironov A.Yu.*
Diphtheria: characteristics of the pathogen and laboratory diagnostics (a lecture) 699

MICROBIOLOGY

- Makarova M.A., Kaftyreva L.A.*
Genetic diversity of enteroaggregative *Escherichia coli* 707
- Chervinets V.M., Chervinets Yu.V., Kravchuk E.S.*
Peculiarities of the mouth and colum in the youth of annous age with arterial hypertension and metabolic disorders 712

ORGANIZATION LABORATORY SERVICE

- Borisova O.Yu., Gadua N.T., Pimenova A.S., Afanasiev S.S., Afanasiev M.S., Mironov A.Yu., Aleshkin V.A.*
Status and problems of bacteriological diagnosis of Diphtheria infection in the Russian Federation 717

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

- Lubova V. A., Leonova G. N., Shutikova A. L., Bondarenko E. I.*
Indication Q fever pathogen in the south of Far East 724

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Кушлинский Н.Е.¹, Алферов А.А.¹, Булычева И.В.¹, Тимофеев Ю.С.¹, Короткова Е.А.¹, Хван О.Т.¹, Кузьмин Ю.Б.¹, Кузнецов И.Н.¹, Бондарев А.В.², Щупак М.Ю.², Соколов Н.Ю.¹, Ефимова М.М.¹, Герштейн Е.С.¹, Сушенцов Е.А.¹, Алиев М.Д.³, Мусаев Э.Р.¹

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ УРОВНЕЙ РАСТВОРИМЫХ ФОРМ РЕЦЕПТОРА И ЛИГАНДА КОНТРОЛЬНОЙ ТОЧКИ ИММУНИТЕТА PD-1/PD-L1 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ ТИПИЧНЫМИ ОСТЕОСАРКОМОЙ И ХОНДРОСАРКОМОЙ КОСТИ

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ, 115478, Москва, Россия;

²Московская городская онкологическая больница № 62, 143423, Московская область, Красногорский район, п/о Степановское, поселок Истра, Россия;

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава РФ, 125284, Москва, Россия

Представлены результаты иммуноферментного исследования содержания sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови до начала лечения у 133 больных новообразованиями костей в возрасте от 6 до 70 лет и 57 практически здоровых доноров 12-70 лет, составивших группу контроля. У 14 пациентов новообразования имели доброкачественный характер, у 16 диагностирована пограничная гигантоклеточная опухоль кости и у 103 больных были злокачественные поражения костей, в т. ч. остеосаркома – у 39, хондросаркома – у 42 пациентов. Концентрации рецептора sPD-1 в сыворотке крови группы контроля и больных первичными опухолями костей не различались, тогда как уровень sPD-L1 у больных опухолями костей был статистически значимо повышен ($p < 0,0000001$). С помощью построения кривой ROC выявлен порог концентрации sPD-L1, равный 16,5 нг/мл, при котором чувствительность теста относительно здорового контроля составляет 75,9%, специфичность – 75,4%. Однако, частота выявления уровней sPD-L1, превышающих 16,5 нг/мл, у больных доброкачественными, пограничными и злокачественными опухолями костей примерно одинакова. Проанализировав особенности выявления sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови пациентов с наиболее распространенными злокачественными поражениями костной ткани – остеосаркомой и хондросаркомой, – установили, что при обоих типах опухолей уровень sPD-L1 статистически значимо выше, чем в контроле, однако при хрящеобразующих опухолях в сыворотке крови циркулирует преимущественно растворимый лиганд sPD-L1, при костеобразующих – рецептор sPD-1. В частности, уровень sPD-1 статистически значимо выше у больных типичной остеосаркомой по сравнению с пациентами с типичной хондросаркомой ($p = 0,002437$), а соотношение концентраций sPD-L1/sPD-1 при хондросаркоме высоко значимо вдвое выше, чем при остеосаркоме (0,81 и 0,35 соответственно, $p = 0,000284$). Чувствительность теста sPD-L1 $\geq 16,5$ нг/мл в группе больных типичной остеосаркомой составляет всего 70,2%, а у больных типичной хондросаркомой – 84,6%. Сывороточные концентрации sPD-1 и sPD-L1 у больных остеосаркомой и хондросаркомой не были связаны с показателями распространенности опухолевого процесса, степенью дифференцировки опухоли, локализацией новообразования в костях скелета и типом пораженной кости. Таким образом, соотношение растворимых форм рецептора и лиганда сигнального пути PD-1/PD-L различается у больных костеобразующими и хрящеобразующими саркомами костей, при этом sPD-L1 может иметь потенциальное диагностическое значение именно при хрящеобразующих саркомах.

Ключевые слова: опухоли костей; sPD-1, sPD-L1; остеосаркома; хондросаркома; сыворотка крови.

Для цитирования: Кушлинский Н.Е., Алферов А.А., Булычева И.В., Тимофеев Ю.С., Короткова Е.А., Хван О.Т., Кузьмин Ю.Б., Кузнецов И.Н., Бондарев А.В., Щупак М.Ю., Соколов Н.Ю., Ефимова М.М., Герштейн Е.С., Сушенцов Е.А., Алиев М.Д., Мусаев Э.Р. Сравнительный анализ уровней растворимых форм рецептора и лиганда контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 в сыворотке крови больных типичными остеосаркомой и хондросаркомой кости. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65(11): 669-675. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-11-669-675>

Kushlinskiy N.E.¹, Alferov A.A.¹, Boulytcheva I.V.¹, Timofeev Yu.S.¹, Korotkova E.A.¹, Khvan O.T.¹, Kuzmin Yu.B.¹, Kuznetsov I.N.¹, Bondarev A.V.², Shchupak M.Yu.², Sokolov N.Yu.¹, Efimova M.M.¹, Gershtein E.S.¹, Sushentsov E.A.¹, Aliev M.D.³, Musaev E.R.¹

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE LEVELS OF SOLUBLE FORMS OF RECEPTOR AND LIGAND OF THE PD-1 / PD-L1 IMMUNE CHECKPOINT IN BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH TYPICAL BONE OSTEOSARCOMA AND CHONDROSARCOMA

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology Ministry of Health of the Russian Federation, 115478, Moscow, Russia;

²Moscow City Oncological Hospital No. 62, 143423, Moscow Region, Krasnogorsk District, p / o Stepanovskoye, Istra settlement, Russia;

³National Medical Research Center of Radiology Ministry of Health of the Russian Federation, 125284, Moscow, Russia

Results of ELISA investigation of the pretreatment sPD-1 and sPD-L1 content in blood serum of 133 bone neoplasms patients aged 6-70 years and 57 practically healthy control persons aged 12-70 years are described. In 14 patients the neoplasms were of a benign character, in 16 – borderline giant-cell bone tumor was diagnosed, and in 103 – malignant bone lesions including 39 osteosarcomas and 42 chondrosarcomas were revealed. The sPD-1 receptor concentrations in blood serum did not differ between control healthy persons and primary bone tumor patients, while serum sPD-L1 level in bone tumor patients was statistically significantly increased ($p < 0.0000001$). By means of ROC curve construction a cut-off sPD-L1 level of 16.5 pg/ml was found that imposed 75,9% sensitivity and 75,4% specificity in relation to healthy control. However, the frequency of sPD-L1 levels exceeding 16.5 pg/ml was approximately similar in benign, borderline and malignant bone tumor patients. Analysis of the pattern of sPD-1 and sPD-L1 circulation in the peripheral blood of patients with the most prevalent malignant bone tumors – osteosarcoma and chondrosarcoma – demonstrated that in both sarcoma types sPD-L1 level was significantly higher than in control, but in patients with chondrogenic tumors the soluble ligand sPD-L1 dominates in the circulation, while in those with osteogenic tumors – sPD-1 receptor prevails. In particular, sPD-1 level is statistically significantly higher in patients with typical osteosarcoma than in those with typical chondrosarcoma ($p = 0.002437$), and sPD-L1/sPD-1 concentration ratio in chondrosarcoma is highly significantly more than 2-fold higher than in osteosarcoma (0.81 and 0.35 respectively; $p = 0.000284$). The sensitivity of sPD-L1 ≥ 16.5 pg/ml test in typical osteosarcoma patients' group comprised only 70.2%, and in those with typical chondrosarcoma – 84.6%. Serum sPD-1 u sPD-L1 concentrations in osteosarcoma and chondrosarcoma patients were not associated with the indices of tumor advancement, its histological grade, localization in the osseous system, and type of affected bone. Thus, it can be concluded that the ratio between circulating soluble forms of the receptor and the ligand of PD-1/PD-L signaling pathway differs between patients with chondrogenic and those with osteogenic tumors, sPD-L1 being diagnostically valuable mostly for chondrogenic bone neoplasms.

Key words: bone tumors; sPD-1, sPD-L1; osteosarcoma; chondrosarcoma; serum.

For citation: Kushlinskii N.E., Alferov A.A., Boulytcheva I.V., Timofeev Yu.S., Korotkova E.A., Khvan O.T., Kuzmin Yu.B., Kuznetsov I.N., Bondarev A.V., Shchupak M.Yu., Sokolov N.Yu., Efimova M.M., Gershtein E.S., Sushentsov E.A., Aliev M.D., Musaev E.R. Comparative analysis of the levels of soluble forms of receptor and ligand of the immunity control point PD-1 / PD-L1 in the blood serum of patients with typical bone osteosarcoma and chondrosarcoma. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65(11): 669-675 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-11-669-675>

For correspondence: Kushlinskii Nikolay Evgenievich, Doctor of Medical Sciences, professor, academician of RAS, Head of the Laboratory of Clinical Biochemistry; e-mail: biochimia@yandex.ru

Information about authors:

Kushlinskii N.E. – <https://orcid.org/0000-0002-3898-4127>;
Alferov A.A. – <https://orcid.org/0000-0003-3585-5693>;
Boulytcheva I.V. – <https://orcid.org/0000-0001-7592-4249>;
Timofeev Yu.S. – <https://orcid.org/0000-0001-9305-6713>;
Korotkova E.A. – <https://orcid.org/0000-0002-2509-5232>;
Khvan O.T. – <https://orcid.org/0000-0002-2437-7457>;
Kuzmin Yu.B. – <https://orcid.org/0000-0001-9684-2509>;
Kuznetsov I.N. – <https://orcid.org/0000-0003-0866-5561>;
Bondarev A.V. – <https://orcid.org/0000-0001-5006-6962>;
Shchupak M.Yu. – <https://orcid.org/0000-0001-8518-4889>;
Sokolov N.Yu. – <http://orcid.org/0000-0002-0706-9575>;
Efimova M.M. – <http://orcid.org/0000-0002-1925-2457>;
Gershtein E.S. – <https://orcid.org/0000-0002-3321-801X>;
Sushentsov E.A. – <https://orcid.org/0000-0003-3672-1742>;
Aliev M.D. – <https://orcid.org/0000-0003-2706-4138>;
Musaev E.R. – <https://orcid.org/0000-0002-1241-3019>.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The study was supported by RFBR grant N 18-03-00793.

Received 03.09.2020
Accepted 03.10.2020

Введение. Первичные опухоли костей – редкие и гетерогенные злокачественные новообразования. Саркомы костей – самое распространенное злокачественное поражение костной ткани – составляют менее 1% всех онкологических заболеваний у взрослых, у детей – до 2% [1]. Пристальный интерес онкологов к саркомам костей связан с тем, что эти опухоли, в особенности, остеосаркома, чаще встречаются у детей и молодых людей, отличаются крайне агрессивным клиническим течением, неблагоприятным прогнозом и во многих случаях резистентностью к проводимой терапии. Значимым методом лечения первичных опухолей костей по-прежнему остается хирургия, однако большинство пациентов имеют неблагоприятный прогноз из-за быстрой диссеминации опухолевого процесса в отдаленные органы, поэтому обязательным компонентом лечения сарком костей счи-

тается химиотерапия, но выраженные побочные эффекты и нехватка эффективных препаратов ограничивают ее применение [2].

Следовательно, традиционные подходы к лечению сарком костей имеют свои ограничения. Поэтому, в последнее время внимание исследователей и практических онкологов привлекают принципиально новые патогенетические подходы в лечении опухолей костей, которые основаны на современных достижениях биохимии, молекулярной биологии и иммунологии опухолей, в частности, новейших методов иммунотерапии, направленных на подавление контрольных точек иммунитета, контролирующих в физиологических условиях выраженность и длительность аутоиммунного ответа, предотвращая повреждение собственных тканей организма [3].

Одной из ключевых контрольных точек иммунитета является сигнальная система PD-1/PD-L, включающая рецептор программируемой гибели клетки PD-1 (programmed cell death protein 1) и два его лиганда (PD-L1 и PD-L2) [3]. PD-1 представляет собой мембранный рецептор I типа, принадлежит к семейству CD28/CTLA-4 регуляторов T-клеток и экспрессируется на их поверхности. Более значимым из лигандов является PD-L1, известный также как кластер дифференцировки 274 (CD274) или гомолог B7 1-го типа (B7-H1). В норме PD-L1 экспрессируется на антиген-презентирующих дендритных и макрофагоподобных клетках периферических органов, а также на клетках плаценты, островков поджелудочной железы и сетчатки, но его мРНК обнаружена в значительно более широком спектре тканей, а индуцированная экспрессия PD-L1 может наблюдаться на T и B лимфоцитах, естественных киллерах, макрофагах, мезенхимальных, стволовых и эпителиальных клетках.

Активация PD-1/PD-L1 пути стимулирует апоптоз антиген-специфичных T-лимфоцитов, обладающих противоопухолевым эффектом, и одновременно подавляет апоптоз регуляторных супрессорных T-клеток, что является одним из механизмов «ускользания» опухоли от действия иммунной системы организма. В связи с этим моноклональные антитела к PD-1 и PD-L1, предотвращающие их взаимодействие друг с другом, находят сейчас активное применение в терапии многих онкологических заболеваний, в первую очередь, меланомы [4] и почечно-клеточной карциномы [3, 5]. Проводятся первые попытки использования подобных препаратов и при саркомах костей [6-8]. При этом надежных критериев для предсказания чувствительности к анти-PD-1/PD-L1 препаратам пока не существует. Наиболее очевидным критерием является экспрессия PD-1 и/или PD-L1 на опухолевых клетках и/или на инфильтрирующих опухоль лимфоцитах и других иммунных клетках, однако данные об эффективности этих показателей в качестве предикторов ответа на соответствующую терапию неоднозначны [9, 10]. PD-1 и PD-L1 рассматривают как молекулярные маркеры общего прогноза клинического течения и выживаемости пациентов с различными онкологическими заболеваниями [10-12], хотя результаты таких исследований пока также противоречивы.

В последнее время, большое внимание исследователей привлекают растворимые формы PD-1 (sPD-1) и PD-L1 (sPD-L1), обнаруженные относительно недавно в периферической крови, в том числе, и онкологических больных [13-18]. Происхождение этих растворимых молекул точно не установлено. Предполагают, что sPD-L1 образуется преимущественно в результате протеолитического отщепления внеклеточной части трансмембранного белка, а sPD-1 – в результате альтернативного сплайсинга соответствующей мРНК. Вопрос о клеточном происхождении и источнике (опухолевые, иммунные, дендритные клетки) циркулирующих в периферической крови sPD-1 и sPD-L1 также остается дискуссионным. Особый интерес представляет изучение динамики циркулирующих в периферической крови sPD-1 и sPD-L1 на фоне специфической анти-PD-1/PD-L терапии.

Исследование маркеров сигнального пути PD-1/PD-L, в особенности, их растворимых форм, у больных саркомами костей только начинается и представлено единичными публикациями [19-23]. Показано, что экспрессия PD-L1 широко варьирует в клеточных линиях остео-

саркомы, при этом варианты с лекарственной устойчивостью имеют тенденцию к более высокой экспрессии маркера по сравнению с их родительскими клеточными линиями [22]. В недавнем мета-анализе 14 клинико-лабораторных исследований с участием 868 больных остеосаркомой отмечена на 14–75% более высокая экспрессия PD-L1 в опухолях, которая статистически значимо коррелировала с метастазированием, высоким риском смертности и более низкими показателями общей выживаемости [23]. Усиление тканевой экспрессии PD-L1 и PD-1 обнаружено и при хондросаркоме [24-26].

Ранее нами впервые продемонстрировано, что уровни sPD-L1 в сыворотке крови статистически значимо повышены по сравнению с контролем при всех морфологических типах новообразований костей, тогда как sPD-1 – только при саркоме Юинга и гигантоклеточной опухоли кости [27].

Цель данного исследования – сравнительный анализ уровней sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови больных типичными костеобразующими (остеосаркома) и хрящеобразующими (хондросаркома) опухолями костей с учетом клинических и морфологических характеристик заболеваний.

Материал и методы. В исследование включены 133 больных новообразованиями костей в возрасте от 6 до 70 лет (77 мужчин и 56 женщин), проходивших лечение в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н.Н. Блохина и в Московской городской онкологической больнице № 62 в период с 2016 по 2019 гг. У 14 пациентов новообразования имели доброкачественный характер, у 16 диагностирована пограничная гигантоклеточная опухоль кости, у 103 больных были злокачественные поражения костей: типичная остеосаркома – 37, периостальная остеосаркома – 1, паростальная остеосаркома – 1, типичная хондросаркома – 39, вторичная хондросаркома – 2, периостальная хондросаркома – 1, саркома Юинга – 9, хордома – 12, недифференцированная плеоморфная саркома кости – 1.

Среди больных злокачественными новообразованиями костей с типичной остеосаркомой было 37 пациентов в возрасте от 8 до 64 лет; старше 18 лет были 73% пациентов. В 64,9% случаев опухоль локализовалась в нижних конечностях, в 24,3% – в костях таза, 5,4% – в грудной клетке и 5,4% – в верхних конечностях. У 70,3% пациентов были поражены трубчатые, у 29,7% – плоские и губчатые кости.

У 39 больных в возрасте 20 до 67 лет выявлена типичная хондросаркома кости; все пациенты были старше 18 лет. В 46,1% наблюдений опухоль локализовалась в костях таза, по 23,1% – в нижних и в 20,5% – в верхних конечностях и в 10,3% – в грудной клетке. У 41% пациентов опухолью были поражены трубчатые кости, у 59% – плоские и губчатые.

У всех больных клинико-рентгенологический диагноз опухоли кости подтвержден данными ее гистологического исследования согласно Международной классификации опухолей костей (ВОЗ, 2013).

Группу контроля составили 57 практически здоровых доноров (20 мужчин и 37 женщин) в возрасте от 8 до 70 лет.

Концентрацию sPD-L1 и sPD-1 определяли в сыворотке крови, полученной по стандартной методике до начала специфического лечения, с помощью наборов реактивов для прямого иммуноферментного анализа «Human PD-L1 Platinum ELISA» и «Human PD-1 ELISA».

kit» (Affimetrix, eBioscience, США) в соответствии с инструкциями производителя. Измерения проводили на полуавтоматическом иммуноферментном анализаторе ВЕР 2000 Advance (Siemens Healthcare Diagnostics, Германия). Содержание маркеров выражали в пикограммах (пг) на 1 мл сыворотки крови.

Статистический анализ клинико-лабораторных данных. Проводили на персональном компьютере с помощью математических пакетов Statistica 10.0 (StatSoft, Inc.) и SPSS 20. Выбор основных характеристик и статистических критериев при сравнении показателей осуществляли после изучения распределения признака и его сравнения с распределением Гаусса по критерию Колмогорова-Смирнова. Для признаков с распределением, значимо отличающимся от нормального, рассчитывали медиану, квантили и применяли непараметрические методы сравнения: для несвязанных признаков при количестве групп более двух – непараметрический тест Краскела-Уоллиса, при сопоставлении двух независимых групп – тест Манна-Уитни. Анализ корреляционных взаимосвязей проводили с помощью теста корреляции рангов Спирмена. Различия и корреляции считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для

расчета исходных пороговых значений вычисляли 95% доверительные интервалы показателей, а также определяли значимые пороговые уровни методом построения кривых ROC. В таблицах показаны пределы колебаний показателей (min – max), медианы (Me) и границы нижнего и верхнего квартилей (Q1-Q3).

Результаты и обсуждение. Для оценки потенциальной диагностической значимости sPD-1 и sPD-L1 на первом этапе сопоставили концентрации маркеров в сыворотке крови 57 практически здоровых доноров и общей группы из 133 больных первичными новообразованиями костей (табл. 1).

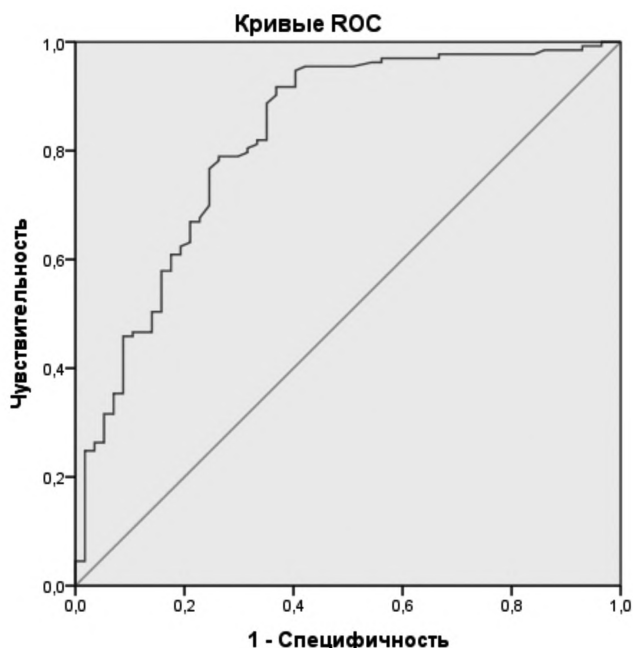
Концентрации рецептора sPD-1 в сыворотке крови практически здоровых доноров и общей группы больных первичными новообразованиями костей не различались, тогда как уровень sPD-L1 у больных опухолями костей был статистически значимо выше, чем в контроле ($p < 0,0000001$): медиана концентрации этого маркера в сыворотке крови пациентов составила 24 пг/мл, что в 2,6 раза превышало показатели группы контроля (9,2 пг/мл). У пациентов с новообразованиями костей также высоко значимо повышено по сравнению с контролем соотношение концентраций маркеров sPD-L1/sPD-1 (медианы соответственно 0,49 и 0,21; $p < 0,0000001$), стало быть соотношение между циркулирующими рецептором и лигандом повышается в пользу последнего.

Более перспективным для разделения здоровых доноров и пациентов с первичными опухолями костей оказался порог концентрации sPD-L1, полученный с помощью построения кривой ROC и равный 16,5 пг/мл (см. рисунок). При этом пороговом уровне чувствительность теста составила 75,9%, специфичность – 75,4%.

Сопоставив уровни исследованных маркеров в сыворотке крови больных опухолями костей с характером новообразования (доброкачественное, пограничное, злокачественное), мы обнаружили значимое различие уровня sPD-1 при злокачественных опухолях относительно пограничных новообразований кости ($p = 0,002482$; табл. 2).

Частота выявления уровней sPD-L1, превышающих 16,5 пг/мл, в группе больных доброкачественными новообразованиями костей составила 78,5% (11 из 14), в группе больных пограничной опухолью кости 75% (12 из 16), в группе больных злокачественными опухолями (саркомы) костей – 75,7% (78 из 103), в группе больных типичной остеосаркомой – 70,2% (26 из 37), в группе больных типичной хондросаркомой – 84,6% (33 из 39). Таким образом, лиганд sPD-L1 не обладает диагностическим потенциалом в распознавании характера выявленной опухоли кости.

На следующем этапе исследования подробно проанализировали особенности уровней sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови пациентов с наиболее распространенными



ROC кривая для sPD-L1 при разделении группы контроля (здоровых доноров) и больных первичными новообразованиями костей.

Таблица 1

Концентрации и соотношение sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови здоровых доноров (группа контроля) и общей группы больных опухолями костей

| Группа | n | sPD-1, пг/мл | | sPD-L1, пг/мл | | sPD-L1/sPD-1 | |
|----------------|-----|--------------|-------------------|---------------|-------------------|---------------|-------------------|
| | | Min – max | Me Q1-Q3 | Min – max | Me Q1-Q3 | Min – max | Me Q1-Q3 |
| Контроль | 57 | 11,4-138 | 48,7 35,5-53,8 | 0,001-56,6 | 9,2 7,0-16,1 | 0,000017-1,23 | 0,21 0,13-0,40 |
| Опухоли костей | 133 | 7,5-154 | 48,2 27,9-69,0 | 3,4-1151 | 24,0 16,7-32,0 | 0,06-61,4 | 0,49 0,31-0,95 |
| p | 190 | | >0,05 | | <0,0000001 | | <0,0000001 |

злокачественными опухолями костей – типичными остеосаркомой и хондросаркомой, которые составили большинство в данной выборке, соответственно 37 и 39 пациентов. Прежде всего, следует подчеркнуть ключевые клинико-патологические различия между этими двумя типами костных опухолей, одна из которых (остеосаркома) происходит из костеобразующей, а другая (хондросаркома) – из хрящеобразующей ткани. Остеосаркома наиболее часто выявляется среди всех первичных злокачественных опухолей костей и преобладает у детей и подростков, крайне агрессивная по клиническому течению, склонная к раннему гематогенному метастазированию, отличается низкой чувствительностью к химиотерапии. Показатели выживаемости при неметастатической остеосаркомой варьируют от 65 до 70%. При метастатическом типе остеосаркомы 5-летняя выживаемость, даже при включении неoadъювантной и/или адъювантной химиотерапии, составляет менее 20%. В свою очередь, хондросаркомы – это гетерогенная группа хрящеобразующих злокачественных опухолей костей с различными морфологическими признаками и биологическим поведением. Наиболее часто хондросаркомы встречаются у взрослых с возрастающей частотой до 75 лет, они являются третьими наиболее распространенными злокачественными опухолями костей после миеломы и остеосаркомы. Хондросаркомы классифицируют как первичные, если они возникают *ex novo*, или как вторичные, если они возникают в результате ранее существовавшего хрящевого поражения кости, такого как энхондрома или костно-хрящевой экзостоз.

У обследованных нами пациентов остеосаркома и хондросаркома кости были представлены преимущественно типичными вариантами опухоли (37 и 39 соответственно; табл. 3), поэтому именно на них сосредоточен основной анализ исследованных маркеров. Уровень

sPD-1 статистически значимо выше (в 1,86 раза по медиане) у больных типичной остеосаркомой по сравнению с пациентами с типичной хондросаркомой ($p=0,002437$). Уровень sPD-L1, напротив, у больных типичной остеосаркомой достоверно ниже, чем у пациентов с хондросаркомой (медианы 22,3 и 26,2 пг/мл соответственно; $p=0,042245$). При этом соотношение концентраций sPD-L1/sPD-1 при хондросаркомой (0,16-61,4; медиана – 0,81) статистически значимо выше, чем при остеосаркомой (0,11-2,07; медиана – 0,35; $p=0,000284$). Таким образом, при хрящеобразующих опухолях костей в сыворотке крови пациентов циркулирует преимущественно лиганд sPD-L1, при костеобразующих – рецептор sPD-1.

При обоих типах опухолей уровни sPD-L1 в сыворотке крови больных статистически значимо выше, чем в контроле ($p<0,0001$). Следует отметить, что чувствительность теста sPD-L1 $\geq 16,5$ пг/мл в группе больных типичной остеосаркомой составила всего 70,2% (26 из 37), а у больных типичной хондросаркомой – 84,6% (33 из 39). Соответственно, sPD-L1 имеет потенциальное диагностическое значение для хрящеобразующих опухолей костей.

Уровень sPD-1 у больных остеосаркомой кости (55,5 пг/мл) не отличался от здоровых доноров (48,7 пг/мл), а при хондросаркомой (29,9 пг/мл) был статистически значимо ниже, чем в контроле ($p=0,003661$). Соотношение sPD-L1/sPD-1 при типичной остеосаркомой (0,35) близко к показателю группы контроля (0,21; $p=0,001237$), а при хондросаркомой статистически значимо его превышает (0,81; $p<0,0000001$).

Четкой взаимосвязи уровней sPD-1 и sPD-L1 с возрастом пациентов не прослеживается. Однако при разделении больных остеосаркомой на две возрастные группы (<18 лет; 10 пациентов) и (≥ 18 лет; 27 пациентов) выяв-

Таблица 2

Концентрации sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови больных первичными опухолями костей в зависимости от характера новообразования

| Характер новообразований | n | sPD-1, пг/мл | | sPD-L1, пг/мл | |
|--------------------------|-----|--------------|--------------------|---------------|-------------------|
| | | Min – max | Me Q1-Q3 | Min – max | Me Q1-Q3 |
| Доброкачественные | 14 | 18,9-121 | 42,5 29,0-51,0 | 3,4-78,0 | 25,5 16,7-33,1 |
| Пограничные | 16 | 45,3-87,7 | 68,8 54,4-75,0 | 4,9-53,3 | 21,6 16,4-27,6 |
| Злокачественные | 103 | 7,5-154 | 45,8* 25,0-68,5 | 6,1-1151 | 24,0 17,6-33,2 |

Примечание. * – $p=0,002482$ относительно пограничных.

Таблица 3

Концентрации sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови больных остеосаркомой и хондросаркомой кости

| Группа | n | sPD-1, пг/мл | | sPD-L1, пг/мл | |
|-----------------------------|----|--------------|--------------------|---------------|---------------------|
| | | Min – max | Me Q1-Q3 | Min – max | Me Q1-Q3 |
| Типичная остеосаркома | 37 | 14,5-121 | 55,5* 37,9-77,9 | 8,7-58,2 | 22,3** 15,4-29,3 |
| Паростальная остеосаркома | 1 | 48,2 | - | 46,3 | - |
| Периостальная остеосаркома | 1 | 28,0 | - | 18,7 | - |
| Типичная хондросаркома | 39 | 11,4-154 | 29,9* 19,4-52,0 | 10,3-1151 | 26,2** 19,4-39,1 |
| Периостальная хондросаркома | 1 | 39,9 | - | 28,5 | - |
| Вторичная хондросаркома | 2 | 16,3-26,1 | 29,4 | 47,1-53,6 | 50,4 |

Примечание. Достоверные отличия уровней sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови между группами: * $p=0,002437$; ** $p=0,042245$.

лены более низкие медианы концентрации sPD-1 у детей по сравнению со взрослыми пациентами, соответственно 28,7 и 60,8 пг/мл ($p=0,006520$). Для sPD-L1 такой взаимосвязи не выявлено. Коэффициент соотношения sPD-L1/sPD-1 и уровни его колебания в группе больных типичной остеосаркомой кости также статистически значимо различались у взрослых и детей (0,35; 0,18-0,51 и 0,85; 0,56-1,26 соответственно; $p=0,008204$). В группе хондросаркомой кости пациентов в возрасте <18 лет не было.

В группе контроля уровни sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови мужчин и женщин не различались (табл. 4). У больных типичной остеосаркомой различий в концентрациях исследованных маркеров в сыворотке крови с учетом пола также не выявлено, а у пациентов с типичной хондросаркомой кости медиана концентрации sPD-1 была статистически значимо выше у мужчин, по сравнению с женщинами (соответственно 36,6 и 24,9 пг/мл; $p=0,020437$).

Не выявлено статистически значимых различий уровней sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови больных остеосаркомой и хондросаркомой кости в зависимости от типа и вида пораженной кости, локализации опухоли в различных отделах скелета.

Не отмечено зависимости уровней исследованных маркеров от стадии заболевания (табл.5) и отдельных показателей распространенности опухолевого процесса по системе TNM.

В группе больных типичной остеосаркомой кости связь содержания sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови со степенью дифференцировки новообразований не анализировали ввиду преобладания G3 опухолей ($n=36$). В группе больных типичной хондросаркомой кости концентрации sPD-1 и sPD-L1 не зависели от степени дифференцировки первичной опухоли.

Сопоставили уровни sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови в группах больных злокачественными опухолями костей с наличием (1 группа, $n=8$) и отсутствием сопутствующих осложнений (2 группа, $n=95$). Из общей группы 103 пациентов с злокачественными новообразованиями костей в группу 1 вошли 7 больных с патологическим переломом кости и 1 больной с тромбозом легочной артерии. Медиана концентрации sPD-1 была статистически значимо выше у пациентов 1 группы по сравнению с пациентами 2 группы (соответственно 81,9 и 40,7 пг/мл; $p=0,018803$). В то же время уровни sPD-L1 в выше указанных двух группах пациентов не различались.

Заключение. Подводя итоги сравнительного анализа концентраций растворимых форм рецептора и лиганда сигнального пути контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 в сыворотке крови больных первичными опухолями костей и практически здоровых доноров, можно выделить следующие особенности. Прежде всего, обнаружено статистически значимое повышение концентрации sPD-L1 в общей группе больных новообразованиями костей по сравнению с контролем. При этом уровни sPD-1 между указанными группами не различались. С помощью построения кривой ROC выявлен порог концентрации sPD-L1, равный 16,5 пг/мл, при котором чувствительность теста относительно контрольной группы составила 75,9%, специфичность – 75,4%. Кроме того, частота выявления уровней sPD-L1, превышающих 16,5 пг/мл, была выше у больных хондросаркомой (84,6%), по сравнению с остеосаркомой (70,2%).

Проанализировав особенности выявления sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови пациентов с наиболее распространенными злокачественными поражениями костной ткани – типичными остеосаркомой и хондросаркомой, установили, что при обоих типах опухолей уровень sPD-L1 статистически значимо выше, чем в контроле, но при хрящобразующих опухолях в периферической крови циркулирует преимущественно лиганд sPD-L1, а при костеобразующих – рецептор sPD-1. В частности, уровень sPD-1 статистически значимо выше у больных типичной остеосаркомой кости по сравнению с пациентами с типичной хондросаркомой, а соотношение концентраций sPD-L1/sPD-1 при хондросаркоме статистически значимо выше, чем при остеосаркоме. Вместе с тем, сывороточные концентрации sPD-1 и sPD-L1 у больных типичными остеосаркомой и хондросаркомой не связаны с показателями распространенности опухолевого процесса, степенью дифференцировки опухоли, ее локализацией в костях скелета и типом пораженной кости. Дальнейшие исследования покажут, являются ли данные маркеры значимыми

Таблица 4

Концентрации sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови больных типичными остеосаркомой, хондросаркомой кости и здоровых доноров с учетом пола

| Группа | Пол | n | sPD-1, пг/мл | sPD-L1, пг/мл |
|------------------------|-----|----|------------------|-----------------|
| Контроль | муж | 20 | 49,7; 40,3-54,4 | 10,0; 6,3-15,8 |
| | жен | 37 | 47,1; 30,7-53,8 | 8,9; 7,0-20,9 |
| Типичная остеосаркома | муж | 24 | 58,6; 40,1-76,2 | 22,6; 14,4-29,7 |
| | жен | 13 | 50,4; 22,8-78,9 | 19,2; 17,5-27,0 |
| Типичная хондросаркома | муж | 18 | 36,6*; 27,8-67,0 | 26,2; 19,8-38,7 |
| | жен | 21 | 24,9*; 18,2-40,7 | 26,2; 19,4-39,1 |

Примечание. * – $p=0,020437$.

Таблица 5

Концентрации sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови больных типичными остеосаркомой и хондросаркомой кости с учетом стадии заболевания

| Стадия | Типичная остеосаркома | | | Типичная хондросаркома | | |
|--------|-----------------------|-------------------|-------------------|------------------------|-------------------|-------------------|
| | n | sPD-1, пг/мл | sPD-L1, пг/мл | n | sPD-1, пг/мл | sPD-L1, пг/мл |
| I | 4 | 56,9 47,1-74,7 | 20,1 17,8-40,1 | 10 | 32,0 25,0-67,0 | 39,5 19,4-47,1 |
| II | 19 | 48,9 35,5-73,1 | 22,8 13,9-29,7 | 22 | 30,5 18,8-42,0 | 24,7 18,3-30,5 |
| III | 7 | 77,9 40,2-88,4 | 21,3 13,6-25,6 | 6 | 21,6 17,8-37,0 | 27,6 23,6-39,0 |
| IV | 7 | 45,8 34,7-91,8 | 22,9 18,7-30,1 | 1 | 85,0 | 41,1 |

факторами прогноза выживаемости больных саркомами костей, а также возможность их использования в качестве показателей эффективности анти-PD-1/PD-L1 терапии у данной категории пациентов.

Финансирование. Исследование поддержано РФФИ, грант № 18-03-00793.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1,2, 4-15, 19-26
см. REFERENCES)

- Кушлинский Н.Е., Фридман М.В., Морозов А.А., Герштейн Е.С., Кадагидзе З.Г., Матвеев В.В. Современные подходы к иммунотерапии рака почки. *Онкоурология*. 2018; 14(2): 54–67.
- Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С., Уткин Д.О., Петрикова Н.А., Кушлинский Д.Н., Шабанов М.А. и др. Основные компоненты сигнального пути контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 в плазме крови больных раком и доброкачественными опухолями яичников: клинико-морфологические корреляции. *Акушерство и гинекология*. 2020; 6: 80–8.
- Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С., Горячева И.О., Морозов А.А., Алферов А.А., Бежанова С.Д. и др. Растворимые формы рецептора контрольной точки иммунитета PD-1 и его лиганда PD-L1 в сыворотке крови больных почечно-клеточным раком: клинико-морфологические корреляции. *Онкоурология*. 2019; 15(1):15–22.
- Герштейн Е.С., Огнерубов Н.А., Чанг В.Л., Делекторская В.В., Короткова Е.А., Соколов Н.Ю. и др. Растворимые формы PD-1 и PD-L1 в плазме крови больных раком желудка и их связь с клиническими и морфологическими характеристиками заболевания. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65(6): 347–52.
- Кушлинский Н.Е., Алферов А.А., Тимофеев Ю.С., Герштейн Е.С., Булычева И.В., Бондарев А.В. и др. Ключевые компоненты сигнального пути контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 в сыворотке крови при опухолях костей. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2020; 170(7): 79–83.

REFERENCES

- Group ESESNW. Bone sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 2014; 25 (Suppl. 3):113–23.
- Casali P.G., Abecassis N., S. Bauer S. et al. Soft tissue and visceral sarcomas: ESMO-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 2018; 29(Suppl. 4):51–67.
- Kushlinskii N.E., Fridman M.V., Morozov A.A., Gershtein E.S., Kadagidze Z.G., Matveev V.B. Modern approaches to the immunotherapy of kidney cancer. *Oncourologiya*. 2018; 14(2):54–67. (in Russian)
- Yun S., Vincelette N.D., Green M.R., Wahner Hendrickson A.E., Abraham I. Targeting immune checkpoints in unresectable metastatic cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 agents trials. *Cancer Med.* 2016; 5(7):1481–91.
- Massari F., Santoni M., Ciccicarese C., Santini D., Alfieri S., Martignoni G. et al. PD-1 blockade therapy in renal cell carcinoma: current studies and future promises. *Cancer Treat. Rev.* 2015; 41(2):114–21.
- Shimizu T., Fuchimoto Y., Fukuda K., Okita H., Kitagawa Y., Kuroda T. The effect of immune checkpoint inhibitors on lung metastases of osteosarcoma. *J. Pediatr. Surg.* 2017; 52(12):2047–50.
- Zheng B., Ren T., Huang Y., Sun K., Wang S., Bao X., Liu K., Guo W. PD-1 axis expression in musculoskeletal tumors and antitumor effect of nivolumab in osteosarcoma model of humanized mouse. *J. Hematol. Oncol.* 2018; 11(1):16.
- Tawbi H.A., Burgess M., Bolejack V., Van Tine B.A., Schuetz S.M., Hu J. et al. Pembrolizumab in advanced soft-tissue sarcoma and bone sarcoma (SARC028): a multicentre, two-cohort, single-arm, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2017; 18(11):1493–1501.
- Yuasa T., Masuda H., Yamamoto S., Numao N., Yonese J. Biomarkers to predict prognosis and response to checkpoint inhibitors. *Int. J. Clin. Oncol.* 2017; 22(4):629–34.

- Zhang Y., Kang S., Shen J., He J., Jiang L., Wang W. et al. Prognostic significance of programmed cell death 1 (PD-1) or PD-1 ligand 1 (PD-L1) Expression in epithelial-originated cancer: a meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2015; 94(6):e515.
- Kim K.S., Sekar R.R., Patil D., Dimarco M.A., Kissick H.T., Bilen M.A. et al. Evaluation of programmed cell death protein 1 (PD-1) expression as a prognostic biomarker in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Oncimmunology*. 2018; 7(4):e1413519.
- Choi Y.Y., Kim H., Shin S.J., Kim H.Y., Lee J., Yang H.K. et al. Microsatellite Instability and Programmed Cell Death-Ligand 1 Expression in Stage II/III Gastric Cancer: Post Hoc Analysis of the CLASSIC Randomized Controlled study. *Ann. Surg.* 2019; 270(2):309–16.
- Zhu X., Lang J. Soluble PD-1 and PD-L1: predictive and prognostic significance in cancer. *Oncotarget*. 2017; 8(57):97671–82.
- Ding Y., Sun C., Li J., Hu L., Li M., Liu J., Pu L., Xiong S. The Prognostic Significance of Soluble Programmed Death Ligand 1 Expression in Cancers: A Systematic Review and Meta-analysis. *Scand. J. Immunol.* 2017; 86(5):361–67.
- Wei W., Xu B., Wang Y., Wu C., Jiang J., Wu C. Prognostic significance of circulating soluble programmed death ligand-1 in patients with solid tumors: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2018; 97(3):e9617.
- Kushlinskii N.E., Gershtein E.S., Utkin D.O., Petrikova N.A., Kushlinsky D.N., Shabanov M.A. et al. Signaling pathway components of immune checkpoint PD-1/PD-L1 in blood plasma of patients with ovarian cancer and benign ovarian tumors: clinical and morphological correlations. *Akusherstvo i ginekologiya*. 2020; 6: 80–8. (in Russian)
- Kushlinskii N.E., Gershtein E.S., Goryacheva I.O., Morozov A.A., Alferov A.A., Bezhanova S.D. et al. Soluble forms of the PD-1 immunity control point receptor and its PD-L1 ligand in the blood serum of patients with renal cell carcinoma: clinical and morphological correlations. *Oncourologiya*. 2019; 15(1):15–22. (in Russian)
- Gershtein E.S., Ognerubov N.A., Chang V.L., Delektorskaya V.V., Kороткова Е.А., Соколов Н.Ю. et al. The content of the soluble forms PD-1 and PD-L1 in blood serum of patients with gastric cancer and their relationship with clinical and morphological characteristics of the disease. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2020; 65(6): 347–52. (in Russian)
- Huang X., Zhang W., Zhang Z., Shi D., Wu F., Zhong B., Shao Z. Prognostic Value of Programmed Cell Death 1 Ligand-1 (PD-L1) or PD-1 Expression in Patients with Osteosarcoma: A Meta-Analysis. *J. Cancer*. 2018; 9(14):2525–31.
- Kabir T.F., Chauhan A., Anthony L., Hildebrandt G.C. Immune Checkpoint Inhibitors in Pediatric Solid Tumors: Status in 2018. *Ochsner J. Winter*. 2018; 18(4):370–6.
- Raj S., Bui M., Gonzales R., Letson D., Antonia S.J. Impact of PDL1 expression on clinical outcomes in subtypes of sarcoma. *Ann. Oncol.* 2014; 25:494–510.
- Shen J.K., Cote G.M., Choy E., Yang P., Harmon D., Schwab J. et al. Programmed cell death ligand 1 expression in osteosarcoma. *Cancer Immunol. Res.* 2014; 2(7):690–8.
- Zhu Z., Jin Z., Zhang M., Tang Y., Yang G., Yuan X., Yao J., Sun D. Prognostic value of programmed death-ligand 1 in sarcoma: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2017; 8(35):59570–80.
- Kostine M., Cleven A.H., de Miranda N.F., Italiano A., Cleton-Jansen A.M., Bovee J.V. Analysis of PD-L1, T-cell infiltrate and HLA expression in chondrosarcoma indicates potential for response to immunotherapy specifically in the dedifferentiated subtype. *Mod. Pathol.* 2016; 29(9):1028–37.
- Torabi A., Amaya C.N., Wians F.H. Jr., Bryan B.A. PD-1 and PD-L1 expression in bone and soft tissue sarcomas. *Pathology*. 2017; 49(5): 506–13.
- Yang X., Zhu G., Yang Z., Zeng K., Liu F., Sun J. Expression of PD-L1/PD-L2 is associated with high proliferation index of Ki-67 but not with TP53 overexpression in chondrosarcoma. *Int. J. Biol. Markers*. 2018; 33(4): 507–13.
- Kushlinskii N.E., Alferov A.A., Timofeev Yu.S., Gershtein E.S., Boulytcheva I.V., Bondarev A.V. et al. Key immune checkpoint PD-1/PD-L1 signaling pathway components in blood serum of bone tumor patients. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2020; 170(7):79–83. (in Russian)

Поступила 03.09.20

Принята к печати 03.10.20

ГЕМАТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Бородулина Е.А.¹, Васнева Ж.П.², Бородулин Б.Е.¹, Вдоушкина Е.С.¹, Поваляева Л.В.¹, Матееску К.А.¹

ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПРИ ПОРАЖЕНИЯХ ЛЕГКИХ, ВЫЗВАННЫХ ИНФЕКЦИЕЙ COVID-19

¹ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 443099, Самара, Россия;

²АО «Самарский диагностический центр», 443093, Самара, Россия

В период пандемии новой коронавирусной инфекции одним из самых грозных осложнений является пневмония. При поступлении в специализированное пульмонологическое отделение наличие пневмонии подтверждается компьютерной томографией (КТ), этиологию подтверждают обнаружением РНК SARS-CoV-2 методом ПЦР. В статье анализируются показатели общего анализа крови при поступлении пациентов в стационар. Все поступившие пациенты были разделены на 2 группы. Первая группа исследования – новая коронавирусная инфекция COVID-19, подтверждена обнаружением РНК вируса SARS-CoV-2 методом ПЦР (n=27). Вторая группа – 65 пациентов (70,7%) с поражением легочной ткани, характерной для COVID-19 по данным КТ, имевшие отрицательный анализ ПЦР на обнаружение РНК SARS-CoV-2. Статистически значимые отклонения проявлялись в снижении процентного и абсолютного содержания лимфоцитов, моноцитов и тромбоцитов, повышении нейтрофилов. При сравнительном анализе в группах с положительным и отрицательным анализом ПЦР на обнаружение РНК SARS-CoV-2 статистически значимых отличий не выявлено. Можно предположить, что при схожести клинических проявлений и данных компьютерной томографии при отрицательном результате ПЦР- РНК SARS-CoV-2 может ставиться диагноз «Поражение легких, вызванное инфекцией COVID-19».

Ключевые слова: *коронавирусная инфекция; пандемия; COVID-19; SARS-CoV-2; компьютерная томография; пневмония; гематологический анализ.*

Для цитирования: Бородулина Е.А., Васнева Ж.П., Бородулин Б.Е., Вдоушкина Е.С., Поваляева Л.В., Матееску К.А. Гематологические показатели при поражениях легких, вызванных инфекцией COVID-19. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65 (11): 676-682. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-11-676-682>

Borodulina E. A.¹, Vasneva Zh. P.², Borodulin B. E.¹, Vdoushkina E. S.¹, Povalyayeva L. V.¹, Mateesku K. A.¹

HEMATOLOGICAL INDICATORS FOR LUNG DAMAGE CAUSED BY COVID-19 INFECTION

¹«Samara state medical University» of the Ministry of Health of Russia, 443099, Samara, Russia;

²«Samara diagnostic center», 443093, Samara, Russia

During the pandemic of a new coronavirus infection one of the most serious complications is pneumonia. When entering a specialized pulmonology Department, the presence of pneumonia is confirmed by computed tomography (CT), the etiology is confirmed by the detection of SARS-CoV-2 RNA by PCR, the article analyzes the indicators of blood analysis when patients are admitted to the hospital. All admitted patients were divided into 2 groups. Group 1 of the study – with a new coronavirus infection Covid-19, confirmed by the detection of PCR-RNA SARS-CoV-2 (n=27). Group 2 consisted of 65 patients (70.7%) with lung tissue damage characteristic of Covid-19 according to CT, who had a negative analysis of PCR-RNA SARS-CoV-2. Statistically significant deviations were shown in a decrease in the percentage and absolute content of lymphocytes, monocytes and platelets, and an increase in neutrophils. The comparative analysis in the groups with positive and negative PCR analysis for the detection of SARS-CoV-2 RNA showed no statistically significant differences. It can be assumed that with the similarity of clinical manifestations and CT-data, a negative result of PCR-RNA SARS-CoV-2 can be diagnosed as «lung damage caused by COVID-19 infection».

Key words: *coronavirus infection, pandemic, COVID-19, SARS-CoV-2, computed tomography, pneumonia, hematological analysis.*

For citation: Borodulina E. A., Vasneva Zh. P., Borodulin B. E., Vdoushkina E. S., Povalyayeva L. V., Mateesku K. A. Hematological indicators for lung damage caused by COVID-19 infection. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65(11): 676-682 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-11-676-682>

Information about authors:

Borodulina E.A., ORCID ID 0000-0002-3063-1538;

Vasneva Zh.P., ORCID ID 0000-0001-7024-7031;

Borodulin B.E., ORCID ID 0000-0002-8847-9831;

Vdoushkina E.S., ORCID ID 0000-0003-0039-6829;

Povalyayeva L.V., ORCID ID 0000-0002-2546-1837;

Mateesku K.A., ORCID ID 0000-0003-0165-7365.

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Conflict of interests. *The authors declare absence of conflict of interests.*

Received 04.08.2020

Accepted 15.08.2020

Введение. Заболеваемость инфекциями дыхательных путей отмечается ежегодно, при этом наблюдается их сезонность в одни и те же периоды. За последние десять лет было несколько пандемических вспышек вирусных инфекций, все они характеризовались выраженной пневмотропностью, приводящей к развитию пневмоний, являющихся основной причиной смерти.

С января 2020 г. весь мир столкнулся с глобальным распространением инфекции, вызванной β -коронавирусом SARS-CoV-2. ВОЗ объявила новое заболевание пандемией COVID-19 и ознаменовала ее как чрезвычайную ситуацию в области общественного здравоохранения, имеющей международное значение [1,2].

По официальным данным в России первые случаи коронавирусной инфекции появились с начала апреля 2020 г. Уже к концу апреля общее число заразившихся составило 106 498 человек (прирост 4840 человек в день). Доказанных методов лечения COVID-19 пока не существует. До настоящего времени продолжаются исследования по ее изучению во всем мире. Известно, что начинается заболевание с респираторных симптомов, похожих на грипп или другие ОРВИ, есть данные, что заболевание может протекать с другими проявлениями, вплоть до бессимптомного течения, при этом пациент может быть носителем инфекции и распространять ее [3].

Применяемые диагностические тесты для идентификации возбудителя не всегда позволяют поставить диагноз, результаты теста зависят от технических особенностей забора биоматериала, от фазы болезни, от фирмы производителя тест-системы. В период пандемии часть стран отказалась от массового тестирования на COVID-19, связанного с большими материальными затратами и проблем с диагностической надежностью тест-систем при схожести клинических проявлений на фоне огромного числа пациентов [3].

Данные литературы свидетельствуют о том, что при развитии COVID-19 происходят изменения некоторых лабораторных (невирусологических) показателей крови. Выраженность изменений этих показателей тесно взаимосвязана с тяжестью течения инфекции [4]. При первичном обследовании пациентов обязательным является общий анализ крови (ОАК). Количественные гематологические отклонения были описаны в первых исследованиях «ковидных» пациентов. В ряде случаев инфекция прогрессировала, минуя промежуточные стадии, от локальной в верхних дыхательных путях (ВДП) до вирусной пневмонии с ярко выраженными воспалительными реакциями всего организма, что приводило к острой респираторной недостаточности и мультиорганной патологии.

Цель – изучить особенности общего анализа крови у пациентов, поступающих в стационар с новой коронавирусной инфекцией COVID-19 и поражением легких.

Материал и методы. В период коронавирусной пандемии с 08.05.2020 по 10.06.2020 г. в рамках одномоментного (cross-sectional) исследования был проведен анализ показателей ОАК у 92 пациентов, поступивших в стационар с диагнозом «пневмония». Все поступившие пациенты были разделены на 2 группы. Первая группа исследования – 27 пациентов (29,3%), у которых новая коронавирусная инфекция COVID-19 подтверждена обнаружением РНК вируса SARS-CoV-2 методом ПЦР. Вторую группу составили 65 пациентов (70,7%) с поражением легочной ткани, характерной для COVID-19 по данным компьютерной томографии (КТ), имевшие отрицательный анализ ПЦР на обнаружение РНК вируса

SARS-CoV-2, им был поставлен диагноз «Новая коронавирусная инфекция COVID-19, высоковероятная по КТ».

Критерии включения: возраст пациента от 18 лет, житель г. Самара, наличие информированного согласия, наличие пневмонических изменений в легочной ткани по результатам КТ, высоковероятно подтверждающих специфичный генез COVID-19, наличие ПЦР исследования на обнаружение РНК коронавируса SARS-CoV-2.

Показанием для госпитализации в специализированное инфекционное отделение для оказания медицинской помощи больным с COVID-19 было наличие одного или более из признаков: сатурация кислорода в периферической крови менее 95%, пневмония с поражением более 20% легочной ткани, подтвержденной данными компьютерной томографии легких, возраст более 65 лет, температура выше 38,5°C более 3 дней, наличие хронических заболеваний. В качестве контрольных показателей общего анализа крови использовали данные 20 здоровых жителей Самарской области. Обследование проводилось в отделе лабораторной диагностики АО «Самарского диагностического центра» с использованием гематологического анализатора Medonic M20 (Швеция).

Всем пациентам при поступлении проводился тест для качественного выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 в образцах, полученных из назальных и/или назофарингеальных мазков с использованием тест-системы «РеалБест РНК SARS-CoV-2» методом ОТ-ПЦР (ПЦР в обратной транскрипции). Общий клинический анализ крови (ОАК) выполнялся с использованием гематологического анализатора Medonic M20 (Швеция).

Изучались лабораторные показатели общего анализа крови – скорость оседания эритроцитов (СОЭ), уровень гемоглобина, абсолютное количество эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, анализ лейкоцитарной формулы (% содержание эозинофилов, базофилов, лимфоцитов, моноцитов, палочкоядерных нейтрофилов, сегментоядерных нейтрофилов).

Интегральный показатель – индекс сдвига лейкоцитов (ИСЛ) – определяли по отношению суммы нейтрофилов, эозинофилов и базофилов к сумме мононуклеаров (лимфоцитов и моноцитов). В качестве референс-значения брали $1,96 \pm 0,04$.

Статистическую обработку проводили с использованием программы Software SPSS 5.0 (SPSS Inc.). Расчет размера выборки был произведен с использованием номограммы Альтмана. Соответствие нормальному закону распределения определяли с помощью критерия Колмогорова–Смирнова с поправкой Лиллиефорса. В случае соответствия характера распределения нормальному использовали среднее арифметическое (Хср.) и стандартное отклонение (SD). В случае отклонения распределения от нормального использовали Медиану (Me), 25- и 75-квартили, для сравнения средних значений – ранговый критерий Манна–Уитни. Уровень значимости (p) принимали менее 0,05. Корреляционный анализ проводили с использованием коэффициента Спирмана (R).

Результаты и обсуждение. В группе пациентов, поступивших на стационарное лечение, было 35,9% ($n=33$) женщин, 64,1%, мужчин ($n=59$), средний возраст обследуемых составил $59 \pm 1,2$ лет. При поступлении температура тела в среднем составила 37,5°C (36,6 – 39,7), до 37°C температура была у 30,43% ($n=28$) больных, от 37,1 – 38°C – у 53,3% ($n=49$), 38,1 – 39°C – у 14,1% больных ($n=13$), выше 39,1°C – у 2,17% ($n=2$). Сатурация кислорода периферической крови при поступлении составила

менее 89% у 5,43% ($n=5$), 90 – 94% – у 31,5% ($n=29$), 95 – 99% – у 63,04% ($n=58$). При анализе данных КТ у 94,57% пациентов отмечалось двустороннее поражение легочной ткани ($n=87$). Объем поражения легких до 25% был в 20,7% ($n=19$), от 25 до 50% – в 60,9% ($n=56$), от 50 до 75% – в 11,9% ($n=11$), от 75 до 90% – в 6,5% ($n=6$) случаев.

Анализ результатов проведенных исследований показал, что РНК вируса SARS-CoV-2 методом ПЦР была обнаружена в 29,3% случаев ($n=27$).

Предварительно проведенный анализ характера распределения показателей ОАК с использованием критерия Колмогорова–Смирнова показал, что в группе пациентов с COVID-19 отмечался нормальный характер распределения значений показателей ОАК, за исключением содержания лейкоцитов ($p=0,001$). В 1 группе пациентов с COVID-19 и положительными результатами ПЦР на обнаружение РНК SARS-CoV-2 только распределение значений эозинофилов не соответствовало нормальному ($p=0,04$). В группе пациентов с COVID-19 и отрицательными результатами ПЦР–теста на РНК SARS-CoV-2 не нормальный характер распределения наблюдался среди показателей уровня лейкоцитов ($p=0,003$) и эозинофилов ($p=0,003$). В связи с тем, что в ряде случаев характер распределения показателей ОАК отклонялся от нормального, при сравнении средних значений использовали критерий Манна–Уитни.

Анализ показателей ОАК пациентов с COVID-19 ($n=92$) показал, что их средние значения, за исключением СОЭ и ИСЛ, не выходили за рамки референсных значе-

ний. Однако, при сравнении показателей ОАК пациентов с таковыми группы здоровых было выявлено достоверное снижение процентного и абсолютного содержания лимфоцитов, тромбоцитов и повышение процентного содержания нейтрофилов (табл.1). Аналогичные результаты были получены и другими исследователями [5,16,17].

Более детальный анализ особенностей распределения значений показателей абсолютного содержания лейкоцитов у пациентов совокупной группы показал, что в 56,5% случаев таковые находились в пределах референсных значений (рис. 1).

В группе исследования в 26,0% случаев отмечалась лейкопения ($< 4,0 \times 10^9$ кл/л), минимальный показатель уровня лейкоцитов был не ниже $1,2 \times 10^9$ кл/л. В 17,4% случаев наблюдался лейкоцитоз ($> 9,0 \times 10^9$ кл/л) (рис.1, табл.1). В исследованиях зарубежных авторов отмечалось более выраженное превалирование пациентов с лейкопенией в ОАК – в 49% случаев группы пациентов с коронавирусной инфекцией уровень лейкоцитов был ниже $1,1 \times 10^9$ кл/л, лейкопения наблюдалась у 33,7% пациентов с коронавирусной инфекцией на момент госпитализации [5,16].

В среднем по исследуемой группе пациентов с коронавирусной инфекцией отмечалось значительное снижение процентного и абсолютного содержания лимфоцитов на 32,9% и 31,3%, соответственно ($p = 0,0001$) (см.табл.1). Детальный анализ распределения значений уровня лимфоцитов пациентов исследуемой группы показал, что в 59,7% случаев лимфоциты находились в пределах референсных значений, в 38% ($n=35$) отмеча-

Таблица 1

Показатели ОАК группы контроля и группы исследования

| Показатель (референсные значения) | Группа контроля ($n = 20$) | | Группа исследования ($n = 92$) | | P |
|---|---------------------------------|------------------------|-------------------------------------|-----------------------|--------|
| | Хср.± SD / [min – max] | Me / [25кв-75кв] | Хср.± SD / min – max | Me / [25кв-75кв] | |
| Лейкоциты, $\times 10^9$ кл/л [4 – 9] | 5,5 ± 1,7 [2,9 – 10] | 5,5 [4 – 6,3] | 6,13 ± 3,46 [1,2 – 16,7] | 5 [3,9 – 6,8] | 0,87 |
| Лимфоциты, % [20 – 50] | 36,2 ± 8,3 [21,2 – 50] | 36,6 [29,35-44,17] | 24,3 ± 10,3 [3 – 55] | 24 [17,25-30] | 0,0001 |
| Лимфоциты, $\times 10^9$ кл/л [1,1 – 3,2] | 1,95 ± 0,5 [1,3 – 3,4] | 1,8 [1,5 – 2,27] | 1,34 ± 0,72 [0,2 – 4,16] | 1,25 [0,8 – 1,8] | 0,0001 |
| Эритроциты, $\times 10^{12}$ кл/л [3,8 – 5,6] | 4,3 ± 0,75 [2,6 – 6] | 4,2 [3,8 – 4,55] | 4,4 ± 0,58 [2,2 – 5,68] | 4,5 [4 – 4,9] | 0,15 |
| Тромбоциты, $\times 10^9$ кл/л [180 – 320] | 219 ± 61,6 [129 – 390] | 228,5 [172-240,5] | 190,1 ± 82 [35,4 – 418] | 176,5 [122,75-233] | 0,03 |
| СОЭ, мм/ч [2 – 15] | 5,35 ± 1,09 [3 – 7] | 5 [5 – 6] | 16,4 ± 11,76 [2 – 65] | 14 [7,5 – 21,75] | 0,0001 |
| Гемоглобин, г/л [120 – 170] | 133, ± 25,2 [86 – 190] | 126,5 [121,2-140,2] | 134 ± 22,6 [67 – 247] | 134 [123-147,25] | 0,37 |
| Нейтрофилы, % [48,5 – 84] | 56,5 ± 9 [42 – 72,8] | 55,4 [2,4 – 4,1] | 68,2 ± 10,1 [37 – 87] | 68,5 [62 – 75,75] | 0,001 |
| Нейтрофилы палочкоядерные, % [1 – 6] | - | - | 4 ± 2,3 [0 – 17] | 4 [3 – 5,75] | |
| Нейтрофилы сегментоядерные, % [45 – 80] | - | - | 64,3 ± 10,56 [32 – 86] | 64 [57,25-72,75] | |
| Эозинофилы, % [0,5 – 5] | 5,35 ± 1,09 [3 – 7] | 5 [5 – 6] | 1,6 ± 1,1 [0 – 4] | 1 [1 – 2] | 0,0001 |
| Моноциты,% [3 – 11] | 7,9 ± 1,76 [5 – 12,3] | 7,65 [6,6 – 9] | 5,7 ± 1,9 [2 – 11] | 6 [4 – 7] | 0,0001 |
| ИСЛ, ед. [1,96 ± 0,4] | - | - | 2,96 ± 2,3 [0,61 – 19] | 2,26 [1,8 – 3,2] | |

Примечание. – – нет данных, min – минимальное значение, max – максимальное значение, 25кв – 25-й квартиль, 75кв – 75-й квартиль. Здесь и в табл. 2-4: p – уровень значимости по критерию Манна – Уитни.

лась лимфопения и только в 3,2% ($n=3$) – лимфоцитоз (рис. 2).

По данным зарубежных авторов, у пациентов с «ковидной» пневмонией лимфопения наблюдалась от 26 до 84% случаев [7]. При этом рядом авторов было отмечено, что в острую фазу заболевания уровень лимфоцитов был на 19,6% ниже, чем при выздоровлении [5,16,17]. Прямая корреляция клинической картины со степенью выраженности лимфопении у «ковидных» пациентов была подтверждена и в результате многофакторного регрессионного анализа [17]. Аналогичные выводы встречаются и в других исследованиях, стойкая лимфопения ($0,42-0,67 \times 10^9$ кл/л) отмечалась в 76% случаев при летальных исходах, тогда как у выздоровевших пациентов только в 26%. В процессе выздоровления уровень лимфоцитов повышался до $1,08-1,43 \times 10^9$ кл/л [18]. У пациентов с «нековидной» пневмонией лимфоцитопения наблюдалась значительно реже – в 16,7% [16,19].

Анализ данных, представленных на рис.3, показывает, что в 40% ($n=37$) общего анализа крови лейкоциты и лимфоциты по абсолютному содержанию находились в пределах референсных значений. В 20,6% ($n=19$) пациентов отмечалась одновременно как лейкопения, так и лимфоцитопения. Лимфоцитопения на фоне нормального содержания лейкоцитов была в 16,3% ($n=15$), лимфоцитопения ($<1,1 \times 10^9$ кл/л) на фоне лейкоцитоза ($> 9,0 \times 10^9$ кл/л) наблюдалась в 3,2% ($n=3$), ИСЛ достигал 8,0. Лимфоцитоз, наблюдавшийся в 3,2% ($n=3$) группы исследования пациентов, во всех случаях сопровождался лейкоцитозом (рис. 3).

Нами был проведен сравнительный анализ средних значений показателей ОАК в группе ПЦР(+) и ПЦР(-) пациентов относительно таковых здоровых. Было получено, что в группе ПЦР(+) и в группе ПЦР(-) отмечается достоверное снижение процентного и абсолютного содержания лимфоцитов, моноцитов и тромбоцитов, повышение нейтрофилов относительно таковых здоровых (табл. 2, 3).

Однако сравнительный анализ средних значений показателей ОАК не выявил достоверных различий таковых в группах ПЦР(+) и ПЦР(-) (табл.4).

Однако нами было отмечено, что у ПЦР(+)-пациентов лейкопения и лимфоцитопения отмечалась в 1,7 и 1,4 раз чаще (37% случаев против 21,5% и 48,15% против 33,8% случаев), соответственно, чем в группе ПЦР(-) пациентов (см.рис.1,2). Аналогичные результаты были получены и другими авторами – лимфопения у ПЦР(+) пациентов с коронавирусной инфекцией наблюдается в 54,8% случаев [16]. Уровень лейкоцитов в группе 380 пациентов с COVID-19 составлял $1,19 (0,08 - 4,9 \times 10^9$ кл/л), в группе ПЦР(+) таковой был достоверно ниже ($p < 0,01$) и составлял $1,03 (0,08 - 4,22 \times 10^9$ кл/л) против $1,7 (0,14 - 4,9 \times 10^9$ кл/л) ПЦР(-) пациентов.

Лейкоцитоз (более $9,0 \times 10^9$ кл/л) нами отмечался в равной степени как в группе ПЦР(+), так и в группе ПЦР(-) (см.рис.1).

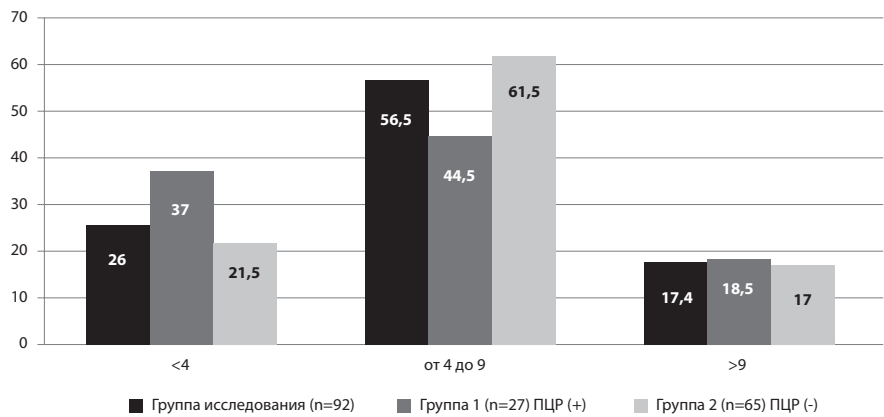


Рис. 1. Распределение показателей количества лейкоцитов ($\times 10^9$ кл/л) у пациентов соковой группы, пациентов с положительными (ПЦР+) и отрицательными (ПЦР-) результатами ПЦР на обнаружение РНК SARS-CoV-2, %.

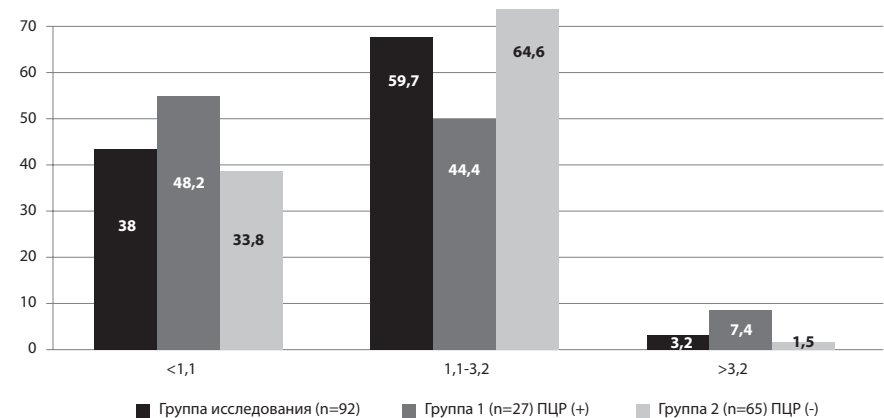


Рис. 2. Распределение показателей количества лимфоцитов ($\times 10^9$ кл/л) у пациентов группы исследования, пациентов с положительными (ПЦР(+)) и отрицательными (ПЦР(-)) результатами ПЦР на обнаружение РНК SARS-CoV-2, %.

Анализ распределения значений интегрального показателя ИСЛ в группе исследования показал, что в 59,8% случаев таковой превышал 2,0, что отмечают и другие авторы [6, 18, 20].

Более детальный анализ особенностей показателей ОАК внутри группы пациентов, у которых число лейкоцитов находилось в пределах референсных значений и в среднем составляло $4,5 \times 10^9$ кл/л, показал, что у ПЦР(+)-пациентов результаты регистрировались в 27,45% случаев. Кроме того, на фоне нормального среднего показателя относительного уровня лимфоцитов (22,46%) отмечалась выраженная лимфопения ($1,1 \times 10^9$ кл/л), что сопровождалось и повышенным значением ИСЛ (2,64).

При проведении корреляционного анализа были выявлены достоверные прямые корреляционные взаимосвязи показателей уровня лимфоцитов и моноцитов у пациентов с положительными результатами ПЦР. Обратная корреляционная связь отмечалась между показателями СОЭ и процентным содержанием эозинофилов (табл. 5).

Не было выявлено достоверных корреляционных связей между показателями ОАК пациентов с коронавирусной инфекцией и возрастом. Лейкоцитопения, пониженный уровень гемоглобина и повышение ИСЛ в слабой степени коррелировали с женским полом пациентов.

Количественные гематологические отклонения на этапе первичного обследования пациентов имеют перво-

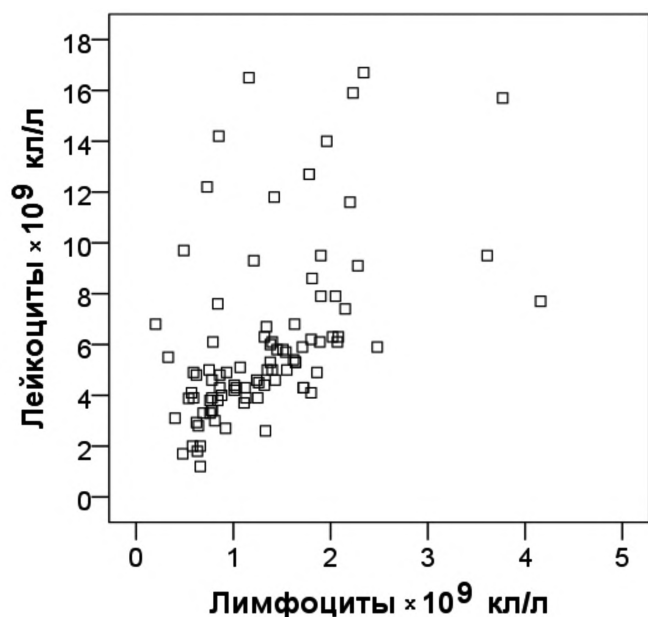


Рис.3. Распределение показателей уровней лейкоцитов ($\times 10^9$ кл/л) и лимфоцитов ($\times 10^9$ кл/л) у пациентов группы исследования ($n = 92$).

степенное значение и были описаны в первых исследованиях «ковидных» пациентов. Было показано, что наиболее общими гематологическими изменениями являются: лимфоцитопения [4-7], нейтрофилия [4, 8-10], эозинопения [11,12], выраженная тромбоцитопения (35%) или менее выраженный тромбоцитоз [4,13]. Так же в единичных исследованиях было отмечено присутствие атипичных

лимфоцитов и лейко-эритробластоз [14-16]. По данным многих исследователей, количественные параметры клеток крови очень гетерогенны. Было показано, что абсолютное число нейтрофилов у 35% пациентов повышалось в первые дни госпитализации более чем 5×10^9 кл/л. До или после начала лечения в течение недели отмечалась тенденция к снижению такового до $1,48 - 3,23 \times 10^9$ кл/л у половины из этих пациентов [21].

Наличие в периферической крови циркулирующих плазмоцитоидных лимфоцитов отмечается и в работе зарубежных авторов, это является специфичным для «ковидной» инфекции, так как плазмоцитоидные лимфоциты отсутствуют в ПК здоровых людей и инфицированных другими вирусами (гриппа, вируса Эпштейн – Барра, парвовируса В19) [16].

Заключение. У пациентов, поступивших на стационарное лечение с поражением легких в период пандемии COVID-19, положительные анализы РНК вируса SARS-CoV-2 методом ПЦР были обнаружены только в 29,3% случаев. Достоверных отличий показателей ОАК у пациентов с положительными и отрицательными результатами ПЦР не выявлено. При общности клинико-рентгенологической картины, при оценке показателя общего анализа крови при COVID-19 в группе ПЦР(+) пациентов и в группе ПЦР(-) пациентов отмечается достоверное снижение процентного и абсолютного содержания лимфоцитов, моноцитов и тромбоцитов и повышение нейтрофилов. В группе с ПЦР (+) лейкопения и лимфоцитопения отмечалась в 1,7 и 1,4 раз чаще чем в группе ПЦР(-). Выявлены достоверные прямые корреляционные взаимосвязи показателей уровня лимфоцитов и моноцитов у пациентов с положительными результатами ПЦР, обратная корреляционная связь между показателями СОЭ и процентным содержанием эозинофилов. Не было выявлено достоверных корреляционных связей

Таблица 2

Показатели ОАК пациентов с положительными результатами ПЦР тестов на обнаружение РНК SARS-CoV-2 (ПЦР(+)), %

| Показатели | Здоровые, $n = 20$ | | ПЦР(+), $n = 27$ | | p |
|--|--------------------------------|------------------------|----------------------------------|--------------------|--------|
| | Хср. \pm SD / [min – max] | Me / [25кв-75кв] | Хср. \pm SD/ [min – max] | Me/ [25кв-75кв] | |
| Лейкоциты, $\times 10^9$ кл/л [4 – 9] | $5,5 \pm 1,7$ [2,9 – 10] | 5,5 [4 – 6,3] | $5,66 \pm 3,6$ [1,7-15,7] | 4,3 [3,3 – 7,9] | 0,3 |
| Лимфоциты, % [20 – 50] | $36,2 \pm 8,3$ [21,2 – 50] | 36,6 [29,35-44,17] | $25 \pm 10,9$ [5-51] | 24 [19 – 31] | 0,0001 |
| Лимфоциты, $\times 10^9$ кл/л [1,1 – 3,2] | $1,95 \pm 0,5$ [1,3 – 3,4] | 1,8 [1,5 – 2,27] | $1,3 \pm 0,87$ [0,33-3,77] | 1 [0,6 – 1,8] | 0,001 |
| Эритроциты, $\times 10^{12}$ кл/л [3,8 – 5,6] | $4,3 \pm 0,75$ [2,6 – 6] | 4,2 [3,8 – 4,55] | $4,36 \pm 0,55$ [3,1-5,1] | 4,5 [4 – 4,9] | 0,33 |
| Тромбоциты, $\times 10^9$ кл/л [180 – 320] | $219 \pm 61,6$ [129 – 390] | 228,5 [172-240,5] | $177,2 \pm 82,2$ [35,4-357,0] | 148 [118 – 210] | 0,021 |
| СОЭ, мм/ч [2 – 15] | $5,35 \pm 1,09$ [3 – 7] | 5 [5 – 6] | $18,37 \pm 13$ [3-55] | 17 [9 – 23] | 0,0001 |
| Гемоглобин, г/л [120 – 170] | $133,1 \pm 25,2$ [86 – 190] | 126,5 [121,2-140,2] | $132,4 \pm 21,4$ [68-170] | 134 [125 – 146] | 0,35 |
| Нейтрофилы, % [48,5 – 84] | $56,5 \pm 9$ [42 – 72,8] | 55,4 [2,4 – 4,1] | 68 ± 10 [46 – 87] | 69 [60 – 76] | 0,001 |
| Нейтрофилы палочкоядерные, % [1 – 6] | - | - | $1,4 \pm 1,1$ [0-4] | 1 [1 – 2] | - |
| Нейтрофилы сегментоядерные, % [45 – 80] | $7,9 \pm 1,76$ [5 – 12,3] | 7,65 [6,6 – 9] | $5,8 \pm 1,75$ [3-11] | 6 [4 – 8] | 0,001 |
| Эозинофилы, % [0,5 – 5] | - | - | $2,74 \pm 1,75$ [0,85-9] | 2,26 [1,56 – 3] | - |

Таблица 3

Показатели ОАК пациентов с коронавирусной инфекцией и отрицательными результатами ПЦР тестов на обнаружение РНК SARS-CoV-2, (ПЦР(-))

| Показатели | Группа контроля, n = 20 | | ПЦР(-), n = 65 | | p |
|---|----------------------------|------------------------|---------------------------|---------------------|--------|
| | Хср. ± SD / [min – max] | Me / [25кв-75кв] | Хср. ± SD [min – max] | Me/ [25кв-75кв] | |
| Лейкоциты, x10 ⁹ кл/л [4 – 9] | 5,5 ± 1,7 [2,9 – 10] | 5,5 [4 – 6,3] | 6,3 ± 3,4 [1,2-16,7] | 5,3 [4,3 – 6,8] | 0,8 |
| Лимфоциты, % [20 – 50] | 36,2 ± 8,3 [21,2 – 50] | 36,6 [29,35-44,17] | 24 ± 10,1 [3-55] | 24 [16 – 30] | 0,0001 |
| Лимфоциты, x10 ⁹ кл/л [1,1 – 3,2] | 1,95 ± 0,5 [1,3 – 3,4] | 1,8 [1,5 – 2,27] | 1,36 ± 0,65 [0,2-4,16] | 1,34 [0,8 – 1,8] | 0,0001 |
| Эритроциты, x10 ¹² кл/л [3,8 – 5,6] | 4,3 ± 0,75 [2,6 – 6] | 4,2 [3,8 – 4,55] | 4,46 ± 0,6 [2,2-5,68] | 4,5 [4,1 – 4,9] | 0,13 |
| Тромбоциты, x10 ⁹ кл/л [180 – 320] | 219 ± 61,6 [129 – 390] | 228,5 [172-240,5] | 195,7 ± 82 [76-418] | 180 [125 – 236] | 0,07 |
| СОЭ, мм/ч [2 – 15] | 5,35 ± 1,09 [3 – 7] | 5 [5 – 6] | 15,6 ± 11,2 [2-65] | 14 [6,5 – 20] | 0,0001 |
| Гемоглобин, г/л [120 – 170] | 133,1 ± 25,2 [86 – 190] | 126,5 [121,2-140,2] | 134,6 ± 23,2 [67-247] | 134 [123 – 148] | 0,44 |
| Нейтрофилы, % [48,5 – 84] | 56,5 ± 9 [42 – 72,8] | 55,4 [2,4 – 4,1] | 68,6 ± 10,7 [37 – 94] | 69 [62 – 76] | 0,0001 |
| Нейтрофилы палочкоядерные, % [1 – 6] | - | - | 1,67 ± 1,1* [0-4] | 2 [1 – 2] | |
| Нейтрофилы сегментоядерные, % [45 – 80] | 7,9 ± 1,76 [5 – 12,3] | 7,65 [6,6 – 9] | 5,66 ± 1,87 [2-11] | 6 [4 – 7] | 0,0001 |
| Эозинофилы, % [0,5 – 5] | - | - | 3 ± 2,56 [0,6-19] | 2,3 [1,9 – 3,35] | |

Таблица 4

Показатели ОАК пациентов с коронавирусной инфекцией

| Показатели | ПЦР(+) (n = 27) | | ПЦР(-) (n = 65) | | p |
|---|------------------------------|--------------------|---------------------------|---------------------|------|
| | Хср. ± SD [min – max] | Me/ [25кв-75кв] | Хср. ± SD [min – max] | Me/ [25кв-75кв] | |
| Лейкоциты, x10 ⁹ кл/л [4 – 9] | 5,66 ± 3,6 [1,7-15,7] | 4,3 [3,3 – 7,9] | 6,3 ± 3,4 [1,2-16,7] | 5,3 [4,3 – 6,8] | 0,09 |
| Лимфоциты, % [20 – 50] | 25 ± 10,9 [5-51] | 24 [19 – 31] | 24 ± 10,1 [3-55] | 24 [16 – 30] | 0,74 |
| Лимфоциты, x10 ⁹ кл/л [1,1 – 3,2] | 1,3 ± 0,87 [0,33-3,77] | 1 [0,6 – 1,8] | 1,36 ± 0,65 [0,2-4,16] | 1,34 [0,8 – 1,8] | 0,2 |
| Эритроциты, x10 ¹² кл/л [3,8 – 5,6] | 4,36 ± 0,55 [3,1-5,1] | 4,5 [4 – 4,9] | 4,46 ± 0,6 [2,2-5,68] | 4,5 [4,1 – 4,9] | 0,6 |
| Тромбоциты, x10 ⁹ кл/л [180 – 320] | 177,2 ± 82,2 [35,4-357,0] | 148 [118 – 210] | 195,7 ± 82 [76-418] | 180 [125 – 236] | 0,3 |
| СОЭ, мм/ч [2 – 15] | 18,37 ± 13 [3-55] | 17 [9 – 23] | 15,6 ± 11,2 [2-65] | 14 [6,5 – 20] | 0,3 |
| Гемоглобин, г/л [120 – 170] | 132,4 ± 21,4 [68-170] | 134 [125 – 146] | 134,6 ± 23,2 [67-247] | 134 [123 – 148] | 0,95 |
| Нейтрофилы, % [48,5 – 84] | 68 ± 10 [46 – 87] | 69 [60 – 76] | 68,6 ± 10,7 [37 – 94] | 69 [62 – 76] | 0,68 |
| Нейтрофилы палочкоядерные, % [1 – 6] | 4,15 ± 1,7 [1-6] | 4 [3 – 6] | 4,1 ± 2,4 [1-17] | 4 [3 – 5] | 0,5 |
| Нейтрофилы сегментоядерные, % [45 – 80] | 63,7 ± 9,9 [45-83] | 63 [54 – 71] | 64,5 ± 10,9 [32-86] | 64 [58,5-73,5] | 0,6 |
| Эозинофилы, % [0,5 – 5] | 1,4 ± 1,1 [0-4] | 1 [1 – 2] | 1,67 ± 1,1 [0-4] | 2 [1-2] | 0,23 |
| Лейкоциты, x10 ⁹ кл/л [4 – 9] | 5,8 ± 1,75 [3-11] | 6 [4 – 8] | 5,66 ± 1,87 [2-11] | 6 [4 – 7] | 0,8 |
| Лимфоциты, % [20 – 50] | 2,74 ± 1,75 [0,85-9] | 2,26 [1,56 – 3] | 3 ± 2,56 [0,6-19] | 2,3 [1,9 – 3,35] | 0,66 |

Таблица 5

Корреляционные зависимости показателей ОАК от ПЦР(+)-тестирования пациентов с коронавирусной инфекцией, возраста и пола (R/p)

| Показатели | ПЦР(+) | Возраст | Пол |
|------------------------------------|--------------|------------|-------------|
| Лейкоциты, $\times 10^9$ /кл/л | -0,07/0,47 | 0,001/0,99 | -0,25/0,02 |
| Лимфоциты, % | 0,42/0,0001 | -0,13/0,17 | 0,1/0,36 |
| Лимфоциты, $\times 10^9$ /кл/л | 0,32/0,001 | -0,2/0,1 | -0,15/0,15 |
| Эритроциты, $\times 10^{12}$ /кл/л | -0,09/0,35 | -0,14/0,15 | -0,08/0,46 |
| Тромбоциты, $\times 10^9$ /кл/л | 0,14/0,14 | -0,11/0,23 | 0,02/0,8 |
| СОЭ, мм/ч | -0,37/0,0001 | 0,11/0,24 | 0,04/0,68 |
| Гемоглобин, г/л | -0,14/0,84 | 0,006/0,1 | -0,2/0,048 |
| Нейтрофилы, % | -0,4/0,0001 | 0,13/0,16 | -0,13/0,2 |
| Эозинофилы, % | -0,1/0,3 | 0,08/0,44 | 0,12/0,25 |
| Моноциты, % | 0,4/0,0001 | -0,12/0,9 | -0,003/0,98 |
| ИСЛ, ед. | 0,03/0,76 | -0,06/0,56 | 0,2/0,038 |

Примечание. R – коэффициент корреляции по Спирману, p – уровень достоверности.

между показателями ОАК пациентов с коронавирусной инфекцией и возрастом. Лейкоцитопения, пониженный уровень гемоглобина и повышение ИСЛ в слабой степени коррелировали с женским полом пациентов.

Таким образом, показатели общего анализа крови у пациентов с поражением легких, вызванной новой коронавирусной инфекцией SARS-CoV-2 характеризуются выраженной гетерогенностью динамики и в более чем половине случаев находятся в пределах референсных значений.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

3. Самородская И.В., Ключников И.В. Проблемы диагностики и лечения COVID-19 на клиническом примере. *Врач.* 2020; 31 (4): 19-25.
4. Абдуллаев Р.Ю., Комиссарова О.Г. Лабораторные проявления коронавирусной инфекции. *Врач.* 2020; 31(5): 3-5.

REFERENCES

1. Guo Y.R., Cao Q.D., Hong Z.S., Tan Y.Y., Shen S.D., Jin H.J. et al. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak-an update on the status. *Mil.Med. Res.* 2020; 7(1):11. DOI :10.1186/s40779-020-00240-0.
2. Phelan A.L., Katz R., Gostin L.O. The Novel Coronavirus Originating in Wuhan, Challenges for Global Health Governance. *JAMA.* 2020; 323(8):709-710. DOI:10.1001/jama.2020.1097.
3. Samorodskaya I.V., Klyuchnikov I.V. Problems of diagnosis and treatment of COVID-19 on a clinical example. *Vrach.* 2020; 31(4): 19-25. (in Russian)
4. Abdullaev R.Yu., Komissarova O.G. Laboratory manifestations of coronavirus infection. *Vrach.* 2020; 31(5): 3-5. (in Russian)
5. Guan W.J., Ni Z.Y., Hu Y., Liang W.H., Ou C.Q., He J.X., et al. China Medical Treatment Expert Group for Covid-19. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(18):1708-1720. DOI: 10.1056/NEJMoa2002032.
6. Ruan Q., Yang K., Wang W., Liang L., Song J. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan. *China Intensive CareMed.* 2020; 46(6):1294-7. DOI: 10.1007/s00134-020-05991-x.

7. Wang F., Nie J., Wang H., Zhao Q., Xiong Y., Deng L. et al. Characteristics of peripheral lymphocyte subset alteration in COVID-19 pneumonia. *J. Infect. Dis.* 2020; 221(11):1762-9. DOI: 10.1093/infdis/jiaa150.
8. Chen N., Zhou M., Dong X., Qu J., Gong F., Han Y. et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet.* 2020; 395(10223):507-13. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30211-30217.
9. Qian G.Q., Yang N.B., Ding F., Ma A.H.Y., Wang Z.Y., Shen Y.F. et al. Epidemiologic and clinical characteristics of 91 hospitalized patients with COVID-19 in Zhejiang, China: a retrospective, multi-centre case series. *QJM.* 2020; 113(7):474-81. DOI: 10.1093/qjmed/hcaa089.
10. Mo P., Xing Y., Xiao Y., Deng L., Zhao Q., Wang H. et al. Clinical characteristics of refractory COVID-19 pneumonia in Wuhan, China. *Clin. Infect. Dis.* 2020; ciaa270. DOI: 10.1093/cid/ciaa270.
11. Zhang J.J., Dong X., Cao Y.Y., Yuan Y.D., Yang Y.B., Yan Y.Q. et al. Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China. *Allergy.* 2020; 75(7):1730-41. DOI: 10.1111/all.14238.
12. Liu F., Xu A., Zhang Y., Xuan W., Yan T., Pan K. et al. Patients of COVID-19 may benefit from sustained lopinavir-combined regimen and the increase of eosinophil may predict the outcome of COVID-19 progression. *Int. J. Inf. Dis.* 2020; 95:183-91. DOI: 10.1016/j.ijid.2020.03.013.
13. Lippi G., Plebani M., Henry B.M. Thrombocytopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections: a meta-analysis. *Clin. Chim. Acta.* 2020; 506:145-8. DOI:10.1016/j.cca.2020.03.022.
14. Fan B.E., Chong V.C.L., Chan S.S.W., Lim G.H., Lim K.G.E., Tan G.B. et al. Hematologic parameters in patients with COVID-19 infection. *Am. J. Hematol.* 2020; 95(6): 131-4. DOI: 10.1002/ajh.25774.
15. Mitra A., Dwyre D.M., Schivo M., Thompson G.R., Cohen S.H., Ku N. et al. Leukoerythroblastic reaction in a patient with COVID-19 infection. *Am. J. Hematol.* 2020; 95(8):999-1000. DOI: 10.1002/ajh.25793.
16. Osman J., Lambert J., Temple M., Devaux F., Favre R., Flaujac C. et al. Rapid screening of COVID-19 patients by white blood cells scattergrams, a study of 381 patients. *Br. J. Haematol.* 2020; 190(5):718-22. DOI:10.1111/bjh.16943.
17. Sun D-W. Zhang, D., Tian R. The underlying changes and predicting role of peripheral blood inflammatory cells in severe COVID-19 patients: A sentinel? *Clin. Chim. Acta.* 2020; 508: 122-9. DOI: 10.1016/j.cca.2020.05.027.
18. Zhou F., Yu T., Du R., Fan G., Liu Y., Liu Z. et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet.* 2020; 395:1054-62. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30566-3.
19. Li Y.X., Wu W., Yang T., Zhou W., Fu Y.M., Feng Q.M. et al. Characteristics of Peripheral Blood Leukocyte Differential Counts in Patients With COVID-19. 2020; 59(0):3. 20. Wu C., Chen X., Cai Y., Xia J., Zhou X., Xu S. et al. Risk factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with coronavirus disease 2019 pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern. Med.* 2020; 180(7): 934-43. DOI: 10.1001/jamainternmed.2020.0994.
21. Zini G., Bellesi S., Ramundo F., Onofrio G. Morphological anomalies of circulating blood cells in COVID-19. *Am. J. Hematol.* 2020; 95(7): 870-2. DOI:10.1002/ajh.25824.
22. Qin C., Zhou L., Hu Z., Zhang S., Yang S., Tao Y. et al. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71(15): 762-8. DOI: 10.1093/cid/ciaa248.
23. Siddiqi H.K., Mehra M.R. COVID-19 Illness in Native and Immunosuppressed States: A Clinical-Therapeutic Staging Proposal. *J. Heart Lung Transplant.* 2020; 39(5): 405-7. DOI: 10.1016/j.healun.2020.
24. Mehta P., McAuley D.F., Brown M., Sanchez E., Tattersall R.S., Manson J.J. et al. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet.* 2020; 395(10229): 1033-4. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30628-0.

Поступила 04.08.20

Принята к печати 15.08.20

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Марданлы С. Г.^{1,2,3}, Авдонина А. С.¹, Мамедова С. Г.⁴

РАЗРАБОТКА ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА IGG К ВОЗБУДИТЕЛЮ COVID-19 В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

¹ЗАО «ЭКОлаб», 142530, г. Электрогорск Московской обл., Россия;

²ГОУ ВО МО ГГТУ, 142600, г. Орехово-Зуево Московская обл., Россия;

³ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава РФ, 119991, Москва, Россия;

⁴Российский университет Дружбы народов, 117198, Москва, Россия

Разработан новый оригинальный отечественный набор реагентов для выявления антител класса IgG к возбудителю COVID-19 – коронавирусу SARS-CoV-2 методом иммуноферментного анализа на твёрдофазном носителе «ИФА-SARS-CoV-2-AT-G». В сравнительных испытаниях с аналогичными тест-системами «Vitrotest® SARS-CoV-2 IgG» (фирма «Vitrotest», Украина) и «Anti-SARS-Cov-2 ELISA (IgG)» (фирма «EUROIMMUN AG», Германия) показана высокая диагностическая эффективность новой тест-системы.

Ключевые слова: возбудитель COVID-19 – вирус SARS-CoV-2; иммуноферментный анализ; антитела класса IgG.

Для цитирования: Марданлы С. Г., Авдонина А. С., Мамедова С. Г. Разработка иммуноферментной тест-системы для выявления антител класса IgG к возбудителю COVID-19 в сыворотке (плазме) крови человека. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65 (11): 683-687. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-11-683-687>

Mardanly S. G.^{1,2}, Avdonina A. S.¹, Mamedova S. G.³

DEVELOPMENT OF AN ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY FOR THE DETECTION OF IGG-ANTIBODIES TO THE CAUSATIVE AGENT OF COVID-19 IN HUMAN SERUM (PLASMA)

¹The closed corporation «EKOLab», Elektrogorsk, Moscow region, Russia;

²The state educational institution of higher education «The state humanitarian technological university», Orekhovo-Zuyevo of the Moscow region, Russia;

³I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia;

⁴RUDN University, Moscow, Russia

A new original Russian test kit for the detection of IgG-antibodies to the causative agent of COVID-19 – coronavirus SARS-CoV-2 by the method of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) on a solid-phase «ELISA-SARS-CoV-2-AT-G» has been developed. In comparative tests with similar test systems «Vitrotest® SARS-CoV-2 IgG» (Vitrotest, Ukraine) and «Anti-SARS-Cov-2 ELISA (IgG)» (EUROIMMUN AG, Germany) high diagnostic efficiency of the new test system was shown.

Key words: the causative agent of COVID-19 – SARS-CoV-2; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); IgG-antibodies.

For citation: Mardanly S.G., Avdonina A.S., Mamedova S.G. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of IgG-antibodies to the causative agent of COVID-19 in human serum (plasma). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65 (11): 683-687 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-11-683-687>

For correspondence: Mardanly S.G., doctor of medical sciences, academician of the Russian academy of medical technical sciences, professor of the chair of pharmacology and pharmaceutical disciplines of the state educational institution of higher education «The state humanitarian technological university»; e-mail: ekolab-president@mail.ru

Information about authors:

Mardanly S.G., <https://orcid.org/0000-0002-4556-135X>;

Avdonina A.S., <https://orcid.org/0000-0002-2990-4930>;

Mamedova S.G., <https://orcid.org/0000-0001-8639-4714>.

Acknowledgments. *The study had no sponsor support.*

Conflict of interests. *The authors declare absence of conflict of interests.*

Received 13.08.2020

Accepted 20.08.2020

Введение. Пандемия новой коронавирусной инфекции, COVID-19 (Coronavirus disease 2019), поразившей население Земли в конце 2019 – начале 2020 г., поста-

вила перед мировой и, соответственно, российской медициной ряд проблем, от решения которых напрямую зависит эффективность борьбы с ней.

Для корреспонденции: Марданлы Сейфаддин Гашимович, д-р мед. наук, проф. каф. фармакологии и фармацевтических дисциплин ГГТУ; e-mail: ekolab-president@mail.ru

Одной из таких проблем является проблема оперативного выявления всех инфицированных, т. е. проблема этиологической диагностики COVID-19, поскольку, с одной стороны, клинические проявления её манифестных форм, хотя и имеют некоторое сходство с уже привычными респираторными вирусными инфекциями, все же могут быть недостаточными для уверенной диагностики, а с другой, у значительной доли инфицированных COVID-19 протекает бессимптомно, что не исключает возможность заражения от них других лиц.

С этой целью могут быть использованы как прямые методы этиологической диагностики – выявление в исследуемых образцах РНК или антигенов вируса, так и косвенные – выявление в крови пациентов антител к нему [1].

Возбудитель COVID-19 – коронавирус SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2) – одноцепочный (+) РНК-вирус, покрытый капсидом, с вирионами круглой формы диаметром примерно от 80 до 120 нм.

В структуру вириона входят четыре основных белка (антигена): гликопротеин шипа (Spike-белок), гликопротеин оболочки (Envelope-белок), гликопротеин мембраны (Membrane-белок), белок нуклеокапсида (Nucleocapsid-белок), и несколько вспомогательных белков [2].

Spike-белок представляет собой трансмембранный гликопротеин с молекулярной массой около 150 кД. Он отвечает за связывание вируса с клеткой-мишенью и включает две субъединицы: S1 и S2. Субъединица S1 несёт рецептор-связывающий домен (RBD – receptor binding domain) и определяет клеточный тропизм. Функция субъединицы S2 заключается в непосредственном слиянии вируса с клеткой-мишенью [3-5].

Nucleocapsid-белок структурно связан с материалом нуклеиновой кислоты вируса и благодаря этому участвует в процессах, связанных с вирусным геномом, циклом репликации вируса и клеточным ответом клеток-мишеней на инфицирование [6, 7].

Membrane-белок играет роль в определении формы оболочки вируса. Он может связываться со всеми другими структурными белками. Связывание с мембранным белком помогает стабилизировать нуклеокапсидный белок и способствует завершению сборки вируса.

Envelope-белок является самым маленьким белком SARS-CoV-2 и играет роль в воспроизводстве и созревании вируса [6].

На сегодняшний день наибольшее внимание исследователей привлекают прямые методы диагностики, связанные с выявлением вирусной РНК. На 30 апреля 2020 г. только в РФ разработано и зарегистрировано 16 тест-систем такого типа, а к 30 июня их число увеличилось до 24 [8].

К прямым методам этиологической диагностики COVID-19 относятся методы выявления антигенов возбудителя в исследуемых образцах, но, если судить по материалам, приводимым Федерацией лабораторной медицины РФ [8], а также по данным Европейской Комиссии [9], на 30 апреля 2020 г. перечень тестов, основанных на этих методах и уже используемых на практике, существенно уступает тестам на основе определения РНК вируса.

Тесты, основанные на выявлении антител к возбудителю COVID-19, в плане оперативности диагностики инфекции несколько уступают прямым методам, поскольку диагностические титры антител появляются все

же только на 5-10 день после инфицирования [10]. Однако такие тесты необходимы для оценки, как иммунологического статуса пациента, так и уровня иммунологической перестройки соответствующих групп населения. Наиболее эффективно использование для этой цели иммуноферментного анализа (ИФА) [11, 12].

Учитывая масштабы необходимых исследований иммунологического статуса населения РФ, разработка новых иммуноферментных тест-систем (ИФТС) такого рода при наличии у разработчика соответствующей производственной базы актуальна.

Цель исследования – разработка и предварительные испытания диагностической эффективности нового набора реагентов для выявления антител класса IgG к возбудителю COVID-19. Выполнена на основе опыта аналогичных исследований, накопленного в ЗАО «ЭКОлаб» при создании и производстве аналогичных тест-систем для диагностики ряда бактериальных и вирусных инфекций [13-17].

Материал и методы. При разработке набора реагентов «ИФА-SARS-CoV-2-AT-G», предназначенного для выявления антител класса IgG к коронавирусу SARS-CoV-2, применён метод непрямого иммуноферментного анализа на твёрдофазном носителе.

Для получения иммуносорбента использованы рекомбинантные очищенные антигены SARS-CoV-2, полученные из *E. coli*: нуклеокапсидный антиген, оболочечный антиген и spike-антиген, несущий рецептор-связывающий домен. Антигены по отдельности в концентрациях от 0,5 до 2 мкг/мл в 0,5 М карбонат-бикарбонатном буфере (pH=9,6) вносили в лунки полистиролового планшета с поверхностью MaxiSorp (фирма «Nunc», Дания), инкубировали в течение 18-22 ч при температуре 4° С. Затем в лунки планшетов вносили блокирующий раствор с целью предотвращения неспецифических реакций со свободными от антигена участками пластика. Планшеты с блокирующим раствором выдерживали в течение 1 ч при комнатной температуре, затем отмывали деионизированной водой и высушивали при температуре 25-27° С и относительной влажности не более 60% в течение 3 часов. Затем планшеты с влагопоглотителем упаковывали под вакуумом в фольгированные пакеты.

При проведении ИФА для разведения исследуемых образцов использован фосфатный буфер, содержащий казеинат натрия. В качестве конъюгата использованы моноклональные мышиные антитела к IgG человека, меченные пероксидазой хрена, разведенные в стабилизирующем растворе. На первой стадии ИФА антитела класса IgG к SARS-CoV-2 при их наличии в исследуемых образцах взаимодействовали с рекомбинантным антигеном, иммобилизованным в лунке планшета. На второй стадии антивидовой конъюгат связывался с образовавшимися комплексами «антиген-антитело», в результате чего формировались комплексы «антиген иммуносорбента – IgG к SARS-CoV-2 образца – анти-IgG конъюгата», которые далее выявлялись в цветной реакции с индикаторным раствором, содержащим 3,3',5,5'-тетраметилбензидин. Интенсивность окрашивания реакционной смеси прямо пропорциональна концентрации IgG к SARS-CoV-2 в образце. Результаты ИФА регистрировали спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность содержимого лунок планшета при двух длинах волн (450 нм и 620 нм).

Исследуемые образцы. В исследовании использованы 56 образцов сыворотки крови пациентов с поло-

Результаты исследования образцов пациентов (PHK⁺ SARS-CoV-2), на наличие IgG к разным антигенам SARS-CoV-2 в ИФА

| № образца | Клинические проявления | Результаты ИФА (ОП* образцов) | | |
|-----------|---|------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| | | Nucleocapsid-антиген (ОПкр = 0,25) | Spike-антиген (ОПкр = 0,25) | Envelope-антиген (ОПкр = 0,25) |
| 1. | Лёгкое течение. Субфебрилитет. Вирусовыделение более 1 мес | 3,801 | 2,987 | 3,235 |
| 2. | Тяжёлое течение. Фебрильная лихорадка. Вирусовыделение более 1 мес | 3,767 | 2,954 | 2,811 |
| 3. | Бессимптомное течение | 0,003 | 0,007 | 0,009 |
| 4. | Тяжёлое течение. Пневмония | 3,726 | 2,845 | 1,015 |
| 5. | Средне-тяжёлое течение. Фебрильная лихорадка. Вирусовыделение более 1 мес | 2,73 | 2,698 | 1,215 |
| 6. | Тяжёлое течение. Пневмония | 3,915 | 2,996 | 2,314 |
| 7. | Лёгкое течение. Потеря обоняния. Вирусовыделение более 1 мес | 1,881 | 1,516 | 1,114 |
| 8. | Тяжёлое течение, фебрильная лихорадка более 8 суток | 0,352 | 0,015 | 0,005 |
| 9. | Лёгкое течение. Субфебрилитет | 3,797 | 2,814 | 2,304 |
| 10. | Лёгкое течение. Субфебрилитет. Вирусовыделение более 1 мес | 2,891 | 2,817 | 1,013 |
| 11. | Тяжёлое течение. Пневмония. Вирусовыделение более 1 мес | 3,829 | 3,765 | 2,489 |
| 12. | Тяжёлое течение. Фебрильная лихорадка | 3,754 | 2,897 | 1,108 |
| 13. | Тяжёлое течение. Пневмония | 3,844 | 2,989 | 2,581 |
| 14. | Бессимптомное течение | 1,288 | 0,511 | 0,014 |
| 15. | Потеря обоняния | 2,711 | 2,055 | 0,518 |
| 16. | Без симптомов | 1,881 | 1,003 | 0,002 |
| 17. | Без симптомов | 0,011 | 0,005 | 0,008 |
| 18. | Тяжёлое течение. Пневмония | 3,602 | 3,011 | 1,298 |
| 19. | Субфебрилитет | 1,25 | 1,614 | 0,019 |
| 20. | Тяжёлое течение. Фебрильная лихорадка | 2,759 | 2,914 | 1,674 |
| 21. | Тяжёлое течение. Пневмония | 3,886 | 2,961 | 2,518 |
| 22. | Без симптомов | 0,44 | 1,301 | 0,001 |
| 23. | Без симптомов | 3,758 | 2,199 | 0,01 |
| 24. | Лёгкое течение. Потеря обоняния | 0,006 | 0,008 | 0,004 |
| 25. | Без симптомов | 0,001 | 0,003 | 0,001 |
| 26. | Средне-тяжелое течение. Фебрильная лихорадка | 0,008 | 0,003 | 0,013 |
| 27. | Лёгкое течение. Потеря обоняния | 2,578 | 2,874 | 1,305 |
| 28. | Без симптомов | 0,04 | 0,01 | 0,008 |
| 29. | Тяжёлое течение. Пневмония | 0,949 | 1,004 | 0,015 |
| 30. | Тяжёлое течение. Фебрильная лихорадка | 3,765 | 3,412 | 2,360 |
| 31. | Без симптомов | 2,936 | 2,678 | 0,514 |
| 32. | Лёгкое течение. Потеря обоняния | 2,224 | 2,519 | 0,611 |
| 33. | Без симптомов | 3,631 | 3,369 | 1,258 |
| 34. | Без симптомов | 0,006 | 0,003 | 0,001 |
| 35. | Без симптомов | 0,003 | 0,004 | 0,006 |
| 36. | Тяжёлое течение. Пневмония | 3,726 | 3,914 | 2,159 |
| 37. | Без симптомов | 0,828 | 1,147 | 0,02 |
| 38. | Без симптомов | 0,008 | 0,004 | 0,012 |
| 39. | Без симптомов | 2,901 | 2,932 | 1,357 |
| 40. | Без симптомов | 0,485 | 0,963 | 0,007 |
| 41. | Лёгкое течение. Субфебрилитет | 3,652 | 3,123 | 1,654 |
| 42. | Лёгкое течение. Кожные проявления | 3,603 | 3,489 | 1,023 |
| 43. | Лёгкое течение. Субфебрилитет | 3,653 | 3,657 | 2,036 |
| 44. | Без симптомов | 0,017 | 0,007 | 0,013 |
| 45. | Тяжёлое течение. Фебрильная лихорадка | 0,851 | 0,412 | 1,321 |
| 46. | Без симптомов | 0,004 | 0,003 | 0,002 |
| 47. | Без симптомов | 3,804 | 3,698 | 1,314 |
| 48. | Лёгкое течение. Субфебрилитет | 0,863 | 0,58 | 0,003 |
| 49. | Тяжёлое течение. Пневмония | 3,106 | 2,654 | 1,641 |
| 50. | Без симптомов | 0,009 | 0,005 | 0,06 |
| 51. | Без симптомов | 3,717 | 3,145 | 1,105 |
| 52. | Без симптомов | 0,011 | 0,005 | 0,007 |
| 53. | Лёгкое течение. Субфебрилитет | 0,008 | 0,005 | 0,006 |
| 54. | Лёгкое течение. Субфебрилитет | 3,89 | 3,650 | 2,014 |
| 55. | Лёгкое течение. Потеря обоняния | 1,165 | 1,023 | 0,632 |
| 56. | Без симптомов | 0,001 | 0,001 | 0,004 |

Примечание. * – ОП – оптическая плотность; ** – ОПкр – оптическая плотность критическая.

Таблица 2

Результаты исследования образцов пациентов (PHK+ SARS-CoV-2), в различных ИФТС

| № образца | Индекс позитивности при исследовании в ИФТС производства фирмы | | |
|-----------|--|--------|--------------|
| | Vitrotest | ЭКОлаб | EUROIMMUN AG |
| 1. | 11,30 | 25,34 | 8,00 |
| 2. | 11,30 | 25,11 | 6,39 |
| 3. | 0,09 | 0,06 | 0,06 |
| 4. | 11,12 | 24,84 | 5,88 |
| 5. | 10,57 | 18,20 | 5,59 |
| 6. | 11,79 | 15,66 | 7,46 |
| 7. | 9,59 | 12,54 | 6,63 |
| 8. | 1,71 | 2,35 | 0,06 |
| 9. | 11,47 | 25,31 | 5,86 |
| 10. | 11,26 | 19,27 | 4,98 |
| 11. | 11,41 | 25,53 | 6,69 |
| 12. | 11,51 | 25,03 | 7,40 |
| 13. | 11,33 | 25,63 | 8,93 |
| 14. | 2,71 | 8,59 | 0,09 |
| 15. | 10,70 | 18,07 | 2,96 |
| 16. | 6,85 | 12,54 | 1,56 |
| 17. | 0,13 | 0,07 | 0,05 |
| 18. | 11,18 | 24,01 | 4,02 |
| 19. | 0,88 | 1,67 | 1,51 |
| 20. | 10,23 | 18,39 | 7,70 |
| 21. | 11,24 | 25,91 | 7,23 |
| 22. | 0,50 | 1,76 | 2,02 |
| 23. | 11,12 | 25,05 | 1,81 |
| 24. | 0,77 | 0,04 | 0,20 |
| 25. | 0,12 | 0,01 | 0,08 |
| 26. | 0,07 | 0,05 | 0,10 |
| 27. | 10,11 | 17,19 | 6,64 |
| 28. | 0,51 | 0,27 | 0,03 |
| 29. | 9,10 | 6,33 | 0,93 |
| 30. | 11,24 | 25,10 | 6,88 |
| 31. | 8,49 | 19,57 | 3,04 |
| 32. | 10,58 | 14,83 | 5,07 |
| 33. | 11,25 | 24,21 | 3,24 |
| 34. | 0,26 | 0,04 | 0,38 |
| 35. | 0,17 | 0,03 | 0,04 |
| 36. | 11,08 | 24,84 | 8,26 |
| 37. | 2,38 | 5,52 | 2,61 |
| 38. | 0,21 | 0,05 | 0,10 |
| 39. | 10,93 | 11,6 | 5,58 |
| 40. | 1,58 | 2,34 | 0,78 |
| 41. | 11,44 | 24,35 | 3,82 |
| 42. | 11,33 | 24,02 | 3,39 |
| 43. | 11,32 | 24,35 | 8,05 |
| 44. | 0,25 | 0,11 | 0,14 |
| 45. | 1,03 | 5,67 | 4,72 |
| 46. | 0,28 | 0,03 | 0,07 |
| 47. | 11,40 | 25,36 | 6,06 |
| 48. | 3,33 | 5,75 | 3,08 |
| 49. | 10,79 | 20,71 | 5,60 |
| 50. | 0,13 | 0,06 | 0,07 |
| 51. | 11,48 | 24,78 | 4,98 |
| 52. | 0,44 | 0,07 | 0,18 |
| 53. | 0,23 | 0,05 | 0,13 |
| 54. | 11,52 | 25,93 | 7,38 |
| 55. | 5,57 | 7,77 | 5,22 |
| 56. | 1,00 | 0,01 | 0,05 |

жительным результатом ПЦР на наличие РНК SARS-CoV-2, предоставленные диагностическим центром «El Clinic»(г. Электрогорск).

В качестве отрицательных образцов исследованы 90 образцов сыворотки здоровых доноров (донации 2018 г.), предоставленные ГБУЗ «Областная станция переливания крови» (г. Владимир). Данные образцы хранились при минус 70° С и до исследования не подвергались размораживанию.

Результаты и обсуждение. Начальным этапом разработки традиционно стал выбор антигена для получения иммуносорбента. С этой целью приготовлены иммуносорбенты с использованием нуклеокапсидного антигена, оболочечного антигена и spike-антигена SARS-CoV-2.

Остальные специфические и неспецифические компоненты набора выбраны на основе опыта конструирования аналогичных тест-систем.

Чувствительность полученных иммуносорбентов протестирована в ИФА при исследовании сывороток пациентов с положительным результатом ПЦР на наличие РНК SARS-CoV-2. Результаты данного исследования приведены в табл. 1.

Данные, приведенные в табл. 1, свидетельствуют о том, что у некоторых пациентов с положительным результатом ПЦР отсутствуют IgG к SARS-CoV-2. Это может быть связано с лёгким течением заболевания или ранней стадией инфекционного процесса. В тех же образцах, в которых обнаружены IgG, главными иммуногенами выступают нуклеокапсидный и spike-антиген. При этом наилучшую активность проявил нуклеокапсидный антиген: выявил на один положительный образец больше и показал большую оптическую плотность по положительным образцам.

Специфичность полученных иммуносорбентов протестирована в ИФА при исследовании 90 сывороток здоровых доноров 2018 г. Все образцы показали отрицательный результат по наличию IgG к разным антигенам SARS-CoV-2.

Поскольку специфичность полученных иммуносорбентов сопоставима, то по результатам анализа данных, приведенных в табл. 1, в качестве наиболее иммуногенного антигена для конструирования тест-системы выбран нуклеокапсидный антиген.

Получена тест-система «ИФА-SARS-CoV-2-AT-G», в состав которой входят:

- иммуносорбент – рекомбинатный очищенный нуклеокапсидный антиген SARS-CoV-2, сорбированный в лунках 96-луночного разборного полистиролового планшета для иммунологических реакций с плоским дном;
- контрольный положительный образец;
- контрольный отрицательный образец;
- конъюгат (антитела моноклональные мышиные против IgG человека, меченные пероксидазой хрена), готовый к применению или его 10-кратный концентрат;
- раствор для разведения конъюгата (при комплектации концентратом конъюгата);
- раствор для разведения образцов;
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином;
- раствор индикаторный;
- стоп-реагент.

Диагностическая эффективность полученной ИФТС оценена при сравнительных испытаниях в сравнении с аналогичными ИФТС производства фирм «Vitrotest» (Украина) и «EUROIMMUN AG» (Германия).

Результаты сравнительного исследования представлены в табл. 2.

Приведенные в табл. 2 данные демонстрируют высокую корреляцию оценок наличия IgG к SARS-CoV-2 всеми тремя использованными тест-системами (коэффициенты корреляции оценок, полученных в тест-системе «ИФА-SARS-CoV-2-AT-G», с оценками в тест-системах фирм «Vitrotest» и «EUROIMMUN AG» составили 0,97 и 0,87, соответственно, а коэффициент корреляции оценок, полученных в двух последних тест-системах, составил 0,86), что свидетельствует о высокой диагностической эффективности новой тест-системы и о возможности её представления для государственной регистрации.

Заключение. Разработана новая тест-система для выявления специфических антител класса IgG к возбудителю COVID-19. Показана её высокая диагностическая эффективность, которая обеспечивает возможность её использования для оценки наличия гуморального ответа организма обследованного на инфицирование SARS-CoV-2.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2 – 7, 9,10 см. REFERENCES)

1. Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)». Версия 7 (03.06.2020) (утв. Министерством здравоохранения РФ) 03.06.2020 URL: https://static-0.rosminzdrav.ru/system/attachments/attaches/000/050/584/original/03062020_%D0%9C%D0%9A%D0%9A_COVID-19_v7.pdf
8. Полный перечень диагностических тестов для выявления коронавируса в России на 3 августа URL: https://fedlab.ru/komitety/meditsinskie-izdelia/?ELEMENT_ID=230575
11. Девяткин А. В., Девяткин А. А. Новая коронавирусная инфекция – COVID-19. Вопросы происхождения, тропности возбудителя, путей передачи инфекции, лабораторной диагностики и специфической терапии. *Кремлевская медицина. Клинический вестник.* 2020; 2: 5-13.
12. Романенко М. Тестирование на коронавирус SARS-CoV-2: тест-системы и достоверность результатов URL: <https://pharmznanie.ru/article/coronavirus/testirovanie-na-koronavirus-sars-cov-2-test-sistemy-i-dostovernost-rezultatov>
13. Марданлы С. Г. Разработка и испытания новых иммуноферментных тест систем для диагностики токсоплазмоза. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2009; 2: 35-7.
14. Марданлы С. Г. Эпидемиологический надзор за инфекциями TORCH группы на основе современных технологий лабораторной диагностики. Дисс..... д-ра мед. наук. Москва; 2016.
15. Марданлы С. Г., Симонов В. В., Авдоница А. С. Производство наборов реагентов для клинической лабораторной диагностики иммунохимическими методами. Орехово-Зуево: ГГТУ; 2017.
16. Марданлы С. Г., Симонова Е. Г., Симонов В. В. *Инфекции TORCH-группы: клиническая лабораторная диагностика, эпидемиологический надзор и контроль.* Москва:Транзит-ИКС; 2018.
17. Марданлы С. Г., Симонова Е. Г., Симонов В. В. *Герпесвирусные инфекции: этиология и патогенез, клиника и лабораторная диагностика, эпидемиология и профилактика.* Орехово-Зуево: ГГТУ; 2020.

REFERENCES

1. Temporary guidelines “Prevention, diagnosis and treatment of new coronavirus infection (COVID-19)”. [Vremennye metodicheskie rekomendatsii “Prevention, diagnosis and treatment of new coronavirus infection (COVID-19)”]. Versiya 7 (03.06.2020) (utv. Ministerstvom zdavoohraneniya RF) 03.06.2020 URL: https://static-0.rosminzdrav.ru/system/attachments/attaches/000/050/584/original/03062020_%D0%9C%D0%9A_COVID-19_v7.pdf. (in Russian)
2. Jiang S., Hillyer C., Du L. Neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 and other human Coronaviruses. *Trends Immunol.* 2020; 41 (5): 355-9.
3. Guo Y.R., Cao Q.D., Hong Z.S., Tan Y.Y., Chen S.D., Jin H.J. et al. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak update on the status. *Military Med. Res.* 2020; 7: 1-10.
4. Fehr A.R., Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol. Biol.* 2015; 1282: 1-23.
5. Walls A.C., Park Y.J., Tortorici M.A., Wall A., McGuire A.T., Veesler D. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell.* 2020; 181 (2): 281-92.
6. Schoeman D., Fielding B.C. Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virology.* 2019; 16: 69.
7. Tai W., He L., Zhang X., Pu J., Voronin D., Jiang S. et al. Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus: implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine. *Cell Mol. Immunol.* 2020; 17: 613-20.
8. Full list of diagnostic tests for detecting coronavirus in Russia as of August 3 [Polnyy perechen' diagnosticheskikh testov dlya vyyavleniya koronavirusa v Rossii na 3 avgusta]. URL: https://fedlab.ru/komitety/meditsinskie-izdelia/?ELEMENT_ID=230575. (in Russian)
9. COVID-19 In Vitro Diagnostic Devices and Test Methods Database URL: https://covid-19_diagnostics.jrc.ec.europa.eu/devices?orderBy=CE_Marking&invertedOrder=#form_content
10. Sethuraman N., Jeremiah S.S., Ryo A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. *JAMA.* 2020; 323 (22): 2249-51.
11. Devyatkin A.V., Devyatkin A.A. New coronavirus infection-COVID-19. Questions of origin, affinity of the causative agent, ways of transmission, laboratory diagnosis and specific therapy. *Kremlevskaya meditsina. Klinicheskiy vestnik.* 2020; 2: 5-13. (in Russian).
12. Romanenko M. *Testing for the coronavirus SARS-CoV-2: test system and the reliability of the results.* URL: <https://pharmznanie.ru/article/coronavirus/testirovanie-na-koronavirus-sars-cov-2-test-sistemy-i-dostovernost-rezultatov>. (in Russian)
13. Mardanly S.G. Development and testing of new enzyme immunoassay systems for the diagnosis of toxoplasmosis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2009; 2: 35-7. (in Russian)
14. Mardanly S.G. Epidemiological surveillance of TORCH group infections based on modern laboratory diagnostics technologies. Diss. Moscow; 2016. (in Russian)
15. Mardanly S.G., Simonov V.V., Avdonina A.S. Production of reagent kits for clinical laboratory diagnostics using immunochemical methods. Orekhovo-Zuevo: GGTU; 2017. (in Russian)
16. Mardanly S.G., Simonova E.G., Simonov V.V. Torch-group infections: clinical laboratory diagnostics, epidemiological surveillance and control. Moscow: Tranzit-IKS; 2018. (in Russian)
17. Mardanly S.G., Simonova E.G., Simonov V.V. Herpesvirus infections: etiology and pathogenesis, clinic and laboratory diagnostics, epidemiology and prevention. Orekhovo-Zuevo: GGTU; 2020. (in Russian)

Поступила 13.08.20
Принята к печати 20.08.20

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Акиншина Ю.А.¹, Марданлы С.С.¹, Киселева В.А.².

ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ ТЕСТ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОГО ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССОВ М И G К КОРОНАВИРУСУ SARS-COV-2

¹ЗАО «ЭКОлаб», 142530., г. Электрогорск, Россия;

²Государственный гуманитарно-технологический университет «ГГТУ» ГОУВО Московской обл., 142611, г. Орехово-Зуево, Россия

В работе представлены результаты создания и оценки диагностических характеристик иммунохроматографической тест-системы для качественного дифференцированного выявления IgM/IgG к коронавирусу SARS-CoV-2 в образцах сыворотки, плазмы или цельной крови человека «ИХА-COVID-19-IgM/IgG». Тест был апробирован на образцах, аттестованных в иммунохемилюминесцентном анализе, не содержащих антитела к вирусу SARS-CoV-2, а также содержащих оба и один вид специфических антител. Совпадение результатов с данными иммунохемилюминесцентного метода составило 87,2%. Разработанная тест-система может быть использована для экспрессного исследования клинических образцов пациентов в условиях пандемии Covid-19 и для оценки иммунного статуса реконвалесцентов.

Ключевые слова: иммунохроматографический анализ; Covid-19; SARS-CoV-2; коронавирус.

Для цитирования: Акиншина Ю.А., Марданлы С.С., Киселева В.А. Иммунохроматографический тест для дифференцированного выявления антител классов М и G к коронавирусу SARS-CoV-2. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65 (11): 688-692. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-11-688-692>

Akinshina Yu.A.¹, Mardanly S.S.¹, Kiseleva V.A.²

IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST FOR DIFFERENTIATION DETECTION OF IGM AND IGG TO SARS-COV-2

¹JSC «EKOlab», Elektrogorsk, Moscow Region;

²State Humanitarian and Technological University, Orekhovo-Zuevo, Moscow Region

The study presents the results of the creation and evaluation of the diagnostic characteristics of the rapid immunochromatographic test for the qualitative detection and differentiation of IgM/IgG antibodies to SARS-CoV-2 in human serum, plasma, and whole blood "ИХА-COVID-19-IgM / IgG". Have been tested some samples without antibodies to SARS-CoV-2 and a samples with two and one type of specific antibodies. The coincidence of the results of immunochromatographic analysis with the results of the immunochemiluminescent method was 87.2%. Test kit can be use as the rapid diagnostic test in the context of the COVID-19 pandemic and to assess the immune status of convalescents.

Key words: immunochromatographic analysis; LFIA; Covid-19; SARS-CoV-2; coronavirus.

For citation: Akinshina Yu.A., Mardanly S.S., Kiseleva V.A. Immunochromatographic test for differentiation detection of IgM and IgG to SARS-CoV-2. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020;65 (11): 688-692 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-11-688-692>

Information about authors:

Akinshina Y.A., <https://orcid.org/0000-0002-9223-3455>;

Mardanly. S.S., <https://orcid.org/0000-0002-4440-6075>;

Kiseleva V.A., <https://orcid.org/0000-0003-3565-1981>.

For correspondence: Akinshina Yulia Aleksandrovna, a head of the Express diagnostic Departement; e-mail: akinshina.opr@mail.ru

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 07.09.2020

Accepted 29.09.2020

Введение. Для борьбы с любой эпидемией колоссальное значение имеет своевременная диагностика, и пандемия COVID-19 не является исключением. Поскольку ранние клинические проявления у инфицированных неспецифичны, необходимо в короткие сроки подтвердить диагноз и принять все необходимые меры для обеспечения безопасности больных и их окружения [1–3]. В то же время некоторые исследования показали, что у значительного числа инфицированных людей (около 44%) симптомы болезни могут отсутствовать, это создает дополнительные трудности в контроле за распространением COVID-19 в мире [2–7].

«Золотым стандартом» диагностики коронавирусной инфекции является обратная транскрипция РНК с

последующей амплификацией синтезированных фрагментов кДНК методом полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени [8,9]. Несмотря на то, что этот метод широко применяется во всем мире, ограничения этой технологии очевидны. Ложноотрицательные результаты ОТ-ПЦР в диагностике подозрительных случаев COVID-19 представляют большую угрозу для общества и усложняют эпидемиологическую обстановку в целом. При развивающейся клинической симптоматике у пациента и отрицательном результате ОТ-ПЦР незаменимым инструментом диагностики становится серологические методы исследования, направленные на обнаружение специфических антител в плазме, сыворотке или цельной крови человека.

Для корреспонденции: Акиншина Юлия Александровна, нач. отд-ния экспресс-диагностики; e-mail: akinshina.opr@mail.ru

с коллоидным золотом. При этом формируется комплекс «антитело-антиген конъюгата», который мигрирует с током жидкости. В тестовых зонах (IgM и IgG) происходит его взаимодействие с иммобилизованными на мембране антителами против IgM и IgG человека с образованием окрашенных комплексов. Для исследования каждого образца использовали отдельную тест-кассету. Результат анализа визуально контролировали через 10 мин после внесения пробы.

Положительным считался результат исследования с образованием двух или трёх полос красного или розового цвета. Одна линия должна находиться в контрольной зоне (С), другая (или другие) - в тестовых зонах (IgM и/или IgG). Отрицательный результат анализа фиксировали при появлении одной окрашенной полосы в зоне контроля.

Иммуноферментный анализ. Тестирование образцов, содержащих только IgM по результатам иммунохемилюминесцентного анализа (ИХЛИА) ($n=39$), дополнительно проводилось в иммуноферментном анализе, с помощью наборов реагентов «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ» (РУ № РЗН 2020/10388) и «SARS-CoV-2-IgM-ИФА-БЕСТ» (РУ № РЗН 2020/10389) («Вектор-Бест», Новосибирск) для выявления иммуноглобулинов классов G и M к коронавирусу SARS-CoV-2 в сыворотке или плазме крови человека методом ИФА. Метод ИФА-IgM основан на двустадийном capture-варианте твердофазного иммуноферментного анализа. Метод ИФА- IgG основан на двустадийном «непрямом» варианте твердофазного иммуноферментного анализа. Регистрация результатов проводится фотометрически с дальнейшим расчётом коэффициента позитивности относительно оптической плотности (ОП) лунка с отрицательным контрольным образцом ОП(К-).

Исследуемые образцы. В работе использовались 220 сывороток от здоровых пациентов диагностического центра El'clinic (Электрогорск, Московская область), полученные до октября 2019 г., а также 230 образцов сыворотки крови больных COVID-19, полученные из лаборатории ИНВИТРО и аттестованные в наборах реагентов для определения IgM и IgG к штамму SARS-CoV-2 коронавируса в ИХЛИА на анализаторах серии CL для диагностики *in vitro* «SARS-CoV-2 IgM» (CLIA) и «SARS-CoV-2 IgG» (CLIA) фирмы «Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd» (Китай). Согласно инструкции производителя, концентрация SARS-CoV-2 IgG ≥ 10 Ед/мл означает, что образец реактивный, и указывает на наличие IgG антител к SARS-CoV-2, предполагая предыдущую или недавнюю инфекцию. Концентрация SARS-CoV-2 IgM ≥ 1 Ед/мл означает, что образец реактивный, и указывает на наличие IgM антител SARS-CoV-2, предполагая недавнюю инфекцию. По результатам исследований в вышеуказанных наборах реагентов все пробы были разделены по содержанию специфических антител на 4 группы:

| | |
|-----------------------|--------------|
| I группа ($n=220$) | IgM – /IgG – |
| II группа ($n=111$) | IgM – /IgG+ |
| III группа ($n=49$) | IgM +/IgG – |
| IV группа ($n=70$) | IgM +/IgG+ |

Статистическая обработка результатов. Для сопоставления диагностических параметров анализируемого метода и метода сравнения использовали следующие формулы:

$$\text{Чувствительность} = \frac{a}{a+c} \times 100\% ;$$

$$\text{Специфичность} = \frac{b}{b+d} \times 100\% ;$$

$$\text{Общее совпадение результатов двух методов} = \frac{a+b}{a+b+c+d} \times 100\% ,$$

где a – результаты, положительные по двум сравниваемым методам; b - результаты, отрицательные по двум сравниваемым методам; c – результаты, положительные по методу сравнения, но отрицательные по анализируемому методу; d - результаты, отрицательные по методу сравнения, но положительные по анализируемому методу.

Результаты. Мышиные антитела к IgM и IgG человека, использованные для сорбции на нитроцеллюлозную мембрану, ранее были апробированы в тест-системах ЗАО «ЭКОлаб», где для ИФА используется формат MAC-ELISA и GAC-ELISA (capture). Таким образом, для сорбции на нитроцеллюлозную мембрану были использованы оптимальные, ранее подобранные в ИФА, концентрации этих антител. При выборе антигена для конъюгации с наночастицами коллоидного золота использовали рекомбинантные антигены SARS-CoV-2: полноразмерный нуклеокапсидный белок N и RBD-домен белка S. Вышеописанным методом изготовили 2 вида конъюгата: «N-Au» и «S-Au». Третий вариант конъюгата содержал смесь конъюгатов в соотношении 1:1 «N-Au + S-Au».

Для определения состава конъюгата, входящего в состав ИХА-теста были использованы образцы, содержащие только IgM к SARS-CoV-2 ($n=10$), только IgG к SARS-CoV-2 ($n=20$), а также не содержащие специфических антител к этому вирусу ($n=20$). Результаты тестирования этих проб с тремя вариантами ИХА-теста отражены в табл. 1. Несмотря на небольшую выборку исследуемых образцов, стало очевидно, что антиген S более специфично срабатывает с антителами к SARS-CoV-2: из 20 образцов сыворотки крови здоровых лиц не наблюдалось ни одного ложноположительного результата. Хорошую чувствительность продемонстрировал этот антиген при исследовании проб, содержащих антитела класса M (90%), однако при обследовании образцов II группы, тест с конъюгатом «S-Au» напротив показывал невысокую чувствительность (75%).

Обратную картину наблюдали при тестировании проб в тесте с конъюгатом «N-Au». По результатам исследования проб II группы была продемонстрирована 100% чувствительность, однако с сыворотками, где по результатам ИХЛИА были обнаружены только IgM, в 4 случаях из 5 наблюдалось одновременное выявление IgG, в остальных 5 случаях не было обнаружено антител к SARS-CoV-2. Среди здоровых лиц наблюдалась слабopоложительная реакция при обследовании трёх проб (15%). Несмотря на это было решено включить в состав конъюгата конечного теста этот антиген благодаря высокой чувствительности к IgG (100%). Опытным путем было подобрано соотношение двух конъюгатов для дальнейшего использования в тесте, было выбрано соотношение 1:1 (см. табл. 1).

Дальнейшая работа была направлена на апробацию новой ИХА тест-системы с использованием большей выборки аттестованных образцов. При исследовании I группы сывороток крови здоровых лиц ($n=200$) отри-

Результаты исследования по выбору антигена SARS-CoV-2 для использования в составе конъюгата в тест-системе «ИХА-COVID-19-IgM/IgG»

| Группы проб | N-Au | | S-Au | | N-Au + S-Au | | Количество сывороток |
|------------------|--------|----------|--------|---------|-------------|---------|----------------------|
| | IgM+ | IgG+ | IgM+ | IgG+ | IgM+ | IgG+ | |
| I: IgM – /IgG – | - | 3(15%) | - | - | - | 2(10%) | 20 |
| II: IgM – /IgG + | - | 20(100%) | - | 15(75%) | 1(5%) | 18(90%) | 20 |
| III: IgM +/IgG – | 5(50%) | 4(40%) | 9(90%) | - | 9(90%) | 3(30%) | 10 |

Результаты исследования охарактеризованных образцов в ИХА тест-системе «ИХА-COVID-19-IgM/IgG» (n=400)

| Группы сывороток крови пациентов | Результат исследования сывороток в тест-системе «ИХА-COVID-19-IgM/IgG» | | | | Количество сывороток |
|----------------------------------|--|-------------|-----------|------------|----------------------|
| | IgM + | IgM – | IgG + | IgG – | |
| I: IgM – /IgG – | 11(5,5%) | 189(94,5%)* | 19 (9,5%) | 181(90,5%) | 200 |
| II: IgM – /IgG + | 6(6,6%) | 85(93,4%) | 83(91,2%) | 8(8,8%) | 91 |
| III: IgM +/IgG – | 1(2,6%) | 38(97,4%) | 3(7,7%) | 36(92,3%) | 39 |
| IV: IgM +/IgG+ | 61(87,1%) | 9(12,9%) | 58(82,9%) | 12 (17,1%) | 70 |

Примечание. * - серая маркировка ячейки – совпадающие с ИХЛА результаты.

Результаты сравнительного анализа результатов быстрого теста «ИХА и ИХЛА» (n=450)

| Результат ИХЛА (число проб) | Число положительных (+) и отрицательных (-) результатов ИХА | | Диагностические характеристики ИХА в сравнении с ИХЛА, % | | |
|-----------------------------|---|-----|--|---------------|------------------------------|
| | + | - | Чувствительность | Специфичность | Общее совпадение результатов |
| M- (n=331) | 18 | 313 | 59,7 | 94,6 | 85,3 |
| M+ (n=119) | 71 | 48 | | | |
| G - (n=269) | 27 | 242 | 87,8 | 90,0 | 89,1 |
| G+ (n=181) | 159 | 22 | | | |

цательный результат по IgM получили в 189 случаях (94,5%); по IgG – в 181 (90,5%). Неспецифические фоновые реакции с антителами M и G составили 11(5,5%) и 19 (9,5%) соответственно (табл. 2).

Для определения диагностической чувствительности теста исследовали образцы, содержащие антитела M и/или G к вирусу SARS-CoV-2, аттестованные в иммунохемилюминесцентном анализе (ИХЛА).

Из II группы образцов (n=91), содержащих только IgG, результаты ИХА совпали в 83 случаях (91,2%). 8 образцов, для которых был получен отрицательный результат, содержали IgG в низкой концентрации (до 15 Ед/мл по ИХЛА). 6 образцов этой группы были интерпретированы в ИХА как IgM-положительные (6,6%) (см. табл.1). Неспецифические реакции такого рода могут быть индуцированы присутствием антител к близкородственным коронавирусом, перекрестно связывающимися с высококонсервативным для всех коронавирусов нуклеокапсидным белком N в конъюгате [25].

III группу составили сыворотки, содержащие только IgM антитела по результату ИХЛА (n=39). Результаты экспресс-теста показали отсутствие IgM в 38 (97,4%) образцах. В одном случае была выявлена слабоположительная реакция на тестовой полосе IgM. В трех сыворотках были обнаружены IgG (см.табл.2). Для разрешения разночтений по результатам двух методов эти пробы были исследованы методами ИФА-IgM и ИФА-

Таблица 2 IgG. Из трёх сывороток, в которых были обнаружены IgG, результат подтвердился для 2 образцов, которые в том числе содержали и антитела класса M. В остальных случаях специфических антител в сыворотках обнаружено не было. Несмотря на то, что ИФА не относится к подтверждающим методам, мы предполагаем, что эти результаты более достоверны ввиду того, что динамика специфических антител при COVID-19 подразумевает практически одновременное появление антител обоих классов в крови больных на 2-й неделе болезни, что согласуется и с литературными данными [11,13,14].

При исследовании образцов IV группы (n=70), содержащих оба класса антител, совпадения результатов по M антителам наблюдалось при исследовании 61 пациентов (87,1%), по IgG – 58 пациентов (82,9%) (см.табл.1). Большинство проб, для которых результат в ИХА оказался отрицательным по IgG и/или по IgM имели концентрацию антител в диапазоне 10 – 15,3 Ед/мл и 1 – 2,07 Ед/мл для IgG и IgM соответственно, то есть их можно интерпретировать как слабоположительные.

Итоги сравнения результатов теста «ИХА-COVID-19-IgM/IgG» и иммунохемилюминесцентного анализа представлены в табл. 3. Недостаточная чувствительность теста по IgM была обусловлена включением в группу проб сывороток из III группы, по которым выявились явные расхождения результатов ИХА и ИХЛА. Исключение этих сывороток из сравнительного анализа позволило бы продемонстрировать чувствительность по IgM - 78% и специфичность по IgM - 96,8%.

Таким образом чувствительность ИХА для выявления специфических IgM составила 59,7%, специфичность по этому классу антител – 94,6%; чувствительность ИХА для выявления IgG составила 87,8%, специфичность – 90,0%. Общее совпадение результатов двух методов анализа на IgM – 85,3%; на IgG – 89,1%. Без разделения классов антител – 87,2%.

Обсуждение. Сегодня на рынке медизделий нет недостатка в тест-системах для серологической диагностики COVID-19. Производители наборов реагентов, как правило, не раскрывают природу антигена SARS-CoV-2, используемого при разработке теста, поэтому, сравнивая два метода, часто могут выявляться разночтения в результатах исследования одной и той же выборки проб. Несмотря на то, что по показателям чувствительности и специфичности иммунохроматографические тесты несколько уступают другим серологическим тестам, их несомненные преимущества (экспрессность, отсутствие

требований к дополнительному оборудованию и квалификации тестирующего) делают их полезным инструментом диагностики COVID-19 в условиях развивающейся пандемии для массового скрининга населения. Комбинация методов ОТ-ПЦР и ИХА может дать дополнительное представление о стадии заболевания и иммунном статусе пациента при коронавирусной инфекции.

Заключение. Тест «ИХА-COVID-19-IgM/IgG» может быть использован как в больницах, клиниках, испытательных лабораториях, так и для внелабораторной диагностики, что даёт ему возможность занять важное место в первичном звене диагностики COVID-19, столь необходимым в борьбе с этой глобальной угрозой.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1 – 7, 9 – 27 см. REFERENCES)

8. Гончарова Е.В., Донникова А. Е., Кадочникова В.В., Морозова С.А., Болдырева М. Н., Галкина И. С. и др. Диагностика вируса, вызывающего COVID-19, методом ПЦР в реальном времени. *Фармакоэкономика. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология.* 2020; 13(1): 52-63.
28. Никитина А.В., Марданлы С.Г., Помазанов В.В. Сравнительная апробация иммунохроматографической тест-системы для выявления гемоглобина в кале. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2020; 65 (7): 439-42.
29. Марданлы С.Г. Разработка и испытания новых иммуноферментных тест-систем для диагностики токсоплазмоза. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2009; 2: 37-8.
30. Марданлы С.Г., Дмитриев Г.А. Лабораторная диагностика сифилиса. Электрогорск-Владимир: ТРАНЗИТ- ИКС; 2011.
31. Марданлы С.Г., Кирпичникова Г.И., Неверов В.А. Цитомегаловирусная инфекция. Этиология, эпидемиология, патогенез, клиника, лабораторная диагностика, лечение. Методическое пособие. Электрогорск: ТРАНЗИТ- ИКС; 2005.
32. Марданлы С.Г. Иммуноферментные тест-системы ЗАО «ЭКОлаб» для диагностики простого герпеса. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2008;2: 35-8.
33. Марданлы С.Г., Кирпичникова Г.И., Неверов В.А. Токсоплазмоз. Электрогорск: ТРАНЗИТ- ИКС; 2012.

REFERENCES

1. Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020; 395: 497-506.
2. Zhang J., Litvinova M., Wang W., Yan Wang, Deng X., Chen X. et al. Evolving epidemiology and transmission dynamics of coronavirus disease 2019 outside Hubei province, China: a descriptive and modelling study. *Lancet Infect. Dis.* 2020; 20: 793-802.
3. Nussbaumer-Streit B., Mayr V., Dobrescu A.I., Chapman A., Persad E., Klerings I. et al. Quarantine alone or in combination with other public health measures to control COVID-19: a rapid review. *Cochrane Database Syst Rev.* 2020; 4CD013574.
4. Wölfel R., Corman V.M., Guggemos W., Seilmaier M., Zange S., Marcel A. Mülleret al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature.* 2020; 581: 465-9.
5. He X., Lau E.H.Y., Wu P., Deng X., Wang J., Hao X. et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat. Med.* 2020; 26: 672-5.
6. Rothe C., Schunk M., Sothmann P., Bretzel G., Froeschl G., Wallrauch C. et al. Transmission of 2019-nCoV infection from an asymptomatic contact in Germany. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382: 970-1.
7. Ferretti L., Wymant C., Kendall M., Zhao L., Nurtay A., Abeler-Dörneret L. al. Quantifying SARS-CoV-2 transmission suggests epidemic control with digital contact tracing. *Science.* 2020; 368eabb6936.
8. Goncharova E.B., Donnikova A. E., Kadochnikova V.V., Morozova S.A., Boldyreva M. N., Galkina I. S. et al. Diagnosis of the virus that causes COVID-19 using real-time PCR. *Farmakoeconomika. Sovremennaja farmakoeconomika i farmakoepidemiologija.* 2020; 13(1): 52-63. (in Russian)
9. Jin Y.H., Cai L., Cheng Z.S., Cheng H., Deng T., Fan Y.P. et al. A rapid advice guideline for the diagnosis and treatment of 2019 novel coronavirus (COVID-19) infected pneumonia (standard version). *Mil. Med. Res.* 2020; 7(1): 4.

10. Wan Z.Y., Zhang X., Yan X.G. IFA in testing specific antibody of SARS coronavirus. *South China J. Prev. Med.* 2003; 29 (3): 36-7.
11. Lou B., Li T., Zheng S., Su Y.Y., Li Z.Y., Liuet W. et al. Serology characteristics of SARS-CoV-2 infection since the exposure and post symptoms onset. *MedRxiv.* Preprint posted March 27; 2020.
12. Lee H.K., Lee B.H., Seok S.H., Baek M.W., Lee H.Y., Kim D.J. et al. Production of specific antibodies against SARS coronavirus nucleocapsid protein without cross reactivity with human coronaviruses 229E and OC43. *J. Vet. Sci.* 2010; 11 (2):165-7.
13. CDC. Laboratories. Interim Guidelines for COVID-19 Antibody Testing in Clinical and Public Health Settings. August. 1; 2020.
14. Kontou P.I., Braliou G.G., Dimou N.L., Nikolopoulos G., Bagos P.G. Antibody Tests in Detecting SARS-CoV-2 Infection: A Meta-Analysis. *Diagnostics (Basel).* 2020; 10(5): 319.
15. Zhao J., Yuan Q., Wang H., Liu W., Liao X., Su Y. et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clin. Infect. Dis.* 2020; (published online March 28.) DOI:10.1093/cid/ciaa344.
16. Qu J., Wu C., Li X., Zhang G., Jiang Z., Li X. et al. Profile of IgG and IgM antibodies against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Clin. Infect. Dis.* 2020; (published online April 27.). DOI:10.1093/cid/ciaa489.
17. Zhang B., Zhou X., Zhu C., Feng F., Qiu Y., Feng J. et al. Immune phenotyping based on neutrophil-to-lymphocyte ratio and IgG predicts disease severity and outcome for patients with COVID-19. *MedRxiv.* 2020; (published online March 16.) (preprint). DOI: 10.1101/2020.03.12.20035048.
18. Zhang W., Du R.H., Li B., Zheng X.S., Yang L. X., Hu B. et al. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes. *Emerg. Microbes Infect.* 2020; 9: 386-9. Doi: 10.1080/22221751.2020.1729071.
19. Perera R.A., Mok C.K., Tsang O.T., Lv H., Ko R.L., Wu N.C. et al. Serological assays for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Eurosurveillance.* 2020;25. Doi:10.2807/1560-7917.es.2020.25.16.2000421.
20. Amanat F., Stadlbauer D., Strohmeier S., Nguyen T.H.O., Chromikova V., McMahon M. et al. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nat. Med.* 2020. Doi:10.1038/s41591-020-0913-5.
21. Meyer B., Drosten C., Müller M.A. Serological assays for emerging coronaviruses: Challenges and pitfalls. *Virus Res.* 2014; 194: 175-83. Doi: 10.1016/j.virusres.2014.03.018.
22. Grzelak L., Temmam S., Planchais C., Demeret C., Huon C., Guivel F. et al. SARS-CoV-2 serological analysis of COVID-19 hospitalized patients, pauci-symptomatic individuals and blood donors. *MedRxiv.* 2020. Doi:10.1101/2020.04.21.20068858.
23. Wu F., Wang A., Liu M., Wang Q., Chen J., Xia S. et al. Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in a COVID-19 recovered patient cohort and their implications. *MedRxiv.* 2020. Doi:10.1101/2020.03.30.20047365.
24. Liu W., Liu L., Kou G., Zheng Y., Ding Y., Ni W. et al. Evaluation of Nucleocapsid and Spike Protein-based ELISAs for detecting antibodies against SARS-CoV-2. *J. Clin. Microbiol.* 2020; 58. Doi:10.1128/JCM.00461-20.
25. To K.K.W., Tsang O.T.Y., Leung W.S., Tam A.R., Wu T.C., Lung D.C. et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect. Dis.* 2020; 20: 565-74. Doi:10.1016/s1473-3099(20)30196-1.
26. Elslande J. V., Decru B., Jonckheere S., Wijngaerden E. V., Houben E., Vandecandelaere P. Clinical Microbiology and Infection Antibody response against SARS-CoV-2 spike protein and nucleoprotein evaluated by 4 automated immunoassays and 3 ELISAs. *Clinical Microbiology and Infection.* 2020; 0(0).
27. Dutta N.K., Kaushiki M., James G T. The Nucleocapsid Protein of SARS-CoV-2: a Target for Vaccine Development. *J. Virol.* 2020; 94(13): e00647-20.
28. Nikitina A.V., Mardany S.G., Pomazanov V.V. Comparative evaluation of the immunochromatographic test for detection of hemoglobin. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2020; 65 (7): 439-42. (in Russian)
29. Mardany S.G. Development and testing of new enzyme-linked immunosorbent assay systems for the diagnosis of toxoplasmosis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2009; 2: 37-8. (in Russian)
30. Mardany S.G., Dmitriev G.A. Laboratory diagnosis of syphilis. Methodological guide. Jeletrogorsk-Vladimir: TRANZIT- IKS; 2011. (in Russian)
31. Mardany S.G., Kirpichnikova G.I., Neverov V.A. Cytomegalovirus infection. Etiology, epidemiology, pathogenesis, clinical picture, laboratory diagnostics, treatment, prevention. Methodological guide. Jeletrogorsk: TRANZIT- IKS; 2011. (in Russian)
32. Mardany S.G. Immunoassay test kits of JSK "EKOLab" for the diagnosis of herpes simplex. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2008;2: 35-8. (in Russian)
33. Mardany S.G., Kirpichnikova G.I., Neverov V.A. Toxoplasmosis. Jeletrogorsk: TRANZIT- IKS; 2012. (in Russian)

Поступила 07. 09.2020

Принята к печати 29.09.2020

© МАРДАНЛЫ С.Г., АВДОНИНА А.С., 2020

Марданлы С.Г.^{1,2,3}, Авдонина А.С.¹

ИММУННЫЙ БЛОТТИНГ КАК МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ТОКСОПЛАЗМЕННОЙ ИНФЕКЦИИ

¹ЗАО «ЭКОлаб», 142530, г. Электрогорск Московской обл., Россия;

²ГОУ ВО МО Государственный гуманитарно-технологический университет, 142600, г. Орехово-Зуево Московская обл., Россия;

³ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), 119991, Москва, Россия

Разработан набор реагентов для выявления иммуноглобулинов класса G к отдельным антигенам Toxoplasma gondii методом иммунного блоттинга в формате «Western blot». Проведенные лабораторные испытания с использованием первого международного стандарта ВОЗ «Anti-toxoplasma serum (IgG), human, Lyophilized, 20 IU / ampoule» ф. «NIBSC» (Великобритания) продемонстрировали аналитическую чувствительность нового набора, равную 10 МЕ/мл. Предварительное исследование диагностической эффективности нового набора показало его высокую чувствительность, равную 98,51 – 100 %, а также высокую специфичность, равную 99,5 – 100 %. Разработанный набор реагентов предназначен для проведения подтверждающих исследований при лабораторной диагностике токсоплазмоза.

Ключевые слова: клиническая лабораторная диагностика; Toxoplasma gondii; токсоплазмоз; иммуноферментный анализ; иммунный блоттинг; иммуноглобулины класса G (IgG).

Для цитирования: Марданлы С.Г., Авдонина А.С. Иммунный блоттинг как метод диагностики токсоплазменной инфекции. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65(11): 693-698. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-11-693-698>
Mardarly S.G.^{1,2,3}, Avdonina A.S.¹

IMMUNE BLOTTING AS A METHOD FOR DIAGNOSIS OF TOXOPLASMOSIS

¹The closed corporation "EKOLab", Elektrogorsk, 142530, Moscow region, Russia;

²State University of Humanities and Technology, 142600, Orekhovo-Zuyevo, Moscow region, Russia;

³I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 11991, Moscow, Russia

Test kit for detection of IgG-antibodies to individual antigens of Toxoplasma gondii by immune blotting («Western blot» format) has been developed. Laboratory testing with first international WHO standard «Anti-toxoplasma serum (IgG), human, Lyophilized, 20 IU / ampoule» (NIBSC, Great Britain) demonstrated the analytical sensitivity of the new kit equal to 10 IU / ml. Study of the diagnostic efficiency of the new kit showed its high sensitivity, equal to 98.51 – 100%, and high specificity, equal to 99.5 – 100%. New test kit is intended for confirmatory testing in laboratory diagnostics of toxoplasmosis.

Key words: clinical laboratory diagnostics; Toxoplasma gondii; toxoplasmosis, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immune blotting (IB), IgG-antibodies.

For citation: Mardarly S.G., Avdonina A.S. Immune blotting as a method for diagnosis of toxoplasmosis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65 (11): 693-698 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-11-693-698>

For correspondence: Mardarly S.G., doctor of medical sciences, academician of the Russian academy of medical technical sciences; professor of department of pharmacology and pharmaceutical disciplines of State University of Humanities and Technology; professor of department of Epidemiology and Modern Vaccination Technologies Sechenov University; president and director of science of Closed Joint Stock Company «EKOLab»; e-mail: ekolab-president@mail.ru

Information about authors:

Mardarly S.G., <https://orcid.org/0000-0002-4556-135X>;

Avdonina A.S., <https://orcid.org/0000-0002-2990-4930>.

Acknowledgments. The study had no sponsor support.

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Received 03.09.2020
Accepted 15.09.2020

Токсоплазмоз – антропозооноз, входящий в группу инфекций TORCH, в которую в настоящее время включают также краснуху, цитомегаловирусную инфекцию (ЦМВИ) и простой герпес (ПГ или герпетическая инфекция) [1-5].

Хотя токсоплазмоз чаще всего именуют в литературе инфекцией (иногда паразитарной инфекцией) и объединяют в одну группу с названными вирусными инфекциями, он, строго говоря, является не инфекцией, а инва-

зией – процессом, связанным с заражением простейшим животным – кокцидией *Toxoplasma gondii* — облигатным внутриклеточным паразитом, имеющим сложный цикл развития, в котором человек – это лишь промежуточный хозяин [3, 6]. Хотя *T. gondii* относится к царству простейших (Protozoa), ее строение по сравнению с другими возбудителями группы TORCH намного сложнее, что в сочетании с особенностями цикла развития делает значительно более сложным и ее взаимодействие с орга-

Для корреспонденции: Марданлы Сейфадин Гашимович, д-р мед. наук, акад. Российской академии медико-технических наук; проф. каф. фармакологии и фармацевтических дисциплин ГГТУ, проф. каф. эпидемиологии и современных технологий вакцинации «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава РФ»; e-mail: ekolab-president@mail.ru

низмом хозяина как на гуморальном, так и на клеточном уровне. По этой причине включение токсоплазма в группу инфекций TORCH только на основании тяжести последствий заражения беременной *T. gondii* для плода и/или новорожденного можно считать несколько искусственным.

У иммунокомпетентных взрослых токсоплазмоз, как правило, протекает доброкачественно или просто бессимптомно, что делает исключительно актуальной своевременную диагностику этой инвазии у женщин, планирующих беременность, у беременных и новорожденных, причем основную роль в этом играют лабораторные методы исследования, в частности, серологическая диагностика. Наиболее эффективным на сегодня методом признан иммуноферментный анализ (ИФА), основанный на использовании компонентов соответствующей серологической реакции, несущих ферментную «метку». ИФА, позволяющий выявлять в сыворотке (плазме) и в спинномозговой жидкости специфические антитела (как правило IgM и IgG), широко используется при перинатальном скрининге и для верификации диагноза [1, 2, 4, 7].

Антитела класса М при токсоплазмозе появляются первыми в ответ на внедрение возбудителя в течение первых двух недель от момента заражения. Их количество достигает максимума на 4-8 нед заболевания, после чего снижается до полного исчезновения в течение нескольких месяцев. В отдельных случаях IgM могут обнаруживаться в крови до 18 месяцев.

Антитела класса G (IgG) появляются на 6-8 нед заболевания и сохраняются в течение нескольких лет, обеспечивая длительный иммунитет. Их количество достигает максимума через 1-2 месяца [1].

Однако при диагностике врожденного токсоплазмоза одного положительного результата исследования в ИФА может оказаться недостаточно, поскольку в крови новорожденного могут присутствовать материнские антитела [8].

Поэтому в настоящее время в практике диагностических лабораторных исследований все шире используется такой вариант ИФА, как иммунный блоттинг (ИБ), который в отличие от классического ИФА дает в одной постановке оценку наличия в исследуемых образцах специфических иммуноглобулинов к различным антигенам возбудителя, что с учетом динамики иммунологической перестройки инфицированного позволяет определять у него не только наличие соответствующей инфекции, но и ее стадию, а применительно к токсоплазмозу оценивать наличие или отсутствие врожденного токсоплазмоза по спектрам антител у матери и новорожденного [9-12].

Иммунный блоттинг (ИБ) – это, по сути, твердофазный ИФА, в котором роль иммуносорбента выполняют полоски (стрипы) нитроцеллюлозной мембраны с нанесенными на нее антигенами, антитела к которым и являются искомым анализом.

В зависимости от способа нанесения антигенов на мембрану различают ИБ в форматах «Western blot или «Line blot». Для «Western blot» на мембрану методом электропереноса наносят нативные антигены из подвергнутого электрофорезу лизата культуры соответствующего возбудителя, для «Line blot» на мембрану в определенном порядке наносят отдельные антигены (как правило, синтетические или рекомбинантные, поскольку выделение и очистка соответствующих нативных антигенов – достаточно дорогая и трудоемкая операция)

либо цельных лизатов (для одновременной оценки наличия антител к нескольким различным патогенам). Возможно также комбинация этих двух форматов ИБ [9].

Говоря о высокой эффективности ИБ при диагностике различных инфекций, следует отметить, что она определяется прежде всего возможностью адекватной интерпретации результатов исследования, т.е. объективностью идентификации окрашенных зон на стрипах при исследованиях в формате «Western blot», что, очевидно, напрямую связано с наличием достоверной информации об антигенном составе соответствующих возбудителей и роли каждого антигена в иммунологической перестройке зараженного организма, т.е. при наличии обстоятельных исследований динамики спектров специфических антител в крови инфицированного по ходу развития инфекции. Та же информация необходима и при выборе антигенов, наносимых на иммуносорбент при использовании для диагностики формата «Line blot».

В этом отношении *T. gondii* – не слишком благодарный объект для исследования и, прежде всего, по причине уже упомянутой сложности антигенного строения. Так, S.B. Delibas и соавт. [13] показали, что помимо большого числа антигенов, выявляемых при ИБ в формате «Western blot», различные штаммы возбудителя имеют различный антигенный состав – так, у штамма RH было выявлено 14 антигенов, а у штамма TRH – 18 антигенов с молекулярной массой в диапазоне 17-105 килоДальтон (кДа).

В отношении выбора самых важных с диагностической точки зрения антигенов *Toxoplasma gondii* наиболее признанным на сегодня можно считать выбор специалистов фирмы «Microgen Diagnostics» (Германия) [14] (табл. 1).

Благодаря возможности выявления антител к отдельным антигенам возбудителя ИБ входит в число тестов, рекомендуемых для диагностики токсоплазмоза [15-20], и по этой причине разработка отечественных тест-систем соответствующего формата, очевидно, актуальна.

Целью настоящего исследования явилась разработка тест-системы для ИБ в формате «Western blot» для выявления антител класса G к *Toxoplasma gondii*. При этом был использован опыт разработки таких систем для ряда других инфекций [9, 21-24].

Материал и методы. Основные материалы, использованные в работе:

- нативный лизат *T. gondii* штамма RH ф. «Biokit» (Испания);
- нитроцеллюлозная мембрана с диаметром пор 0,45 мкм ф. «Sartorius» (Германия);
- конъюгат козьих антител к IgG человека с щелочной фосфатазой ф. «Jackson Immunoresearch» (США);
- субстратный раствор фирмы «Kem-En-Tec» (Дания), содержащий 5-бром-1-хлор-3-индолилфосфат и нитроглюбулин тетразолий.

- В качестве референсного материала использовали:
- первый международный стандарт ВОЗ «Anti-toxoplasma serum (IgG), human, Lyophilized, 20 IU / ampoule» ф. «NIBSC» (Великобритания), содержащий IgG человека к *T. gondii* в количестве 20 международных единиц в ампуле (МЕ/ампула);
 - стандартную панель положительных образцов предприятия ЗАО «ЭКОлаб», содержащих IgG к *T. gondii* (СОП⁺-Токсоплазма-G – 12 образцов);
 - стандартную панель отрицательных образцов предприятия ЗАО «ЭКОлаб», не содержащих IgG к *T. gondii* (СОП⁻-Токсоплазма-G – 12 образцов).

Перечень диагностически значимых антигенов *Toxoplasma gondii* (по [14])

| Белок (антиген) | Описание | Характеристика |
|-----------------|---|----------------------------------|
| p66 (ROP1) | Rhoptry protein 1 – белок специализированных органелл | Антиген тахизоитов и брадизоитов |
| p65 (MAG1) | Matrix antigen 1 – матричный антиген | Антиген брадизоитов |
| p35 (GRA8) | Granular antigen 8 – гранулярный антиген | Антиген тахизоитов и брадизоитов |
| p30 (SAG1) | Surface antigen 1 – поверхностный антиген | Антиген тахизоитов |
| p29 (GRA7) | Granular antigen 7 – гранулярный антиген | Антиген тахизоитов и брадизоитов |

Образцы стандартных панелей изготавливали из сывороток, полученных в коммерческой лаборатории «ИН-ВИТРО» (Москва) и предварительно исследованных на наличие или отсутствие IgG к *T. gondii* в тест-системах «ИФА-Токсо-IgM» и «Лайн-Блот TORCH-профиль-IgM» [25] фирмы ЗАО «ЭКОлаб» (Россия).

В качестве клинического материала были использованы образцы сыворотки и плазмы крови человека, полученные из Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора (Москва) и имеющие отрицательный результат в отношении ВИЧ-инфекции, гепатитов В и С и сифилиса. Данные образцы были исследованы на наличие IgG к *T. gondii* в тест-системе «ИФА-Токсо-IgG» ф. ЗАО «ЭКОлаб».

Расчет показателей диагностической чувствительности, специфичности и эффективности, а также статистическая обработка полученных результатов выполнены в соответствии с рекомендациями по анализу и статистической оценке результатов клинико-лабораторных исследований [26, 27].

Статистическую достоверность результатов испытаний определяли по формуле:

$$D\% = (1 - C/100)^{(1/n)} * 100\%,$$

где D% – статистическая достоверность результатов испытаний, выраженная в процентах;

C – доверительная вероятность;

n – число исследованных проб [26].

Расчеты проводили для доверительной вероятности 95 % ($p = 0,05$).

В процессе разработки применяли следующие методы:

- вертикальный электрофорез белков в полиакриламидном геле (восстановленные условия по U.K. Laemmli [28]) с целью разделения их по молекулярному весу;
- электроперенос (блоттинг) разделенных белков на нитроцеллюлозную мембрану;
- иммуноферментный анализ в разновидности «иммунный блоттинг».

Результаты и обсуждение. В процессе работы были решены следующие задачи:

- подобрана оптимальная концентрация акриламида и бисакриламида в полиакриламидном геле для наилучшего разделения отдельных белков *T. gondii* по всему градиенту;
- отработаны условия электрофореза и электропереноса (вольтаж, температура, продолжительность);
- выбран блокирующий буферный раствор для обработки мембран после электропереноса с целью предотвращения неспецифического связывания;
- оптимизированы составы реагентов для проведения анализа;
- отработана процедура проведения анализа (разведение исследуемых образцов, время инкубаций).

Самым важным этапом в разработке новой тест-системы стал этап получения иммуносорбента.

В процессе экспериментальной работы было установлено, что для наилучшего разделения белков, входящих в состав нативного лизата *T. gondii*, наиболее целесообразно использовать градиентный полиакриламидный гель с интервалом значений концентраций в градиенте от 4 до 17 %.

В качестве условий проведения электрофореза были приняты температура +7 °С, продолжительность 4,5 ч и переменный вольтаж (100 В в начале процесса, 150 В через 1 ч и 250 В еще через 1 ч). В качестве условий проведения электропереноса были приняты температура +15 °С, продолжительность 3 ч и вольтаж 100 В.

В качестве блокирующего раствора для мембран был выбран трис-солевой буфер (pH = 7,5) с содержанием 1% бычьего сывороточного альбумина.

Результатом разработки стал набор реагентов «ИФА-Блот-Токсоплазма-IgG», предназначенный для выявления иммуноглобулинов класса G к отдельным антигенам *Toxoplasma gondii* методом иммунного блоттинга в формате «Western blot».

Реагенты, входящие в состав набора, были подобраны следующим образом:

1. Иммуносорбент — 24 стрипа из нитроцеллюлозной мембраны с нанесенными на них методом электропереноса отдельными антигенами *T. gondii* и контрольной линией, представленной козьими антителами к IgG человека.
2. Контрольный положительный образец.
3. Контрольный отрицательный образец.
4. Конъюгат козьих антител к IgG человека с щелочной фосфатазой.
5. Субстратный раствор, содержащий 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат и нитроголубой тетразолий.
6. 5-кратный концентрат промывочного раствора.
7. Раствор для разведения сывороток.
8. Фотография референс-стрипа с проявленным антигенным профилем *T. gondii*.

Процедура проведения анализа была отработана следующим образом:

- выбрано разведение образца 1:100;
- инкубация стрипов иммуносорбента с исследуемыми образцами на шейкере-качалке при комнатной температуре – 30 мин;
- 3 промывки по 5 мин;
- инкубация стрипов иммуносорбента с конъюгатом на шейкере-качалке при комнатной температуре – 30 мин;
- 3 промывки по 5 мин;
- инкубация стрипов иммуносорбента с субстратным раствором на шейкере-качалке при комнатной температуре в темноте – 10 мин;
- остановка реакции водой очищенной.

Электрофоретическое разделение лизата *T. gondii* на отдельные белки в сравнении с белковым маркером молекулярного веса показало, что антигенный профиль

нативного лизата *Toxoplasma gondii* штамма RH ф. «Bio-kit» представлен белками с молекулярными массами 66, 65, 35, 30 и 29 килоДальтон (кДа), которые являются наиболее диагностически важными антигенами.

Расположение соответствующих зон на стрипе иммуносорбента показано на рисунке.

Результаты теста оценивают визуально. Интерпретация результатов, полученных при исследовании каждого образца, осуществляется в зависимости от того, к каким антигенам были выявлены антитела (табл. 2).

В большинстве случаев достаточно установления факта инвазии, однако для отдельных групп пациентов актуальным является определение стадии заболевания. Для этого полученные результаты по наличию IgG к отдельным антигенам *T. gondii* рекомендуется рассматривать совместно с данными по наличию IgM к отдельным антигенам.

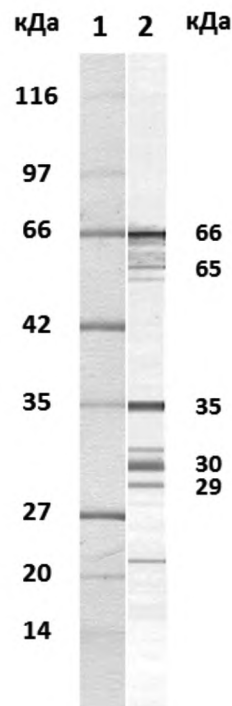
Специалистами «Microgen Diagnostics» (Германия) [14] предложена интерпретация спектров антител, получаемых при ИБ, с точки зрения клинической информативности (табл. 3).

Следующим этапом разработки стала оценка чувствительности и специфичности нового набора реагентов.

Аналитическая чувствительность тест-системы «ИФА-Блот-Токсоплазма-IgG» в первую очередь была исследована на Первом международном стандарте ВОЗ «Anti-toxoplasma serum (IgG), human, Lyophilized, 20 IU / ampoule» ф. «NIBSC» (Великобритания), содержащем IgG человека к *T. gondii* в количестве 20 международных единиц в ампуле (МЕ/ампула), и составила 10 МЕ/мл.

Затем чувствительность тест-системы была оценена на образцах стандартных панелей предприятия ЗАО «ЭКОлаб», содержащих и не содержащих IgG к *T. gondii*. Результаты данного исследования приведены в табл. 4.

Результаты, представленные в табл. 4, свидетельствуют о полном совпадении итоговых оценок, полученных при исследовании образцов стандартных панелей в разработанном наборе реагентов, с их паспортными характеристиками, что позволяет сделать заключение о том,



Расположение антигенов *T. gondii* на стрипе иммуносорбента.

1 – результат электрофоретического разделения белкового маркера молекулярного веса; 2 – результат исследования сыворотки, положительной по наличию IgG к *T. gondii*, при инкубации с мембраной, на которую нанесены отдельные антигены нативного лизата *T. gondii*, подвергнутого электрофорезу.

что аналитическая чувствительность и специфичность нового набора составляют 100 %. При этом в случае с положительными образцами наблюдается следующая зависимость: по мере увеличения в образцах концентрации IgG к *T. gondii* в МЕ/мл возрастает количество анти-

Таблица 2

Интерпретация результатов ИБ в тест-системе «ИФА-Блот-Токсоплазма-IgG»

| Наличие IgG к антигенам <i>T. gondii</i> | Обозначение | Результат |
|--|-------------|----------------|
| Выявлены антитела к гранулярному антигену p35 (GRA8). Антитела к другим антигенам могут присутствовать или отсутствовать | + | Положительный |
| Не выявлены антитела ни к одному из антигенов | - | Отрицательный |
| Выявлены антитела к любому антигену, кроме p35, при отсутствии антител к антигену p35 | +/- | Неопределенный |

Таблица 3

Спектры антител на разных стадиях токсоплазмоза (по [14])

| Стадия инфекции | Наличие антител к антигенам ... | | | | |
|---|---------------------------------|------------|------------|------------|------------|
| | p66 (ROP1) | p65 (MAG1) | p35 (GRA8) | p30 (SAG1) | p29 (GRA7) |
| Сероконверсия (0-3 мес с момента заражения) | IgM+ | IgM+/- | IgM+ | - | IgM+/- |
| | IgG+/- | IgG+/- | IgG+ | | IgG+ |
| Активная инфекция (3-6 мес) | IgM+ | IgG+ | IgM+ | IgG+ | IgM+/- |
| | IgG+/- | | | | |
| Подострая инфекция (6-12 мес) | IgM+ | IgG+ | IgG+ | IgG+ | IgG+ |
| | IgG+/- | | | | |
| Латентная инфекция (более 1 года) | IgM+ | IgG+/- | IgG+ | IgG+ | IgG+ |
| | IgG+/- | | | | |
| Прошедшая инфекция (более 2 лет) | - | IgG+/- | - | IgG+ | IgG+ |

Таблица 4

Результаты исследования образцов стандартных панелей в тест-системе «ИФА-Блот-Токсоплазма-IgG»

| Панель | № образца | «ИФА-Токсо-IgG» | | | «Лайн-Блот ToRCH-профиль-IgG» | «ИФА-Блот-Токсоплазма-IgG» | |
|------------------------|-----------|----------------------|--------------------------|-----------|-------------------------------|---------------------------------|-----------|
| | | Индекс позитивности* | Концентрация IgG в МЕ/мл | Результат | Результат | Наличие антител к антигенам ... | Результат |
| Положительных образцов | 1 | 1,2 | 17 | положит. | положит. | p35, p30 | положит. |
| | 2 | 1,2 | 21 | положит. | положит. | p35, p30 | положит. |
| | 3 | 1,4 | 28 | положит. | положит. | p66, p35 | положит. |
| | 4 | 1,4 | 34 | положит. | положит. | p35 | положит. |
| | 5 | 1,6 | 42 | положит. | положит. | p66, p35, p30 | положит. |
| | 6 | 1,9 | 62 | положит. | положит. | p66, p35 | положит. |
| | 7 | 2,1 | 88 | положит. | положит. | p35 | положит. |
| | 8 | 4,2 | 167 | положит. | положит. | p66, p65, p35, p30 | положит. |
| | 9 | 14,8 | 199 | положит. | положит. | p66, p65, p35, p30, p29 | положит. |
| | 10 | 15,1 | 200 | положит. | положит. | p66, p65, p35, p30, p29 | положит. |
| | 11 | 15,4 | 200 | положит. | положит. | p66, p65, p35, p30 | положит. |
| | 12 | 15,8 | 200 | положит. | положит. | p66, p65, p35, p30, p29 | положит. |
| Отрицательных образцов | 1 | 0,2 | - | отрицат. | отрицат. | - | отрицат. |
| | 2 | 0,2 | - | отрицат. | отрицат. | - | отрицат. |
| | 3 | 0,3 | - | отрицат. | отрицат. | - | отрицат. |
| | 4 | 0,5 | - | отрицат. | отрицат. | - | отрицат. |
| | 5 | 0,2 | - | отрицат. | отрицат. | - | отрицат. |
| | 6 | 0,3 | - | отрицат. | отрицат. | - | отрицат. |
| | 7 | 0,4 | - | отрицат. | отрицат. | - | отрицат. |
| | 8 | 0,4 | - | отрицат. | отрицат. | - | отрицат. |
| | 9 | 0,6 | - | отрицат. | отрицат. | - | отрицат. |
| | 10 | 0,5 | - | отрицат. | отрицат. | - | отрицат. |
| | 11 | 0,7 | - | отрицат. | отрицат. | - | отрицат. |
| | 12 | 0,3 | - | отрицат. | отрицат. | - | отрицат. |

Примечание. * - индекс позитивности - отношение оптической плотности в лунках с исследуемыми образцами к критической оптической плотности.

Таблица 5

Результаты исследования образцов клинического материала в тест-системе «ИФА-Блот-Токсоплазма-IgG»

| Группа образцов | Число исследованных образцов | Результаты исследования в ИБ | |
|---|------------------------------|------------------------------|---------------|
| | | Положительный | Отрицательный |
| Образцы, содержащие IgG к <i>T. gondii</i> | 190 | 190 | 0 |
| Образцы, не содержащие IgG к <i>T. gondii</i> | 605 | 0 | 605 |

генов, к которым обнаруживаются антитела. Это свидетельствует о хорошей чувствительности разработанной тест-системы и об информативности полученных в ИБ данных.

Оценку диагностической эффективности нового набора реагентов «ИФА-Блот-Токсоплазма-IgG» проводили путем исследования 800 образцов клинического материала. 190 образцов по результатам скринингового исследования содержали IgG к *T. gondii*, 605 образцов не содержали IgG к *T. gondii*, 5 образцов были определены как сомнительные (оптическая плотность в ИФА в пределах «серой зоны»).

Результаты данного исследования приведены в обобщенном виде в табл. 5.

Полученные результаты с доверительной вероятностью 95% демонстрируют диагностическую чувствительность, не менее 98,51%, и диагностическую специфичность – не менее 99,5 %.

Из 5 сомнительных образцов 3 были определены как положительные в ИБ, а 2 – как отрицательные.

Итоговая оценка диагностической эффективности

разработанной тест-системы с доверительной вероятностью 95 % дает значение 99–100 %.

Выводы

1. Разработан набор реагентов «ИФА-Блот-Токсоплазма-IgG», предназначенный для выявления иммуноглобулинов класса G к отдельным антигенам *Toxoplasma gondii* методом иммунного блоттинга в формате «Western blot», который характеризуется высокими показателями чувствительности, специфичности и диагностической эффективности.

2. Данный набор реагентов после прохождения процедуры государственной регистрации медицинского изделия может быть использован для проведения подтверждающих исследований в диагностике токсоплазмоза с целью верификации сомнительных результатов скрининга и определения стадии заболевания.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 7, 8, 10-20, 28
см. REFERENCES)

1. Марданлы С.Г., Симонова Е.Г., Симонов В.В. Инфекции TORCH-группы: клиническая лабораторная диагностика, эпидемиологический надзор и контроль. М.: Транзит-ИКС; 2018.
2. Долгих Т.И. Токсоплазмоз: современная стратегия лабораторной диагностики. *Инфекция и иммунитет*. 2011; 1(1): 43–50.
3. Казанцев А.П. Токсоплазмоз. Л.: Медицина, 1985.
4. Марданлы С.Г. Эпидемиологический надзор за инфекциями TORCH-группы на основе современных технологий лабораторной диагностики. Дис. ... д-ра мед. наук. М.; 2016.
5. Марданлы С.Г., Кирпичникова Г.И., Неверов В.А. Токсоплазмоз: этиология, эпидемиология, патогенез, клиника, лабораторная диагностика, профилактика. Методическое пособие. Электргорск: ЗАО «ЭКОлаб»; 2005.
6. Грачева Л.И. Проблема токсоплазмоза. *Педиатрия*. 1999; 4: 83–6.
9. Марданлы С.Г., Симонов В.В., Авдонина А.С. Производство наборов реагентов для клинической лабораторной диагностики иммунохимическими методами. Орехово-Зуево: ГГТУ; 2017.
21. Авдонина А.С., Марданлы С.Г., Юминова Н.В. Разработка иммуноферментной тест-системы для выявления антител класса М к индивидуальным белкам цитомегаловируса человека методом иммунного блоттинга в формате «Western blot». *Вестник современной клинической медицины*. 2016; 9(5): 7-14.
22. Марданлы С. Г., Авдонина А. С., Марданлы С. С., Шершнева Н. Н. Разработка набора реагентов для выявления антител класса G к отдельным антигенам вирусов простого герпеса первого и второго типов методом иммунного блоттинга в формате Western-Line-Blot. *Медицинский алфавит*. 2017; 4(38): 33-40.
23. Марданлы С.Г., Авдонина А.С. Разработка набора реагентов для выявления антител класса G к отдельным антигенам вируса краснухи методом иммунного блоттинга в формате «Western blot». *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63(11): 696-701.
24. Марданлы С.Г., Авдонина А.С. Разработка набора реагентов для выявления антител класса G к отдельным антигенам цитомегаловируса методом иммунного блоттинга в формате Western Blot. *Клиническая дерматология и венерология*. 2014; 1: 18-24.
25. Арсеньева В.А., Амелина Е.А., Марданлы С.Г., Ротанов С.В. Линейный иммуноблоттинг для одновременного выявления антител к основным возбудителям инфекций TORCH-группы. *Медицинский алфавит*. 2017; 20(317): 43–8.
26. Антонов В.С. Вопросы статистической оценки результатов клинических испытаний медицинских изделий для in vitro диагностики. Доступно по адресу: <https://docplayer.ru/118768-Voprosy-statisticheskoy-ocenki-rezultatov-klinicheskikh-ispytaniy-meditsinskikh-izdeliy-dlya-in-vitro-diagnostiki-antonov-v-s-zamestitel-generalnogo.html> (По состоянию на 28.09.2020).
27. Чернов В.И., Есауленко И.Э., Родионов О.В., Семенов С.Н. *Медицинская информатика: учебное пособие*. Ростов н/Д: Феникс; 2007.

REFERENCES

1. Mardanyly S.G., Simonova E.G., Simonov V.V. Torch-group infections: clinical laboratory diagnostics, epidemiological surveillance and control [Infektsiya Torch-gruppy: klinicheskaya laboratornaya diagnostika, epidemiologicheskii nadzor i kontrol']. Moscow: Tranzit-IKS; 2018. (in Russian)
2. Dolgikh T.I. Toxoplasmosis: modern strategies of laboratory diagnostics. *Infektsiya i immunitet*. 2011; 1(1): 43-50. (in Russian)
3. Kazantsev A.P. Toxoplasmosis. [Toksoplazmoz]. Leningrad: Meditsina; 1985. (in Russian)
4. Mardanyly S.G. Epidemiological surveillance of TORCH-group infections based on modern technologies of laboratory diagnostics. Diss. Moscow; 2016. (in Russian)
5. Mardanyly S.G., Kirpichnikova G.I., Neverov V.A. Toxoplasmosis: etiology, epidemiology, pathogenesis, clinical picture, laboratory diagnostics, prevention. [Toksoplazmoz: jetiologija, jepidemiologija, patogenez, klinika, laboratornaja diagnostika, profilaktika. Metodicheskoe posobie]. Elektrogorsk: ЗАО «JeKOlаb»; 2005. (in Russian)
6. Gracheva L.I. Toxoplasmosis problem. *Pediatriya*. 1999; 4: 83-6. (in Russian)
7. Holec L., Hiszczynska-Sawicka E., Gasior A., Brillowska-Dabrowska A., Kur J. Use of MAG1 Recombinant Antigen for Diagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection in Humans. *Clin. Vaccine Immunol.* 2007; 14(3): 220–5.
8. Robert-Gagneux F., Gavinet M.F., Ancelle T., Raymond J., Tourte-Schaefer C., Dupouy-Camet J. Value of prenatal diagnosis and early

- postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: retrospective study of 110 cases. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37: 2893-8.
9. Mardanyly S.G., Simonov V.V., Avdonina A.S. Production of reagent kits for clinical laboratory diagnostics by immunochemical methods. [Proizvodstvo naborov reagentov dlja klinicheskoy laboratornoj diagnostiki immunohimicheskimi metodami]. Orekhovo-Zuevo: GGTU; 2017. (in Russian)
10. Capobianco J.D., Monica T.C., Ferreira F.P., Mitsuka-Breganó R., Navarro I.T., Garcia J.L., Reiche E.M.V. Evaluation of the Western blotting method for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. *J. Pediatr. (Rio J.)*. 2016; 92(6): 616-23.
11. Machado A.S., Andrade G.M.Q., Januário J.N., Fernandes M.D., Carneiro A.C.A.V., Carneiro M. et al. IgG and IgM western blot assay for diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2010; 105(6): 757-61.
12. Magi B., Migliorini L. Western blotting for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. *New microbiologica*. 2011; 34: 93-5.
13. Delibas S.B., Ertabaklar H., Ertug S. Evaluation of antigenic variations between two virulent toxoplasma strains. *J. Med. Microbiol.* 2006; 55: 1333–5.
14. Pfrepper K.-I., Enders G., Gohl M., Krczal D., Hlobil H., Wassenberg D., Soutschek E. Seroreactivity to and Avidity for Recombinant Antigens in Toxoplasmosis. *Clin. Vaccine Immunol.* 2005; 12(8): 977–82.
15. Chumpitazi B.F., Boussaid A., Pelloux H., Racinet C., Bost M, Goullier-Fleuret A. Diagnosis of congenital toxoplasmosis by immunoblotting and relationship with other methods. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33: 1479–85.
16. Gross U., Luder C.G., Hendgen V., Heeg C., Sauer I., Weidner A., Krczal D., Enders G. Comparative immunoglobulin G antibody profiles between mother and child (CGMC test) for early diagnosis of congenital toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38: 3619–22.
17. Nielsen H.V., Schmidt D.R., Petersen E. Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis by Two-Dimensional Immunoblot Differentiation of Mother and Child Immunoglobulin G Profiles. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(2): 711–5.
18. Rilling V., Dietz K., Krczal D., Knotek F., Enders G. Evaluation of a commercial IgG/IgM Western blot assay for early postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2003; 22: 174–80.
19. Robert-Gagneux F., Commerce V., Tourte-Schaefer C., Dupouy-Camet J. Performance of a Western blot assay to compare mother and newborn anti-Toxoplasma antibodies for the early neonatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1999; 18: 648–54.
20. Tissot Dupont D., Fricker-Hidalgo H., Brenier-Pinchart M.P., Bost-Bru C., Ambroise-Thomas P., Pelloux H. Usefulness of Western blot in serological follow-up of newborns suspected of congenital toxoplasmosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2003; 22: 122–5.
21. Avdonina A.S., Mardanyly S.G., Yuminova N.V. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay system for detecting class M antibodies to individual proteins of human cytomegalovirus by immune blotting in the “Western blot” format. *Vestnik sovremennoy klinicheskoy meditsiny*. 2016; 9 (5): 7-14. (in Russian)
22. Mardanyly S.G., Avdonina A.S., Mardanyly S.S., Shershneva N.N. Line-Blot. *Meditsinskiy alfavit*. 2017; 4 (38): 33-40. (in Russian)
23. Mardanyly S.G., Avdonina A.S. Development of a set of reagents for detecting class G antibodies to individual rubella antigens by immune blotting in the “Western blot” format. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2018; 63 (11): 696-701. (in Russian)
24. Mardanyly S.G., Avdonina A.S. Development of a set of reagents for the detection of class G antibodies to individual cytomegalovirus antigens by immune blotting in the Western Blot format. *Klinicheskaya dermatologiya i venerologiya*. 2014; 1: 18-24. (in Russian)
25. Arsenyeva V.A., Amelina E.A., Mardanyly S.G., Rotanov S.V. Linear immunoblotting for the simultaneous detection of antibodies to the main pathogens of the TORCH group. *Meditsinskiy alfavit*. 2017; 20(317): 43-8. (in Russian)
26. Antonov V.S. Questions of statistical evaluation of the results of clinical trials of medical devices for in vitro diagnostics. Available at: <https://docplayer.ru/118768-Voprosy-statisticheskoy-otsenki-rezultatov-klinicheskikh-ispytaniy-meditsinskikh-izdeliy-dlya-in-vitro-diagnostiki-antonov-vs-zamestitel-generalnogo> (Accessed 28 September 2020). (in Russian)
27. Chernov V.I., Esaulenko I.E., Rodionov O.V., Semenov S.N. Medical informatics: a tutorial. [Meditsinskaya informatika: uchebnoe posobie]. Rostov-na-Donu: Feniks; 2007. (in Russian)
28. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680-5.

Поступила 03.09.20

Принята к печати 15.09.20

ЗАОЧНАЯ АКАДЕМИЯ ПОСЛЕДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Харсеева Г. Г.¹, Тюкавкина С. Ю.¹, Миронов А. Ю.²

ДИФТЕРИЯ: ХАРАКТЕРИСТИКА ВОЗБУДИТЕЛЯ И ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА (ЛЕКЦИЯ)

¹ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, 344022, г. Ростов-на-Дону, Россия;

²ФБун «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия

*Проблема дифтерийной инфекции остается актуальной, поскольку циркуляция токсигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae* сохраняется в организме бактерионосителей, несмотря на проводимую вакцинопрофилактику. В лекции изложены современные представления о свойствах возбудителя, факторах его патогенности (токсин, пили, поверхностные белки (67-72p (или DIP0733), DIP1281 и др.) и их роли в патогенезе заболевания. Представлена информация о клинико-эпидемиологической характеристике и современных методах лабораторной диагностики дифтерии. Описан алгоритм бактериологического исследования и методы определения токсигенных свойств возбудителя. Основы вакцинопрофилактики дифтерии как единственно эффективного средства предотвращения массовых вспышек этого заболевания рассмотрены в рамках предлагаемой лекции. Знание особенностей циркуляции штаммов *C. diphtheriae* в современных условиях, патогенетических и клинико-эпидемиологических особенностей дифтерии, современных методов лабораторной диагностики является важным и необходимым для врачей всех специальностей.*

Ключевые слова: *Corynebacterium diphtheriae*; дифтерийный токсин; факторы адгезии и инвазии; лабораторная диагностика.

Для цитирования: Харсеева Г. Г., Тюкавкина С. Ю., Миронов А. Ю. Дифтерия: характеристика возбудителя и лабораторная диагностика (лекция). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65 (11): 699-706.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-11-699-706>

Kharseeva G.G.¹, Tyukavkina S.Yu.¹, Mironov A.Yu.²

DIPHTHERIA: CHARACTERISTICS OF THE PATHOGEN AND LABORATORY DIAGNOSTICS (A LECTURE)

¹SBEI HPE «Rostov state medical university» Ministry of Health Protection of Russia, 344022, Rostov-on-Don, Russia;

²Federal State Institution of Science «Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology», of Federal Service of Surveillance on Consumer' Rights Protection and Human Wellbeing, Department for microbiology, 125212, Moscow, Russia

*The problem of diphtheria infection remains relevant, since the circulation of toxigenic strains of *Corynebacterium diphtheriae* persists in the body of bacterial carriers, despite ongoing vaccination. The lecture presents modern ideas about the properties of the pathogen, its pathogenicity factors (toxin, pili, surface proteins (67-72P (or DIP0733), DIP1281, etc.) and their role in the pathogenesis of the disease. Information about the clinical and epidemiological characteristics and modern methods of laboratory diagnostics of diphtheria is presented. The algorithm of bacteriological research and methods for determining the toxigenic properties of the pathogen are described. The basics of diphtheria vaccination as the only effective means of preventing mass outbreaks of this disease are considered in the framework of the proposed lecture. Knowledge of the peculiarities of the circulation of strains of *Corynebacterium diphtheria* in modern conditions, pathogenetic and clinical-epidemiological features of diphtheria, as well as modern methods of laboratory diagnostics is important and necessary for students of medical schools and infectious diseases doctors, pediatricians, bacteriologists, therapists, pulmonologists, epidemiologists, etc.*

Key words: *Corynebacterium diphtheriae*; diphtheria toxin; adhesion and invasion factors; laboratory diagnostics.

For citation: Kharseeva G. G., Tyukavkina S. Yu., Mironov A. Yu. Diphtheria: characteristics of the pathogen and laboratory diagnostics (lecture). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65 (11): 699-706 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-11-699-706>

For correspondence: *Kharseeva G.G.*, Professor, Head of the Department of Microbiology and Virology № 2; e-mail: galinagh@bk.ru

Information about authors:

Kharseeva G.G., <https://orcid.org/0000-0002-6226-2183>;

Tyukavkina S.Yu., <https://orcid.org/0000-0001-9291-2012>;

Mironov A.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-8544-5230>.

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Conflict of interest. *The authors declare absence of conflict of interest.*

Received 18.06.2020
Accepted 18.07.2020

Вакцинопрофилактика дифтерии препаратами дифтерийного анатоксина позволила за последнее столетие значительно снизить заболеваемость этой инфекцией в мире, однако не способствовала искоренению бактерионосительства и циркуляции возбудителя среди населения. В России в настоящее время случаи заболевания дифтерией почти не регистрируются. Подъём заболеваемости наблюдается в Индии, Индонезии, Нигерии, Йемене, странах Латинской Америки и, особенно, в Венесуэле. Резервуар инфекции сохраняется в странах Европейского Союза (Германия, Великобритания, Латвия и др.). Следует принимать во внимание тот факт, что антитоксический иммунитет, формирующийся в ответ на введение препаратов дифтерийного анатоксина, не препятствует адгезии и колонизации возбудителя на слизистой оболочке респираторного тракта прививаемых. У лиц с защитным уровнем антитоксина могут развиваться как бессимптомные формы заболевания (бактерионосительство), так и клинически выраженные. В сложившейся ситуации необходимым является совершенствование лабораторной диагностики дифтерии, постоянное проведение профилактических мероприятий, направленных на предотвращение и сдерживание распространения этой инфекции, а также дальнейших исследований по данной проблеме.

Этиология. Дифтерия – острое инфекционное заболевание, вызываемое токсигенными штаммами *Corynebacterium diphtheriae*, передающееся преимущественно воздушно-капельным путём, характеризующееся фибринозным воспалением в области «входных ворот», явлениями общей интоксикации и поражением сердечно-сосудистой, нервной и выделительной систем.

Род *Corynebacterium* (класс *Actinobacteria*, порядок *Actinomycetales*, семейство *Corynebacteriaceae*) включает более 120 видов коринебактерий, более 70 из которых имеют медицинское значение. *C. diphtheriae* впервые описана Klebs в 1883 г., чистая культура выделена Loeffler в 1884 г. Дифтерию вызывают токсигенные штаммы *C. diphtheriae*. Способностью продуцировать токсин, помимо *C. diphtheriae*, обладают *C. ulcerans* и *C. pseudotuberculosis*, являющиеся патогенными для человека и животных (крупный и мелкий рогатый скот, лошади, домашние животные). Случаи дифтерии, вызванные *C. ulcerans*, регистрируются в Великобритании и других европейских странах, в том числе, у лиц, привитых противодифтерийными препаратами. *C. pseudotuberculosis*, основным источником которого являются животные, вызывает у человека лимфаденит и считается одним из видов коринебактерий, которые могут вызвать дифтериеподобную инфекцию при лизогенизации бактериофагом, несущим *tox⁺*-ген *C. diphtheriae*.

Другие представители рода *Corynebacterium* (*Corynebacterium spp.* или недифтерийные коринебактерии), входят в состав нормальной микрофлоры организма человека и вызывают оппортунистические инфекции у иммунокомпрометированных лиц. Нетоксигенные штаммы *C. diphtheriae*, как и *Corynebacterium spp.*, считаются потенциальными патогенами, поскольку способны вызывать тяжёлые заболевания (инфекции респираторного тракта, кожи, эндокардит, полиневрит, остеомиелит, септический артрит и др.) и не контролируются средствами вакцинопрофилактики. Предрасполагающими факторами к развитию инфекционных поражений, вызванных этими микроорганизмами, являются алкоголизм, сахарный диабет, кариес зубов, цирроз печени, посещение стран с тропическим климатом.

C. diphtheriae неоднородна по результатам фенотипирования. На основе фенотипического биохимического исследования выделены биовары «*gravis*», «*mitis*» и промежуточный вариант – «*intermedius*». В 50-е годы описан вариант биовара «*mitis*» – *C. diphtheriae mitis var. belfanti*. Имеются указания на отсутствие филогенетической основы данной классификации, поскольку нет прямого соответствия между биоваром и аллелем *dtxR*, что связано, предположительно, с распространённостью горизонтального переноса генов. Предлагается подразделить вид *C. diphtheriae* на два подвида: *C. diphtheriae subsp. diphtheriae* и *C. diphtheriae subsp. lausannense*. Штаммы *C. diphtheriae* могут быть токсигенными, т. е. способными продуцировать дифтерийный экзотоксин, или нетоксигенными. Возбудителем дифтерии являются только токсигенные штаммы *C. diphtheriae*, в геном которых интегрирован профаг, несущий *tox⁺*-ген.

Эпидемиология. Дифтерия – антропоноз. Источником инфекции являются больные и бактерионосители токсигенных штаммов *C. diphtheriae*. Механизм передачи – аэрогенный. Регистрируют воздушно-капельный, контактно-бытовой и алиментарный пути передачи. Возбудитель устойчив во внешней среде: сохраняется при комнатной температуре до 7 мес, в пыли – до 5 нед, в воде и молоке – до 20 сут. Характерна сезонность: подъём заболеваемости наблюдают в сентябре-ноябре, спад – в апреле-августе. Восприимчивость населения к дифтерии зависит от уровня напряжённости противодифтерийного антитоксического иммунитета (содержание антитоксина в крови менее 0,01 МЕ/мл указывает на то, что индивидуум подвержен дифтерии, 0,01-0,09 МЕ/мл – минимальный защитный уровень (базовый иммунитет), 0,1 МЕ/мл и более – защитный). В допрививочный период эпидемический процесс характеризовался выраженной цикличностью. В пределах одной и той же территории периодически повышался уровень заболеваемости за счёт накопления восприимчивых к дифтерии лиц (прежде всего, маленьких детей) в силу ослабевающего уровня напряжённости коллективного иммунитета. В результате проведения плановой вакцинопрофилактики достигнуто значительное снижение заболеваемости дифтерией. Даже лица, привитые высокоиммуногенным препаратом – дифтерийным анатоксином, имеющие защитные уровни противодифтерийных антител, подвержены заболеванию. Известны случаи повторного заболевания дифтерией.

Гетерогенность генетической структуры *C. diphtheriae* определяет высокий уровень внутривидового биологического разнообразия. В России зарегистрирован 31 риботип циркулирующих штаммов *C. diphtheriae*. В 40-70-е годы XX века в популяции циркулировали штаммы биовара *gravis* риботипа *Lyon* (84,6%), в 80-е годы – *C. diphtheriae* биовара *mitis* риботипа *Otchakov* (29,4%) и биовара *gravis* риботипов *Sankt-Peterburg/Rossiya* (23,5%). В 90-е годы во время эпидемического подъёма в России доминировали штаммы биовара *gravis* риботипов *Sankt-Peterburg/Rossiya* (75-96,1%). В период наступления эпидемического благополучия (2003-2008 гг.) наблюдали снижение удельного веса риботипов *Sankt-Peterburg/Rossiya* до 72,1% и увеличение удельного веса риботипа *Otchakov* до 17%.

Для каждого эпидемического цикла характерно распространение определённых эпидемических клонов, процесс формирования которых начинается до повышения заболеваемости дифтерией и выражается в увеличе-

нии удельного веса штаммов определённого биовара и риботипа среди циркулирующих. В период спорадической заболеваемости популяция приобретает гетерогенную структуру, в результате появляются эпидемические штаммы, способные к инфицированию большого числа людей, у которых к этим штаммам не сформирована колонизационная резистентность. Антитоксический иммунитет не препятствует колонизации. Носительство *C. diphtheriae* в коллективах охватывает 10-20% детей, в очагах дифтерии бактерионосители составляют иногда более 70% от числа обследованных.

Биологические свойства возбудителя. *C. diphtheriae* – прямые или слегка изогнутые тонкие грамположительные неподвижные, неспорообразующие, полиморфные палочки. Клеточная стенка бактерий рода *Corynebacterium* имеет сложное строение: содержит пептидогликан, миколовые кислоты, арабиногалактан, димиколат трегалозы (корд-фактор), липидоманнан и липоарабиноманнан (CdiLAM). Верхний наружный слой клеточной стенки включает в свой состав нефимбриальный поверхностный белок 67-72р (или DIP0733), поверхностный белок DIP1281, пили, свободные полисахариды и гликолипиды. Оболочка пронизана белками-поридами. Имеют заостренные или булавовидные концы, внутри которых расположены зёрна «воллютина», (метахроминовые гранулы полиметафосфата). Зёрна воллютина выявляют путём окраски препаратов щелочным метиленовым синим по Леффлеру. Гранулы полиметафосфата воспринимают краситель интенсивнее, чем цитоплазма клетки, обуславливая метахромию. Зёрна воллютина обнаруживают и при использовании окраски по Нейссеру, и люминесцентной микроскопии. В мазках бактерии располагаются под углом, напоминая латинские буквы L, X, V, Y или «растопыренные» пальцы рук.

C. diphtheriae и другие представители рода *Corynebacterium* – аэробы, факультативные и облигатные анаэробы, хемогетеротрофы, каталазоположительны. *C. diphtheriae* требовательны к условиям культивирования, хорошо растут при +37° С (рН 7,4-8,0) на питательных средах, обогащённых аминокислотами, пуриновыми и пиримидиновыми основаниями, с добавлением лошадиной или бычьей сыворотки или гемолизированной крови. Для культивирования *C. diphtheriae* используют кровяной (5-10%) агар, сывороточный (10-15%) агар, свернутую сыворотку Леффлера или Ру, селективные среды с добавлением теллурита калия (кровяно-теллуритовый агар (КТА), среды Клауберга II и Тинсдейла-Садыковой, «Коринебакагар»). На плотных питательных средах *C. diphtheriae gravis* растёт преимущественно в R-форме, образуя через 48 час колонии диаметром 1,5-2,0 мм, с радиальной исчерченностью и неровными краями, напоминающие цветок маргаритки. Для *C. diphtheriae mitis* более характерна S-форма колоний (диаметр – 0,5-1,0 мм, с ровными краями, выпуклой гладкой поверхностью). *C. diphtheriae intermedius* образуют мелкие, слегка конусообразные, округлые колонии диаметром 0,5-1,0 мм. Культуральные свойства вида *C. diphtheriae mitis var. belfanti*, как и *C. diphtheriae intermedius*, сходны с биоваром *mitis*. При выделении *C. diphtheriae* из клинического материала для ингибирования роста сопутствующей микрофлоры используют среды, содержащие теллурид калия. Большинство штаммов *C. diphtheriae* резистентны к относительно высоким концентрациям теллурита калия, способны за счёт продукции теллуриредуктазы восста-

навливать теллурид калия до металлического теллура и накапливать его внутри клеток, что придаёт колониям серо-чёрную или чёрную окраску. На жидких питательных средах R-формы *C. diphtheriae* (биотип *gravis*) растут, образуя плёнку на поверхности или крошкообразный осадок, S-формы (биотип *mitis*) дают равномерное помутнение и мелкозернистый осадок.

Ферментативная активность невысокая. Ключевой дифференциально-диагностический признак – наличие фермента цистиназы, который выявляют на питательной среде Пизу (сывороточный агар, содержащий цистин и укусно-кислый свинец). *C. diphtheriae* не обладают уреазной активностью, окисляют глюкозу и мальтозу, не разлагают сахарозу. Способность разлагать крахмал присуща только биотипу *gravis*. Тест на редукцию нитратов положителен для всех биотипов *C. diphtheriae*, за исключением *C. diphtheriae mitis var. belfanti*. Подвид *C. diphtheriae subsp. lausannense* обладает способностью сбрасывать N-ацетилглюкозамин, в отличие *C. diphtheriae subsp. diphtheriae*.

Факторы патогенности. Основным фактором патогенности – дифтерийный токсин (ДТ), последовательность которого кодируется геном *tox*. Структурный ген *tox* переносится коринефагом при лизогенной интеграции генома β-профага в хромосому *C. diphtheriae* и других близкородственных видов, обладающих функциональным *dtxR*-геном (*Corynebacterium spp.* и нетоксигенные штаммы *C. diphtheriae*), в результате чего они становятся токсигенными. Вирулентные штаммы могут нести в геноме две или три копии гена *tox*. Существуют разные, функционально эквивалентные сайты прикрепления (*attB*) для интеграции β-профага в хромосому *C. diphtheriae*. Каждый *attB*-сайт расположен в гене *Arg-tRNA₂*, который локализуется в двух разных участках хромосом. Регуляция токсинопродукции осуществляется металлорегуляторным белком *DtxR* – продуктом хромосомного гена *dtxR* – и зависит от экспрессии гена *tox* и метаболизма Fe²⁺.

Законсервированная *dtxR*-связывающая последовательность расположена рядом с промоторами гена *tox* и генов сидерофоров. Сидерофоры солибилизируют и связывают Fe²⁺, транспортируют его в клетку бактерий через специфические мембранные рецепторы. Функциональная активность *DtxR* контролируется железом, Ni²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, Cd²⁺, Zn²⁺. *DtxR* блокируется при низком содержании Fe²⁺ в среде, что ведёт к увеличению продукции токсина. Ответом на дефицит Fe²⁺ в среде является адгезия, колонизация, образование биоплёнки *C. diphtheriae*. *DtxR* может блокировать индуцированный Fe²⁺ эффект Фентона (генерация активных форм кислорода, токсичных для бактерий), защищая бактериальную ДНК от окислительного повреждения. Ген *dtxR* присутствует у токсигенных и нетоксигенных штаммов, и, помимо регуляции токсинопродукции, обуславливает посредством *DtxR* синтез сидерофоров, функционирование высоко аффинной транспортной системы (*ciuABCDEF*) и транскрипцию трёх локусов, вовлечённых в работу геммооксигеназы (*hmuO*).

Tox-ген *C. ulcerans* не идентичен таковому у *C. diphtheriae* вследствие большой неоднородности генетической последовательности, в отличие от высоко консервативного генома *C. diphtheriae*. Обнаружено сходство в последовательностях геномов *C. ulcerans* и *C. pseudotuberculosis* и их чёткое отличие от генома *C. diphtheriae*.

ДТ – экзотоксин, секретируемый через цитоплазматическую мембрану без лизиса клеток. Зрелый внеклеточный ДТ – полипептид массой 58 кДа, содержащий 535 аминокислотных остатков. Молекула ДТ состоит из А- и В-фрагментов (м.м. 24 и 28 кДа), соединенных двумя дисульфидными мостиками. А-фрагмент обладает ферментативной активностью. В-фрагмент обуславливает связывание молекулы ДТ с фосфолипидами мембран клеток. Основная масса ДТ фиксируется клетками, имеющими соответствующие рецепторы: клетки человека, обезьян, кроликов, морских свинок. Динамика процессов связывания ДТ с рецепторами клеток протекает в две стадии. Первая – обратимая, длительностью около 30 мин., состоит в создании непрочной связи ДТ с рецепторами клеток. При этом клетка полностью сохраняет жизнеспособность, а ДТ, фиксированный на поверхности цитоплазматической мембраны, легко нейтрализуется антитоксическими антителами. Вторая стадия – необратимая – завершается в течение последующих 30-60 мин. В этот период структура и функция клеток ещё не претерпевают каких-либо изменений, но добавление антитоксической сыворотки уже не предохраняет клетки от цитопатогенного действия ДТ и последующей их гибели. Трансмембранный транспорт ДТ в клетки происходит адсорбционным эндоцитозом. В-фрагмент взаимодействует с прогепарин-связывающим эпидермальным фактором роста, подобным фактору роста HB-EGF. В результате формируются трансмембранные каналы, по которым А-фрагмент перемещается в цитозоль. Механизм действия А-фрагмента ДТ основан на АДФ-рибозилировании фактора элонгации 2, ведущего к нарушению синтеза белка в клетке и её гибели. Антитоксические антитела, секретируемые в ответ на введение ДТ, функционально неоднородны и могут быть направлены как против А-, так и против В-фрагмента ДТ. Основным механизмом детоксикации является взаимодействие ДТ с антитоксинами, направленными против детерминант В-фрагмента, что препятствует присоединению ДТ к мембранам клеток. Антитоксические антитела нейтрализуют ДТ на поверхности клеток. В крови ДТ циркулирует в свободном состоянии или в составе циркулирующих иммунных комплексов. При тяжёлых формах дифтерии ДТ фиксируется в тканях и органах-мишенях, в кровь выходит небольшое количество ДТ. ДТ оказывает раздражающее воздействие на рецепторы слизистых оболочек и внутренних органов и цитопатогенное – на клетки миокарда, почек, надпочечников, нервной ткани, режее лёгких, печени, пищевода, желудка, кишечника, поджелудочной железы. Развитие постдифтерийных осложнений (кардиомиопатия, нейропатия) имеет аутоиммунную природу, которая обусловлена общностью антигенных детерминант В-субъединицы ДТ и экстрацеллюлярного домена рецептора HB-EGF.

C. diphtheriae обладает факторами патогенности, обеспечивающими способность к адгезии и колонизации: пили, липоарабиноманнан клеточной стенки (CdiLAM), нефимбриальный поверхностный белок 67-72p (или DIP0733), поверхностный белок DIP1281, миколовые кислоты, корд-фактор, ферменты (гиалуронидаза, нейраминидаза, амилаза, протеаза).

Пили представлены в геноме типового штамма *C. diphtheriae* NCTC13129 (эпидемический клон *Ros-sija/Sankt-Peterburg*) тремя генетическими кластерами: *spaABC*, *spaDEF*, *spaHGI*. Каждый кластер кодирует синтез фимбрий соответствующих типов, представ-

ленных основными белками SpaA, SpaD, SpaH, которые формируют ось фимбрий. Пили содержат и малые субъединицы: SpaB, SpaC, SpaE, SpaF, SpaG, SpaI. SpaB равномерно распределяется вдоль стержня пили, SpaC, SpaF, SpaG располагаются на его конце. Штаммы *C. diphtheriae* имеют различные типы пилей, между которыми существуют антигенные различия. Кластеры генов, кодирующих каждый тип фимбрий, содержат гены сортаз (англ. srt – surface protein sorting), специфически катализирующих ковалентное связывание фимбриальных протеинов между собой, а основание фимбрий – с клеточной стенкой бактерий. Это происходит с участием специфического сайта с аминокислотной последовательностью LPxTG (где «x» обозначает любую аминокислоту).

SpaA-тип пилей *C. diphtheriae* кодируется кластером генов *spaA-srtA-spaB-spaC*. Осевая часть пили SpaA-типа представлена большой SpaA-субъединицей, на боковой поверхности которой располагается малая субъединица SpaB, на кончике пили – SpaC. Подобным образом устроены SpaD- и SpaH-пилы. Большие субъединицы являются структурными компонентами пилей, малые – функциональными, играющими ключевую роль в адгезии. Каждый тип пилей вступает во взаимодействие с определёнными рецепторами на клетках хозяина: пили SpaA-типа взаимодействуют с фарингеальными эпителиальными клетками, SpaD, SpaH – эпителиоцитами гортани и бронхов. Штаммы, не имеющие пилей, могут прикрепляться к клеткам хозяина за счёт компонентов клеточной стенки (CdiLAM, белок 67-72p (или DIP0733), DIP1281).

Липоарабиноманнан клеточной стенки (CdiLAM) расположен на поверхности клеточной оболочки, способствует связыванию с эпителиальными клетками хозяина и, взаимодействуя с TLR₂, активирует дендритные клетки и Т-хелперы. CdiLAM не связывается с эритроцитами человека, но взаимодействует с клетками карциномы фарингеального эпителия Hep-2. CdiLAM рассматривается как адгезин и потенциальный фактор вирулентности *C. diphtheriae*.

Нефимбриальный поверхностный белок 67-72p (или DIP0733) распознаёт и специфически связывается с рецепторами эпителиальных клеток человека, способствует внутриклеточной инвазии *C. diphtheriae*, обуславливает цитопатическое действие и апоптоз, взаимодействует с эритроцитами человека, вызывая их агглютинацию.

Поверхностный белок DIP1281 ассоциирован с адгезией и инвазией, встречается у патогенных и непатогенных коринебактерий, в частности, *C. diphtheriae*, *C. efficiens*, *C. glutamicum*, *C. jeikeium*.

При дифтерийной инфекции зарегистрированы случаи прижизненной бактериемии, выделения токсигенного возбудителя из крови и органов умерших. Нетоксигенные штаммы *C. diphtheriae* и *Corynebacterium spp.* способны вызывать эндокардит, остеомиелит, абсцесс селезёнки, септический артрит и др. Эти системные инфекции предполагают адгезию коринебактерий на эпителиальных клетках, инвазию в более глубокие ткани и персистенцию в них. Это является свидетельством способности коринебактерий к инвазии, которая обусловлена поверхностными структурами бактериальной клетки и, в частности, белками DIP1281 и 67-72p (или DIP0733).

Миколовые кислоты, являясь физиологическим барьером проницаемости коринебактерий, участвуют в процессах адгезии, активируют врождённый иммуните-

тет, способствуя экспрессии TLR, ингибируют функцию макрофагов.

Корд-фактор обладает способностью нарушать процессы дыхания и фосфорилирования клеток хозяина, обуславливая устойчивость к фагоцитозу.

Гиалуронидаза расщепляет гиалуроновую кислоту соединительной ткани, что ведёт к повышению проницаемости кровеносных сосудов, выходу плазмы за их пределы, отёку тканей.

Нейраминидаза модифицирует клеточную поверхность, приводя к разжижению поверхностной слизи эпителия, и подготавливает рецепторы эпителиоцитов к прикреплению ДТ.

Амилаза, кодируемая *amy*-геном, утилизирует углеводы и создает дополнительный источник энергии для ускорения колонизации *C. diphtheriae* на слизистых оболочках человека и роста на питательных средах. Амилазная активность характерна только для *C. diphtheriae* биотипа *gravis*.

Протеаза инактивирует sIgA, в частности, его изотип sIgA₁.

Патогенез. Начальный этап инфекционного процесса – адгезия – обусловлен электростатической силой клеток, гидрофобностью клеточной оболочки *C. diphtheriae*, высокоспецифичным лиганд-рецепторным взаимодействием с клетками хозяина. Адгезия *C. diphtheriae* осуществляется посредством минорных пилинов SpaA-типа за счёт тесного взаимодействия концов пилей с рецепторами эпителиоцитов хозяина, затем – боковых субъединиц от верхушки до основания пилей по типу замка «молнии». Затем во взаимодействие вступают малые субъединицы, расположенные на клеточной стенке коринебактерий. Такая плотная адгезия позволяет предотвратить диссоциацию бактерий, усиливая их взаимодействие с клетками хозяина и колонизацию.

Процесс адгезии *C. diphtheriae* облегчается действием фермента нейраминидазы (сиалидазы), разрушающей сиаловые кислоты на поверхности клетки хозяина. Это позволяет освободить поверхность клеток от слизи и интенсифицировать межклеточное взаимодействие. Колонизация слизистой оболочки *C. diphtheriae* осуществляется с участием фермента каталазы, разлагающей перекиси, продуцируемые представителями нормальной микрофлоры, что создает селективные преимущества *C. diphtheriae* перед индигенной микрофлорой хозяина в месте внедрения. Корд-фактор, ДТ, протеаза, каталаза подавляют местный иммунитет, разрушая sIgA (в том числе изотип sIgA₁) и угнетая фагоцитоз. Разжижение слизи на эпителии верхних дыхательных путей, нарушение функции реснитчатого эпителия происходит под воздействием ДТ, нейраминидазы, гиалуронидазы.

ДТ, связываясь с комплементарным рецептором, проникает внутрь клетки хозяина и парализует её жизнедеятельность посредством ингибирования синтеза белка. Клетка некротизируется, формируя безопасное убежище для адгезированной *C. diphtheriae*, где она может размножаться, колонизируя другие клетки хозяина. Токсигенные и нетоксигенные штаммы *C. diphtheriae*, попадая в фагоцитирующие клетки, индуцируют их апоптоз и некроз, что может быть обусловлено действием ДТ, поверхностных структур коринебактерий, ферментов агрессии. Колонизация сопровождается формированием биоплёнки, что наиболее интенсивно происходит в условиях развития инфекции при дефиците железа.

Дальнейшее развитие инфекционного процесса может быть различным. Развитие классической клинической картины дифтерии чаще наблюдается у лиц с отсутствием антитоксического иммунитета. В месте внедрения *C. diphtheriae* наблюдают массивное размножение, сопровождающееся увеличением продукции ДТ и развитием некроза слизистой оболочки. Токсинемия является главным фактором, формирующим клиническую картину заболевания и определяющим его характер и исход. Помимо поражения слизистой оболочки верхних дыхательных путей и токсинемии формируются и системные осложнения – миокардит, нефрозо-нефрит, пневмония, поражения нервной ткани, кишечника и др. Это указывает на то, что *C. diphtheriae* способна колонизировать эпителий, а ДТ – проникать в более глубокие ткани, взаимодействуя с различными типами клеток организма.

Формирование бактерионосительства токсигенных штаммов *C. diphtheriae* происходит, как правило, у лиц на фоне высокого уровня антитоксических антител и неполноценного антибактериального иммунитета. Бактерионосительство развивается за счёт факторов адгезии, инвазии, колонизации, имеющих у токсигенных и нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae*, а также способности к биоплёнкообразованию. ДТ, продуцируемый *C. diphtheriae*, поступает в лимфатическую систему и кровотока. При наличии антитоксинов у инфицированных лиц, как правило, не возникает ни местных, ни общих проявлений действия токсина и инфекционный процесс ограничивается бессимптомной колонизацией, т. е. носительством.

Клиника. Типичная форма дифтерии сопровождается явлениями выраженной интоксикации и фибринозным воспалением слизистой оболочки и/или кожи в области входных ворот, при генерализации – выходом процесса за пределы первичного очага, триадой специфических острых поражений органов-мишеней: сердца (дифтерийные мио- и перикардиты), нервной системы (дифтерийная полинейропатия), почек (дифтерийная нефропатия). Характерно образование плёнок – фибринозных наложений беловато-серого цвета с чёткой границей краёв наложений, возвышающихся над эпителием первичного очага, при локализации в дыхательных путях – с возможной их обструкцией.

В соответствии с МКБ 10 (с дополнениями 2019 г.) под кодом «А 36.» выделяют: дифтерию глотки (дифтерийная мембранозная ангина, тонзиллярная дифтерия) – часто встречаемая форма дифтерии (90-95% случаев), гортани (по частоте регистрации занимает второе место), носоглотки, кожи, другие формы дифтерии (конъюнктивы, носа, половых органов, комбинированная, дифтерийный миокардит, полиневрит) и неуточнённую дифтерию.

В 2016 г. предложена новая Российская классификация дифтерии. По клиническому варианту (локализация дифтерийных плёнок) выделяют дифтерию миндалин/ротоглотки – при распространении с миндалин на язычок, мягкое и твёрдое нёбо и слизистую оболочку полости носа/носоглотки; гортани/гортаноглотки; трахеи и бронхов; полости рта; дифтерию глаза, ушей, кожи; дифтерию половых органов и комбинации разных локализаций. Выделяют локализованную форму дифтерии и генерализованную (распространение возбудителя за пределы первичного очага, наличие специфического дифтерийного отёка подкожной клетчатки и окружающих тканей в области первичного очага инфицирования,

возможен волнообразный характер поражения органов-мишеней за счёт выхода депонированного ДТ из лимфоузлов). При формулировке диагноза указывается форма заболевания (по тяжести течения) и острое дифтерийное поражение внутренних органов (при наличии): сердца, нервной системы, почек и других органов.

Частыми осложнениями дифтерии, сопровождающейся острыми поражениями внутренних органов, является развитие инфекционно-токсического шока, отёка головного мозга, острой дыхательной, сердечной, почечной недостаточности, ДВС-синдрома, реже – пневмонии, поражения кишечника, печени. Они являются ранними предикторами неблагоприятного тяжёлого течения инфекции. Частота возникновения, характер, тяжесть течения осложнений коррелируют с выраженностью клинических проявлений и сроками начала введения противодифтерийной сыворотки.

Первичное бактерионосительство *C. diphtheriae* является бессимптомной формой инфекционного процесса. Оно может быть транзиторным (однократное обнаружение возбудителя), кратковременным (выделение в течение 2-х нед), средней продолжительности (до 1 мес), затяжным (1-6 мес), хроническим (более 6 мес). Продолжительное носительство часто выявляется у детей с патологией ЛОР-органов (хронический тонзиллит, аденоидит, синусит), у часто болеющих детей, при дисбиозе слизистой оболочки ротоглотки и носа.

Лечение. Лечение больных дифтерией проводится в специализированном инфекционном боксированном стационаре. Используются этиотропные, патогенетические, симптоматические средства. Основополагающим в терапии всех клинических форм является применение антитоксической противодифтерийной сыворотки (ПДС), которая должна вводиться немедленно после постановки диагноза. Использование ПДС в поздние сроки заболевания не гарантирует защиту от осложнений, при гипертоксической форме – не предупреждает летального исхода. При локализованных формах дифтерии ротоглотки введение ПДС в поздние сроки (после 4-го дня) заболевания нецелесообразно, так как существенно не влияет на клиническую симптоматику. Исключение составляют больные, у которых к моменту госпитализации сохраняются налёты на миндалинах. При тяжёлых токсических формах дифтерии ПДС вводится независимо от сроков госпитализации. Первичная и курсовая дозы ПДС определяются клинической формой дифтерии.

Антибактериальная терапия при локализованных формах дифтерии проводится с использованием макролидов (азитромицин, кларитромицин, рокситромицин и др.) и защищённых аминопенициллинов (доксциклин, юнидокс, рифампицин). При токсических формах дифтерии препаратами выбора являются цефалоспорины 3-го поколения (цефотаксим, цефтриаксон, цефиксим и др.), аминопенициллины (амоксциллин и его защищённые формы), рифампицин.

В комплекс лечения входит детоксикационная терапия, которая проводится энтерально и путём внутривенного введения глюкозо-солевых растворов. В лечении токсических форм дифтерии ротоглотки перспективно применение экстракорпоральных методов детоксикации (гемосорбция, плазмаферез) с использованием специфических иммуносорбентов. Применение кортикостероидов, антиоксидантов, кардиотропных средств патогенетически обосновано при тяжёлых формах дифтерии, развитии тяжёлых осложнений.

Санация носителей токсигенных штаммов *C. diphtheriae* проводится с помощью макролидов, рифампицина, тетрациклинов (доксциклин, юнидокс). При длительном бактериовыделении рекомендуется 2-3 курса антибактериальной терапии. Используют гипосенсибилизирующие препараты (цетиризин, лоратадин и др.), поливитамины (группы В, С, А, Е, микроэлементы), адаптогены (элеутерококк, лимонник), средства, повышающие резистентность слизистой оболочки ротоглотки (лизобакт, ИРС-19, рибомунил, тонзилотрен).

Лабораторная диагностика. Лабораторная диагностика включает бактериологический, биологический, иммунохимический (РПГА, ИФА), молекулярно-биологический (ПЦР, риботипирование, энзимотипирование, секвенирование ДНК) методы. При постановке диагноза «дифтерия» помимо данных лабораторного исследования необходимо учитывать клиническую картину заболевания и данные эпидемиологического анамнеза.

Бактериологический метод является основным. Другие методы исследования имеют вспомогательное значение. Бактериологическое исследование направлено на выделение и идентификацию *C. diphtheriae* по токсигенным и биохимическим свойствам в короткие сроки (3-4 дня) с помощью минимального количества диагностических тестов.

Обследование проводят с диагностической или профилактической целью, по эпидемическим показаниям. Диагностическому обследованию на дифтерию подлежат все больные с ангинами, хроническим тонзиллитом, паратонзиллярным и заглоточными абсцессами. Обследование с профилактической целью проводят при поступлении в лечебно-профилактические учреждения, санатории, закрытые специализированные учреждения, при переводе из одного закрытого специализированного учреждения в другое. По эпидемическим показаниям обследуют всех контактных лиц в очагах дифтерии. Особое внимание следует обращать на выявление скрытых бактерионосителей, которые на фоне высокого уровня антитоксического иммунитета не имеют клинических проявлений дифтерии, но являются источником инфекции для окружающих.

Материал для исследования (слизь, отделяемое и плёнки из зева и носа) отбирают с помощью двух отдельных сухих тампонов с последующим посевом на одну чашку с плотной питательной средой (при необходимости в транспортную среду). При наличии налёта материал берут с границы поражённой и здоровой ткани. При подозрении на экстрабуккальные формы дифтерии проводят забор из очагов поражения (глаз, ухо, кожа, влагалище и др.) одним сухим тампоном, также следует брать материал из зева двумя сухими тампонами. От больных материал должен быть взят в течение 3-4 ч (не позднее 12 ч) с момента поступления в стационар до назначения антибактериальной терапии.

Для выделения *C. diphtheriae* проводят прямой посев материала, взятого сухим ватным тампоном или тампоном после культивирования в транспортной среде, на одну из электро-селективных сред для *C. diphtheriae*. Предпочтение отдается кровяным теллуриновым средам. Через 24 ч инкубации на кровяных теллуриновых средах формируются колонии, окрашенные в чёрный или тёмно-серый цвет. Замедленное формирование подозрительных колоний (через 48 ч) в основном выявляется при исследовании материала, взятого у бактерионосителей. Признаки, характерные для ко-

лоний биоваров *gravis*, *mitis*, *intermedius*, проявляются через 48 часов. Эти колонии исследуют на токсигенные свойства. Необходимо изучать токсигенные свойства нескольких колоний, так как из исследуемого материала могут быть выделены одновременно токсигенные и нетоксигенные клоны *C. diphtheriae*. Для определения токсигенности используют традиционный или модифицированный тест Элека, основанный на методе встречной иммунодиффузии токсина и антитоксина в специальных питательных средах (среда для определения токсина дифтерийного микроба, коринетоксагар). При постановке теста Элека делают посев по ½ каждой из двух изолированных колоний на среду для определения токсигенности и необожжённой петлей – уколом в столбик среды Пизу; другую половину колонии отсевают в пробирку со скошенным 10% сывороточным агаром, из оставшихся нескольких (5-7) колоний формируют бляшки. В случае множественного роста подозрительных колоний проводят определение уреазной активности в пробе Заксе. При обнаружении только одной колонии её засевают на среду для определения токсигенности и, не обжигая петлю, в среду Пизу для определения цистиназной активности. После учёта результатов для дальнейшей идентификации используют культуру со среды Пизу или из бляшки. У выросшей на сывороточном агаре культуры изучают морфологию (окраска по Леффлеру), определяют биохимические свойства (глюкоза, сахароза, мальтоза, крахмал, декстрин), уреазную активность. При необходимости идентифицировать *C. ulcerans* используют тесты на уреазу и восстановление нитратов в нитриты.

Критерием оценки специфичности преципитатов в тесте Элека служит время появления и расположение

линий преципитации испытуемого штамма по отношению к линиям преципитации контрольного токсигенного штамма. Специфические линии преципитации появляются через 24-48 ч, сливаются или направлены на слияние с линиями контрольного штамма. У штаммов *C. diphtheriae* с низким уровнем продукции токсина специфические линии преципитации могут формироваться позже.

Выявление цистиназной активности, способности окислять глюкозу и мальтозу, отношение к крахмалу, декстрину и отсутствие уреазы, наряду с характерными морфо-культуральными признаками (полиморфизм, метакрохроматичное окрашивание, формирование колоний чёрного или серого цвета на кровяных теллуритовых средах) позволяют отнести клинический изолят к одному из биоваров *C. diphtheriae*. Выделенный в результате бактериологического исследования штамм *C. diphtheriae* является возбудителем дифтерии, если он обладает токсигенными свойствами.

Основной метод определения ДТ – иммунодиффузия в агаре по Элеку – высокоспецифичен, но позволяет выявлять ДТ только у 84% и 80,4% штаммов, выделенных от больных и носителей соответственно. Для выявления слабо токсигенных штаммов *C. diphtheriae* возможно использование РНГА и ИФА (см. таблицу).

Эти методы не являются обязательными, но по сравнению с тестом Элека обладают преимуществами по чувствительности и времени проведения анализа. С помощью ИФА возможно выявлять ДТ в бульоне при культивировании патологического материала без этапа выделения чистой культуры. Результаты РНГА и ИФА позволяют дать только предварительный ответ о наличии ДТ.

Таблица 1

Методы определения токсина и *tox*-гена *C. diphtheriae*

| | Метод | Цель | Чувствительность | Длительность | Штаммы |
|---------------------------|--|---|--|-----------------|---|
| Иммунохимический | метод Элека | детекция ДТ | 0,5-1,0 мкг/мл | 24-48 ч | токсигенные |
| | РНГА | детекция и определение уровня продукции ДТ | 0,003 И/мл | несколько часов | токсигенные и слабotoксигенные |
| | ИФА | детекция и количественное определение продукции ДТ | 0,8-1,5 нг/мл | несколько часов | токсигенные и слабotoксигенные |
| | РКоА | детекция ДТ | чувствительный | несколько минут | токсигенные |
| | РЛА | детекция и определение уровня продукции ДТ | 0,001 И/мл | несколько часов | токсигенные и слабotoксигенные |
| Биологический | внутрикожная проба на морских свинках и кроликах | определение ДТ по минимальной некротической дозе DNM | ~ 100000 м.к. | 48-72 ч | токсигенные |
| | внутрибрюшинная проба на морских свинках | определение ДТ по минимальной летальной дозе DLM | 20-60 нг | 48 ч | токсигенные |
| | подкожная проба на морских свинках | детекция ДТ по летальному исходу | высокочувствительный | до 5 дней | токсигенные |
| | цитотоксичный тест на культуре клеток Vero | детекция ДТ | 0,001 мкг | 5-6 дней | токсигенные и слабotoксигенные |
| | ПЦР | детекция <i>tox</i> -гена и <i>dtxR</i> -гена | ≥10 ⁴ м.к. | несколько часов | - токсигенные - нетоксигенные - несущие <i>tox</i> -ген |
| Молекулярно-биологический | секвенирование ДНК | детекция мутации <i>tox</i> -гена и <i>dtxR</i> -гена | Высокочувствительный при наличии мутаций | несколько часов | - токсигенные - нетоксигенные - несущие <i>tox</i> -ген |

Молекулярно-генетические методы применяют для ускоренной диагностики дифтерийной инфекции (ПЦР) и эпидемиологического мониторинга (ПЦР, риботипирование, энзимотипирование, секвенирование ДНК). ПЦР используют для детекции генов *tox* и *dtxR*, кодирующих синтез ДТ. Разработаны различные варианты генодиагностики дифтерийной инфекции (ПЦР в классическом варианте, ПЦР в реальном времени, генодиагностика на основе LAMP, ПЦР в формате мультиплекса). При использовании ПЦР гены, ответственные за продукцию ДТ, обнаруживают в минимально короткие сроки (в течение одного рабочего дня), при этом можно исследовать чистую и *mixt*-культуры. Наличие в анализе микроорганизмов контаминантов не влияет на результаты исследования. Результаты ПЦР подтверждают в тесте Элека. Некоторые штаммы, отрицательные в тесте Элека, могут быть положительны в ПЦР. Это является следствием наличия *dtxR* в геноме как токсигенных, так и нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae*. Учитывая, что не продуцирующие токсин, но несущие *dtxR* штаммы могут явиться причиной серьёзных заболеваний у человека, необходимо расширение подходов к их идентификации с помощью ПЦР-диагностики.

Бактериологическую диагностику дифтерии и инфекций, вызываемых условно-патогенными коринибактериями, можно проводить с использованием тест-систем (ФГУП НПО «Микроген», ООО НПО «Диагностические системы», «apiCoryne» («bioMERIUX»). Перспективным методом является MALDI-ToF масс-спектрометрия, основанная на определении уникального молекулярного состава белков и пептидов микроорганизмов.

Комплексное применение различных методов и современных технологий значительно повышает эффективность лабораторной диагностики дифтерии.

Вакцинопрофилактика. Ведущая роль в создании противодифтерийного иммунитета принадлежит анти-токсину, который вырабатывается в организме в ответ на поступление дифтерийного анатоксина. Впервые дифтерийный анатоксин получил в 1922 г. Г. Рамон. В России в соответствии с Национальным календарем прививок применяют препараты отечественного производства: АКДС, АДС, АДС-М, АД-М. Разрешены к использованию на коммерческой основе зарубежные комбинированные препараты: Тетракокк, Бубо Кок, ДТ-Вакс, ДТ-Адьюльт («AventisPasteur», Франция), АаКДС «Инфанрикс» («SmitKlein», Германия). Перспективным является использование конъюгированных полимер-субъединичных вакцин, создание векторных и субъединичных вакцин. Для профилактики дифтерийного бактерионосительства, справиться с которым существующими средствами вакцинопрофилактики невозможно, перспективной является разработка новых вакцинных препаратов на основе адгезинов *C. diphtheriae*, способных стимулировать действие факторов врождённого и адаптивного иммунитета.

Вопросы для самоконтроля:

1. Роль факторов патогенности *C. diphtheriae* в патогенезе заболевания?
2. Методы лабораторной диагностики дифтерии?
3. Методы определения токсигенности *C. diphtheriae*?

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чагина И.А., Переварова Ю.С., Переваров В.В., Чаплин А.В., Борисова О.Ю., Кафарская Л.И., Афанасьев С.С., Алешкин В.А. Полиморфизм гена *dtxR* у современных штаммов *Corynebacterium diphtheriae*. *Вестник РГМУ*. 2017; (1): 34-41.
2. МУК 4.2.3065-13. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции: методические указания (утв. Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом РФ Г.Г.Онищенко 14.07.2013 г.). М.; 2013.
3. Борисова О.Ю., Пименова А.С., Чаплин А.В., Кафарская Л.И., Афанасьев С.С., Алешкин В.А., Алешкин А.В., Афанасьев М.С., Караулов А.В. Ускоренный способ генодиагностики дифтерии на основе изотермальной амплификации для выявления ДНК возбудителя. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2017; (5): 24-32.
4. Sharma N.C., Efstratiou A., Mokrousov I., Mutreja A., Das B., Ramamurthy T. Diphtheria. *Nat. Rev. Dis. Primers*. 2019; 5(1): 81.
5. Oliveira A., Oliveira L.C., Aburjalle F., Benevides L., Tiwari S., Jamal S. B., Silva A. Insight of Genus *Corynebacterium*: Ascertain- ing the Role of Pathogenic and Non-pathogenic Species. *Frontiers in Microbiology*. 2017; (8): Article 1937.
6. Ott L. Adhesion properties of toxigenic *Corynebacteria*. *AIMS Microbiol.* 2018; 4 (1): 85-103.

REFERENCES

1. Chagina I.A., Perevarova Yu.S., Perevarov V.V., Chaplin A.V., Borisova O.Yu., Kafarskaya L.I., Afanasiev S.S., Aleshkin V.A. DtxR gene Polymorphism in modern strains of *Corynebacterium diphtheriae*. *Vestnik RGMU*. 2017; (1): 34-41. (in Russian)
2. MUC 4.2.3065-13. Control method. Biological and microbiological factors. Laboratory diagnostics of diphtheria infection: guidelines (approved by the Federal service for supervision of consumer rights protection and human welfare, Chief state sanitary doctor of the Russian Federation G. G. Onishchenko 14.07.2013). Moscow; 2013. (in Russian)
3. Borisova O.Yu., Pimenova A.S., Chaplin A.V., Kafarskaya L.I., Afanasiev S.S., Aleshkin V.A., Aleshkin A.V., Afanasiev M.S., Karaulov A.V. Accelerated method of diphtheria genodiagnosics based on isothermal amplification for detecting the pathogen's DNA. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2017; (5): 24-32. (in Russian)
4. Sharma N.C., Efstratiou A., Mokrousov I., Mutreja A., Das B., Ramamurthy T. Diphtheria. *Nat. Rev. Dis. Primers*. 2019; 5(1): 81.
5. Oliveira A., Oliveira L.C., Aburjalle F., Benevides L., Tiwari S., Jamal S. B., Silva A. Insight of Genus *Corynebacterium*: Ascertain- ing the Role of Pathogenic and Non-pathogenic Species. *Frontiers in Microbiology*. 2017; (8): Article 1937.
6. Ott L. Adhesion properties of toxigenic corynebacteria. *AIMS Microbiol.* 2018; 4(1):85-103.

Поступила 18.06.20

Принята к печати 18.07.20

МИКРОБИОЛОГИЯ

© МАКАРОВА М.А., КАФТЫРЕВА Л.А., 2020

Макарова М.А.^{1,2}, Кафтырева Л.А.^{1,2}

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ШТАММОВ ЭНТЕРОАГГРЕГАТИВНЫХ *ESCHERICHIA COLI*

¹ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера Роспотребнадзора, 197101, Санкт-Петербург, Россия;
²ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава РФ, 191015, Санкт-Петербург, Россия

Изучены 74 штамма *E. coli*, выделенных из проб испражнений (60) и мочи (14) пациентов, обследованных по клиническим показаниям. Молекулярные методы включали: ПЦР с электрофоретической детекцией генов, ассоциированных с диареегенными *E. coli* патогруппы EAgEC (*aggR*, *aaf*, *aap*, *aatA*, *pet*, *ast*, *aai*) и ExPEC патогруппы UPEC (*pap*, *sfa*, *afa*, *kpsMT II*, *iutA*, *hlyA*, *cnf*), MLST типирование, полногеномное секвенирование. Штаммы, выделенные из проб испражнений, значимо чаще (88,3%, $p < 0,05$) относились к типичным EAgEC^{aggR+} по сравнению с атипичными EAgEC^{aggR-}. В штаммах, выделенных из проб мочи, значимые различия между типичными и атипичными EAgEC не выявлены ($p > 0,05$). Гены, ассоциированные с ExPEC, присутствовали во всех штаммах, выделенных из проб мочи и в 45 штаммах (75%), выделенных из проб испражнений. Копроизоляты принадлежали к 10 серогруппам и 13 сероварам: O3:H2, O11:H10, O16:H48, O51:H30, O55:H21, O73:H18, O73:H33, O86:H2, O86:H10, O92:H33, O140:H2, O159:H10. Два штамма имели уникальные нуклеотидные последовательности генов, кодирующих O-антигены, которые отсутствовали в базе данных SerotypeFinder. 80% популяции российских EAgEC, выделенных из испражнений и мочи, характеризовались энтероаггративным/уропатогенным генотипом (EAgEC/UPEC). Большая часть штаммов, выделенных из мочи, относились к вирулентному клону высокого риска эпидемического распространения ST 38, ассоциированному с гибридными штаммами UPEC / EAgEC.

Ключевые слова: *E. coli*; EAgEC; UPEC; гены вирулентности; гетеропатогенность.

Для цитирования: Макарова М.А., Кафтырева Л.А. Генетическое разнообразие штаммов энтероаггративных *Escherichia coli*. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (11): 707-711.
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-11-707-711>

Makarova M.A.^{1,2}, Kaftyreva L.A.^{1,2}

GENETIC DIVERSITY OF ENTEROAGGREGATIVE *ESCHERICHIA COLI*

¹Saint-Petersburg Pasteur Institute, 197101, Saint-Petersburg, Russia;

²North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, the medical microbiology department, 191015, Saint-Petersburg, Russia

Studied 74 *E. coli* strains isolated from stool samples (60) and urine samples (14) of patients examined for clinical indications. Molecular methods included: PCR with electrophoretic detection of genes associated with diarrheal *E. coli* pathogroup EAgEC (*aggR*, *aaf*, *aap*, *aatA*, *pet*, *ast*, *aai*) and ExPEC pathogroup UPEC (*pap*, *sfa*, *afa*, *kpsMT II*, *iutA*, *hlyA*, *cnf*), MLST typing, whole genome sequencing. Strains isolated from stool samples were significantly more likely (88.3%, $p > 0.05$) to be typical EAgEC^{aggR+} compared to atypical EAgEC^{aggR-}. Strains isolated from urine samples, significant differences between typical and atypical EAgEC were not detected ($p > 0.05$). Genes associated with ExPEC were present in all strains isolated from urine samples and in 45 strains (75%) isolated from stool samples. Coproisolates belonged to 10 serogroups and 13 serovars: O3:H2, O11:H10, O16:H48, O51:H30, O55:H21, O73:H18, O73:H33, O86:H2, O86:H10, O92:H33, O140:H2, O159:H10. Two strains had unique nucleotide sequences of genes encoding O-antigens that were missing from the SerotypeFinder database. 80% of EAgEC isolated from feces and urine was characterized by an enteroaggregative/uropathogenic genotype (EAgEC/UPEC). Most of the strains isolated from urine belonged to the virulent clone of high-risk epidemic spread ST 38 associated with hybrid strains of UPEC / EAgEC.

Key words: *E. coli*; EAgEC; UPEC; virulence genes; heteropathogenicity.

For citation: Makarova M.A., Kaftyreva L.A. Genetic diversity of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65(11): 707-711 (in Russ.).
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-11-707-711>

For correspondence: Kaftyreva L.A., PhD, chief of laboratory enteric infections; e-mail: kaffidia@mail.ru

Information about authors:

Makarova Mariia A., <https://orcid.org/0000-0002-7589-0234>

Kaftyreva Lidiya A., <https://orcid.org/0000-0003-0989-1404>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received 04.10.2020
Accepted 27.10.2020

Введение. Энтероаггративные *Escherichia coli* (EAgEC) представляют новую патогруппу возбудителей острых кишечных инфекций (ОКИ), поражающей детей и взрослых во всех странах. В США показатели заболеваемости, обусловленные EAgEC у детей раннего возраста выше, чем при кампилобактериозах и сальмонеллезах [1]. Исследования, проведенные в странах Северной и Южной Америки, Персидского залива, Азии, Африки, Восточной Европы и России показали, что EAgEC чаще, чем другие бактериальные патогены являются причиной диарей у детей [2 – 7]. Проспективные эпидемиологические исследования выявили статистически значимую связь EAgEC с диарейми: острыми, продолжительными, хроническими, ВИЧ-инфицированных и путешественников [8, 9]. Симптомы заболеваний включают водянистую диарею часто с патологическими примесями (слизь и кровь), тенезмы, тошноту, рвоту, субфебрильную температуру. Острая диарея, которая может купироваться быстро, без назначения лечебных препаратов, является обычной патологией. У некоторых пациентов в зависимости от иммунного статуса, и генетической предрасположенности может развиваться затяжная (упорная) диарея продолжительностью более 14 дней [1, 10, 11].

EAgEC впервые были описаны в 1987 г. при изучении адгезивных свойств штаммов *E. coli*, выделенных от чилийских детей [12]. Штаммы характеризовались специфическим феноменом агрегационной адгезии (АА) к эпителиальным клеткам HEp-2 в виде «сложенной кирпичной кладки». Обнаружение феномена АА *in vitro* является золотым стандартом детекции штаммов этой патогруппы, однако, этот метод требует условий для работы с культурой клеток, поэтому его использование ограничивается исследовательскими и референтными лабораториями; феномен АА может встречаться у штаммов других патогрупп диареогенных *E. coli* (DEC), таких как атипичные – энтеропатогенные *E. coli* (ЕРЕС).

Результатом активного и постоянного внутривидового обмена генетической информацией является естественное появление штаммов, обладающих наборами факторов вирулентности, характерных для конкретных патогрупп и патотипов *E. coli*. Ярким примером является гибридная группа энтероаггративных *E. coli*, продуцирующих шигаподобный токсин (ST) – EAgEC /STEC, вызвавшая крупную вспышку эшерихиоза (возбудитель *E. coli* O104:H4) в Германии в 2011 г [1,13]. В последние годы появились данные о EAgEC как возбудителях инфекций внекишечной локализации (ЕхРЕС): мочевыводящих путей (ИМП), уросепсиса и менингита новорожденных [1,14, 15].

Цель исследования – определить этиологическую значимость штаммов энтероаггративных *E. coli*, как возбудителей диарейных и внекишечных заболеваний, с позиций современных критериев оценки патогенного потенциала.

Материал и методы. Изучены 74 штамма *E. coli*, выделенные из проб испражнений (60) и проб мочи (14) госпитализированных пациентов с ОКИ и ИМП. Молекулярные методы включали ПЦР с электрофоретической детекцией генов, ассоциированных с DEC патогруппы EAgEC (*aggR*, *aaf*, *aap*, *aatA*, *pet*, *ast*, *aai*) и ЕхРЕС патогруппы уропатогенных *E. coli* – UPEC (*pap*, *sfa*, *afa*, *kpsMT II*, *iutA*, *hlyA*, *cnf*). Синтез ПЦР-праймеров выполнен ЗАО «Евроген», Россия. Мультилокусное секвенирование типирование (MLST) штаммов, выделен-

ных из проб мочи, проводили в соответствии с международными стандартами базы данных MLST University of Warwick (MarkAchtmanDatabase, <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli/>). Полногеномное секвенирование 24 штаммов, выделенных из проб испражнений выполняли на платформе MiSeq (Illumina). Поиск генетических детерминант, характеризующих O- и H- антигены проводили с использованием онлайн сервиса SerotypeFinder 1.1 веб сайта Центра геномной эпидемиологии (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/>). Статистическую обработку результатов проводили с использованием оценки различий средних величин (точный критерий Фишера). Статистически значимыми считали различия при доверительном интервале 95% ($p < 0,05$).

Результаты. Все штаммы EAgEC типично росли на питательных средах, независимо от биологического материала, из которого они были выделены. Ферментировали глюкозу, маннит, мальтозу, рамнозу, сорбит, были положительными в тесте с β-галактозидазой, декарбоксилировали лизин и не декарбоксилировали аргинин. Практически все штаммы были подвижные (91,9%), к биохимически активному варианту *E. coli* относились (95,9%). Идентифицировать O – антиген в реакции агглютинации с отечественными ОК- сыворотками установить не удалось.

Детекция генов, ассоциированных с факторами вирулентности DEC патогруппы EAgEC: *aggR* – активатор транскрипции, необходимый для экспрессии фимбрий, *aaf* – агрегативно-адгезивные фимбрии, *aap* – секреторный белок дисперзин, *aatA* – эфлюксный белок, *pet* – плазмидокодируемый термолабильный токсин, *ast* – термолабильный токсин EAgEC (EAST), *aai* – активатор системы секреции IV типа. Штаммы патогруппы EAgEC по наличию/отсутствию гена *aggR* делятся на типичные t-EAgEC^{*aggR*+} (содержат ген *aggR*) и атипичные a – EAgEC^{*aggR*-} (ген *aggR* отсутствует) [1]. Результаты изучения генов вирулентности штаммов EAgEC представлены в таблице 1.

К t-EAgEC^{*aggR*+} (содержали ген *aggR*) значимо чаще 53 (88,3%, $p < 0,05$), относились штаммы, выделенные из проб испражнений пациентов с диарейным синдромом по сравнению с a – EAgEC^{*aggR*-} (ген *aggR* отсутствует). В штаммах, выделенных из проб мочи, значимые различия между t-EAgEC^{*aggR*+} и a – EAgEC^{*aggR*-} не выявлены ($p > 0,05$).

Гены *aaf*, *aap*, *ast*, кодирующие агрегативно-адгезивные фимбрии, секреторный белок дисперзин и термолабильный токсин EAgEC (EAST), без значимых различий присутствовали в штаммах, выделенных из проб испражнений и мочи ($p > 0,05$). Гены *aatA* и *aai*, кодирующие эфлюксный белок и активатор системы секреции IV типа, были выявлены только в штаммах EAgEC, выделенных из проб испражнений, их находки составляли 48,3 и 13,3% соответственно. Ген *pet*, ответственный за продукцию термолабильного токсина, обнаружен не был.

Детекция генов, ассоциированных с факторами вирулентности ЕхРЕС (UPEC): *pap* (структурная субъединица пиелонефрит-ассоциированных пилей), *sfa* (S-фимбрии), *afa* (афимбриальные адгезины), *kpsMT II* (синтез капсульных антигенов K1, K5 и K12), *iutA* (рецептор аэробактерина), *hlyA* (α-гемолизин) и *cnf* (цитонекротический фактор) [16,17].

Гены, ассоциированные с ЕхРЕС, присутствовали во всех штаммах, выделенных из проб мочи и в 45

Молекулярно-генетическая характеристика штаммов EAgEC

| Гены вирулентности | Выделенные из | | | | | | Всего EAgEC (n=74) | | |
|--------------------|--------------------|------|-----------|-------------|------|-----------|--------------------|------|-----------|
| | испражнений (n=60) | | | мочи (n=14) | | | абс | % | 95%ДИ |
| | абс | % | 95% ДИ | абс | % | 95%ДИ | | | |
| EAgEC | | | | | | | | | |
| <i>aggR</i> | 53 | 88,3 | 77,4-95,2 | 9 | 64,3 | 35,1-87,2 | 62 | 83,8 | 73,4-91,3 |
| <i>aaf</i> | 52 | 86,7 | 75,4-94,1 | 8 | 57,1 | 28,9-82,3 | 60 | 81,1 | 70,3-89,3 |
| <i>aap</i> | 39 | 65,0 | 51,6-76,9 | 8 | 57,1 | 28,9-82,3 | 47 | 63,5 | 51,5-74,4 |
| <i>aatA</i> | 29 | 48,3 | 35,2-61,6 | 0 | 0 | 0-23,2 | 29 | 39,2 | 28,0-51,2 |
| <i>ast</i> | 19 | 31,7 | 20,3-45,0 | 4 | 28,6 | 8,4-58,1 | 23 | 31,1 | 20,8-42,9 |
| <i>aai</i> | 8 | 13,3 | 5,9-24,6 | 0 | 0 | 0-23,2 | 8 | 10,8 | 4,8-20,2 |
| ExPEC | | | | | | | | | |
| <i>pap</i> | 15 | 25,0 | 14,7-37,9 | 9 | 64,3 | 35,1-87,2 | 24 | 32,4 | 22,0-44,3 |
| <i>sfa</i> | 4 | 6,7 | 1,9-16,2 | 14 | 100 | 76,8-100 | 18 | 24,3 | 15,1-35,7 |
| <i>afa</i> | 2 | 3,3 | 0,4-11,5 | 2 | 14,3 | 1,8-42,8 | 4 | 5,4 | 1,5-13,3 |
| <i>kpsMT II</i> | 4 | 6,7 | 1,9-16,2 | 3 | 21,4 | 4,7-50,8 | 7 | 9,5 | 3,9-18,5 |
| <i>iutA</i> | 9 | 15,0 | 7,1-26,6 | 12 | 85,7 | 57,2-98,2 | 21 | 28,4 | 18,5-40,1 |
| <i>hlyA</i> | 21 | 35,0 | 23,1-48,4 | 9 | 64,3 | 35,1-87,2 | 30 | 40,5 | 29,3-52,6 |
| <i>cnf</i> | 5 | 8,3 | 2,8-18,4 | 5 | 35,7 | 12,8-64,9 | 10 | 13,5 | 6,7-23,5 |

штаммах (75%), выделенных из проб испражнений. Гены, кодирующие пиелонефрит-ассоциированные пили (*pap*), афимбриальные адгезины (*afa*), синтез капсулы (*kpsMT II*), α -гемолизина (*hlyA*) и цитонекротического фактора (*cnf*) без значимых различий присутствовали в штаммах, выделенных из проб испражнений и мочи ($p > 0,05$). Статистически значимо ($p < 0,05$) в штаммах EAgEC, выделенных из проб мочи, присутствовали два гена *iutA* (85,7%) и *sfa* (100%), ответственные за синтез аэробактина и S-фимбрий, по сравнению с копроизолятами (15,0 и 6,7% соответственно).

По суммарным данным в 74 штаммах EAgEC присутствовали от одного (*aaf*) до шести генов вирулентности DEC. В таблице 2 представлены индивидуальные генотипы вирулентности штаммов t – EAgEC и a – EAgEC, выделенных из проб различных биологических материалов. По сочетанию генов, кодирующих факторы вирулентности, популяция штаммов EAgEC (t – EAgEC + a – EAgEC) характеризовалась 15 генотипами, все из которых встречались в штаммах, выделенных из проб испражнений пациентов с ОКИ.

Штаммы, выделенные из проб мочи, характеризовались шестью генотипами вирулентности. Гетерогенность вирулентности была более выражена среди штаммов t – EAgEC (11 генотипов) по сравнению с a – EAgEC (4 генотипа).

Антигенная характеристика штаммов EAgEC. Анализ геномов 24 штаммов EAgEC на платформе SerotypeFinder 2.0 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/SerotypeFinder/>) онлайн-ресурса «Center for Genomic Epidemiology» показал, что штаммы по идентичности нуклеотидных последовательностей геномов, кодирующих синтез O-антигенов и H-антигенов, принадлежали к 10 серогруппам и 13 сероварам: O3:H2, O11:H10, O16:H48, O51:H30, O55:H21, O73:H18, O73:H33, O86:H2, O86:H10, O92:H33, O140:H2, O159:H10. Два штамма имели уникальные нуклеотидные последовательности генов, кодирующих O-антигены, которые отличались от 186 известных O-антигенов, включенных в базу данных SerotypeFinder.

Выявление эпидемически значимого высоковирулентного гибридного клона UPEC/ EAgEC ST38. Анализ результатов MLST типирования показал, что 11 из 14 штаммов EAgEC, выделенных из проб мочи, принадлежали к международному клону высокого риска эпидемического распространения ST 38, имели гены возбудителей ИМП и ОКИ.

Обсуждение. Патогенные *E. coli* идентичные по культурально-ферментативным свойствам, характеризуются вариативностью генетических детерминант, кодирующих ключевые факторы вирулентности, определяющие полиморфизм клинических проявлений заболеваний.

EAgEC впервые описанные в 1987 г., в настоящее время признаны основными возбудителями острых диарей детей и взрослых практически во всех странах, способных к широкому эпидемическому распространению [2, 3, 12]. Общеизвестно, что EAgEC-инфекция относится к антропонозам, резервуаром и источником инфекции является человек, с фекально-оральным механизмом передачи, который чаще реализуется пищевым и водным путями. Нет достоверных данных о том, что животные могут быть источником инфекции [1]. Известно, что *E. coli* вызывают широкий спектр внекишечных заболеваний, в том числе мочевыводящих путей (уропатогенные *E. coli*), менингиты новорожденных (менингеальные *E. coli*), сепсис (септицемические *E. coli*). Являются ведущим возбудителем инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), входят в число 12 видов бактерий с критическим уровнем резистентности [18].

Традиционный культуральный метод, основанный на морфологических, биохимических и серологических свойствах характеризует внутривидовую фенотипическую неоднородность выделенных штаммов *E. coli*. Этиологическая значимость разных клинических форм заболеваний, обусловленных *E. coli*, определяется наличием генов вирулентности возбудителя. Молекулярно-генетические методы исследования обеспечивают достоверную идентификацию «классических» и гибридных патогрупп, антигенную характеристику воз-

Распределение генов вирулентности в штаммах EAgEC, выделенных из проб различных биоматериалов

| Гены вирулентности | Испражнения (n = 60) | | Моча (n = 14) | | p |
|----------------------------------|----------------------|-----------|---------------|-----------|-------|
| | abc (%) | 95% ДИ | abc (%) | 95% ДИ | |
| t-EAgEC | | | | | |
| 2 гена вирулентности | 14 (23,3) | 13,4-36,0 | 6 (42,9) | 17,7-71,1 | >0,05 |
| <i>aggR+astA</i> | 2 (3,3) | 0,4-11,5 | 2 (14,3) | 1,8-42,8 | >0,05 |
| <i>aggR+aaf</i> | 5 (8,3) | 2,8-18,4 | 0 (0) | 0-23,2 | >0,05 |
| <i>aggR+aap</i> | 7 (11,7) | 4,8-22,6 | 4 (28,6) | 8,4-58,1 | >0,05 |
| 3 гена вирулентности | 14 (23,3) | 13,4-36,0 | 3 (21,4) | 4,7-50,8 | >0,05 |
| <i>aggR+aaf+astA</i> | 5 (8,3) | 2,8-18,4 | 0 (0) | 0-23,2 | >0,05 |
| <i>aggR+aaf+aap</i> | 6 (10,0) | 3,8-20,5 | 3 (21,4) | 4,7-50,8 | >0,05 |
| <i>aggR+aaf+aat</i> | 3 (5,0) | 1,0-13,9 | 0 (0) | 0-23,2 | >0,05 |
| 4 гена вирулентности | 15 (25,0) | 14,7-37,9 | 0 (0) | 0-23,2 | >0,05 |
| <i>aggR+aaf+aap+aat</i> | 15 (25,0) | 14,7-37,9 | 0 (0) | 0-23,2 | >0,05 |
| 5 генов вирулентности | 5 (8,3) | 2,8-18,4 | 0 (0) | 0-23,2 | >0,05 |
| <i>aggR+aaf+aap+aat+aai</i> | 1 (1,7) | 0-8,9 | 0 (0) | 0-23,2 | >0,05 |
| <i>aggR+aaf+aap+aat+astA</i> | 2 (3,3) | 0,4-11,5 | 0 (0) | 0-23,2 | >0,05 |
| <i>aggR+aaf+aap+astA+aai</i> | 2 (3,3) | 0,4-11,5 | 0 (0) | 0-23,2 | >0,05 |
| 6 генов вирулентности | 5 (8,3) | 2,8-18,4 | 0 (0) | 0-23,2 | >0,05 |
| <i>aggR+aaf+aap+aat+astA+aai</i> | 5 (8,3) | 2,8-18,4 | 0 (0) | 0-23,2 | >0,05 |
| a-EAgEC | | | | | |
| 1 ген вирулентности | 2 (3,3) | 0,4-11,5 | 1 (7,1) | 0,2-33,9 | >0,05 |
| <i>aaf</i> | 2 (3,3) | 0,4-11,5 | 1 (7,1) | 0,2-33,9 | >0,05 |
| 2 гена вирулентности | 4 (6,7) | 1,9-16,2 | 4 (28,6) | 8,4-58,1 | >0,05 |
| <i>aaf+astA</i> | 3 (5,0) | 1,0-13,9 | 3 (21,4) | 4,7-50,8 | >0,05 |
| <i>aaf+aat</i> | 1 (1,7) | 0-8,9 | 1 (7,1) | 0,2-33,9 | >0,05 |
| 4 гена вирулентности | 1 (1,7) | 0-8,9 | 0 (0) | 0-23,2 | >0,05 |
| <i>aaf+aap+astA+aai</i> | 1 (1,7) | 0-8,9 | 0 (0) | 0-23,2 | >0,05 |

будителя, снижая ошибки интерпретации результатов культурального метода диагностики. Анализ научной литературы показал, что популяция EAgEC, характеризуется генетической пластичностью и вариабельностью генов вирулентности, что приводит к появлению новых гибридных патогрупп (EAgEC/STEC) и штаммов с геропатогенным потенциалом – энтероаггративным/уропатогенным генотипом (EAgEC/UPEC) [19].

Выводы.

1. У 75% EAgEC, выделенных из проб испражнений пациентов с диарейным синдромом выявлены гены вирулентности EхPEC, что имеет важное прогностическое значение развития ИМП.

2. 80% популяции российских EAgEC, выделенных из испражнений и мочи, характеризовались энтероаггративным/уропатогенным генотипом (EAgEC/UPEC).

3. Два штамма EAgEC имели уникальные нуклеотидные последовательности генов, кодирующих 186 известных O – антигенов, включенных в базу данных SerotypeFinder.

4. 78,6% штаммов, выделенных из мочи, относились к известному вирулентному клону высокого риска эпидемического распространения ST 38, ассоциированному с гибридными штаммам UPEC / EAgEC [18].

5. В международном банке данных GenBank депонированы нуклеотидные последовательности гена *aat* – регулятора генов вирулентности двух штаммов EAgEC (номера доступа MG564312, MG564313).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (1-3, 8-10, 12-17, 19 см. REFERENCES)

- Бондарева А.В., Горелов А.В., Подколзин А.Т., Николаева Т.А. Роль патогенных эшерихий в этиологической структуре острых кишечных инфекций у детей на современном этапе. *Инфекционные болезни*. 2012; 10 (1): 61.
- Макарова М.А., Сузаева Л.В., Кафтырева Л.А. Дети раннего возраста с дисбиозом кишечника как носители энтероаггративных *Escherichia coli*. *Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунологии*. 2017;4: 54-8.
- Подколзин А.Т., Мухина А.А., Шипулин Г.А., Кузьмина В.Н., Браславская С.И., Малев В.В. и др. Изучение этиологии острых кишечных инфекций у детей, госпитализированных в инфекционные отделения стационаров Москвы. *Инфекционные болезни*. 2004;2 (4): 85-91.
- Соколова Е.Д., Галтаева А.М., Замурий О.Ю., Дидиченко О.В., Моколова Ю.В., Муратова В.А. и др. Полимеразная цепная реакция в диагностике острых кишечных инфекций в детском инфекционном стационаре: возможности и проблемы. *Инфекция и иммунитет*. 2016; 6 (3): 225-31.
- Червинец В. М., Червинец Ю. В., Михайлова Е. С., Самоукина А. М., Беляева Е.А., Миронов А.Ю. Микробиоценоз кишечника и иммунный статус у детей младшего школьного возраста // *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013;1:49-51.
- ВОЗ. Список бактерий, для борьбы с которыми требуется создание новых антибиотиков [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.who.int/ru/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-witch-new-antibiotics-are-urgently-needed>.

REFERENCES

1. Jensen B. H., Olsen K. E. P., Struve C., Krogfelt K. A., Petersen A. M. Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2014; 27: 614–30. Available at: doi: 10.1128/CMR.00112-13.
2. Gomes T.A.T., Elias W. P., Scaletsky I. C.A., Guth B. E.C., Rodrigues J. F., Piazza R. M.F. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian J. Microbiol.* 2016; 47: 3–30. Available at: doi:10.1016/j.bjm.2016.10.015.
3. Gomez-Duarte O. Acute diarrheal disease caused by enteropathogenic *Escherichia coli* in Colombia. *Rev. Chil. Infectol.* 2014; 31(5):577-86. Available at: doi: 10.4067/S0716-10182014000500010.
4. Bondareva A.V., Gorelov A.V., Podkolzin A.T., Nikolaeva T.A., Бондарева А.В. The role of pathogenic *Escherichia* in the etiological structure of acute intestinal infections in children at the present stage. *Infektsionnye bolezni.* 2012;10 (1): 61. (in Russian)
5. Makarova M.A., Suzhaeva L.V., Kaftyreva L.A. Young children with intestinal dysbiosis as carriers of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2017;4: 54-8. (in Russian)
6. Podkolzin A.T., Mukhina A.A., Shipulin G.A., Kuzmina V.N., Braslavskaya S.I., Malev V.V. et al. Study of the etiology of acute intestinal infections in children hospitalized in infectious diseases departments of Moscow hospitals. *Infektsionnye bolezni.* 2004; 2 (4): 85-91. (in Russian)
7. Sokolova E.D., Galtaeva A.M., Zamuriy O.Yu., Didichenko O.V., Mokolova Yu.V., Muratova V.A. et al. Polymerase chain reaction in the diagnosis of acute intestinal infections in the children's infectious diseases hospital: opportunities and problems. *Infektsiya i immunitet.* 2016; 6 (3): 225-31. (in Russian)
8. Huang D.B., Nataro J.P., DuPont H.L. Enteroaggregative *Escherichia coli* is a cause of acute diarrheal illness: a meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.* 2006; 43: 556–63. Available at: doi: 10.1086/505869.
9. Pabalan N., Singian E., Jarjanazi H., Steiner TS Enteroaggregative *Escherichia coli* and acute diarrhea in children: a meta-analysis of South Asian populations. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2013; 32: 597–607. Available at: 10.1007/s10096-012-1779-3.
10. Lima I.F.N., Boisen N., Quetz J.S., Havt A., Carvalho E., Soares A.M. et al. Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* and its virulence-related genes in a case-control study among children from north-eastern Brazil. *Med. Microbiol.* 2013; 62: 683-93. Available at: doi:10.1099/jmm.0.054262-0.
11. Chervinets V. M., Chervinets Yu. V., Mikhailova E. S., Samoukina A. M., Belyaeva E. A., Mironov A. Yu. The intestinal microbiota and immune status in children of primary school age. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2013. – No. 1.: 49-51. (in Russian)
12. Nataro J.P., Kaper J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998; 11 (1):142 – 201. Available at: doi: 10.1128/CMR.11.1.142
13. Mariani-Kurkdjian P., Bingen E. *Escherichia coli* 0104:H4: a hybrid pathogen. *Arch. Pediatr.* 2012; 3: 97–100. Available at: doi: 10.1016/S0929-693X(12)71281-2.
14. Herzog K., Engeler Dusel J., Hugentobler M. Diarrheagenic enteroaggregative *Escherichia coli* causing urinary tract infection and bacteremia leading to sepsis. *Infect.* 2014; 42: 441–444. Available at: 10.1007/s15010-013-0569-x.
15. Nazemi A., Mirinargasi M., Merikhi N., Sharifi S.H. Distribution of pathogenic genes *aatA*, *aap*, *aggR*, among uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) and their linkage with *stbA* gene. *Indian J Microbiol.* 2011;51:355–358. Available at: doi:10.1007/s12088-011-0175-5.
16. Etefia E.U, Ben S.A. Virulence markers, phylogenetic evolution, and molecular techniques of uropathogenic *Escherichia coli*. *J Nat Sci Med.* 2020;3:13-22. Available at:<http://www.jnsmonline.org/text.asp?2020/3/1/13/269240>.
17. Sarowska J., Futoma-Koloch B., Jama-Kmieciak A., Frej-Madrzak M., Ksiazczyk M., Bugla-Ploskonska G. et al. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. *Gut Pathog.* 2019; 11:10. Available at: doi:10.1186/s13099-019-0290-0.
18. WHO published list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. News Release 27.02.2017. Available at: <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
19. Chattaway M. A., Jenkins C., Ciesielczuk H., Day M., DoNascimento V., Day M. et al. Evidence of evolving extraintestinal enteroaggregative *Escherichia coli* ST38 clone. *Emerging infectious diseases.* 2014; 20(11): 1935–7. <https://doi.org/10.3201/eid2011.131845>.

Поступила 04.10.20

Принята к печати 27.10.20

Червинец В. М., Червинец Ю. В., Кравчук Э. С.

МИКРОБИОМ ПОЛОСТИ РТА И ТОЛСТОЙ КИШКИ У ЮНОШЕЙ ПРИЗЫВНОГО ВОЗРАСТА С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ И МЕТАБОЛИЧЕСКИМИ НАРУШЕНИЯМИ

ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 170100, Тверь, Россия

*Цель работы – определить видовой и количественный состав, частоту встречаемости микроорганизмов в ротовой жидкости и толстой кишке у здоровых юношей и имеющих артериальную гипертензию (АГ), и метаболические нарушения (МБН). Проведено анкетирование 51 юноши-студента, обучающихся в Тверском государственном медицинском университете. Установлено, что более чем у 70% студентов с АГ и МБН наблюдались, выраженные дисбиотические нарушения микробиоты кишечника II и III степени с понижением количества *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Peptococcus spp.* и увеличением количества и частоты встречаемости *Bacillus subtilis*, *Clostridium spp.*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*. Микробиоценоз кишечника студентов с АГ и МБН характеризуется снижением количества и частоты встречаемости *Lactobacillus spp.* При МБН повышается распространённость (частота) и количество *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, при АГ – *Bacillus subtilis*, *Neisseria*, *Actinomyces*, *Peptostreptococcus spp.**

Ключевые слова: микробиота ЖКТ; артериальная гипертензия; ожирение; юноши.

Для цитирования: Червинец В. М., Червинец Ю. В., Кравчук Э. С. Микробиом полости рта и толстой кишки у юношей призывного возраста с артериальной гипертензией и метаболическими нарушениями. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65(11): 712-716. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-11-712-716>

Chervinets V.M., Chervinets Yu.V., Kravchuk E.S.

PECULIARITIES OF THE MOUTH AND COLUM IN THE YOUTH OF ANNOUS AGE WITH ARTERIAL HYPERTENSION AND METABOLIC DISORDERS

Tver' State Medical University, 170100, Tver', Russia

*The purpose of the work is to determine the species, quantitative composition and frequency of occurrence of microorganisms in the oral fluid and large intestine in healthy young men and having arterial hypertension, and metabolic disorders. A survey was conducted of 51 young students studying at Tver State Medical University. It was found that more than 70% of students with AH (arterial hypertension) and MBN (metabolic disorders) showed pronounced dysbiotic disorders of the intestinal microbiota of II and III degree with a decrease in the number of *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Peptococcus spp.* and an increase in the number and frequency of occurrence of *Bacillus subtilis*, *Clostridium spp.*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*. The intestinal microbiocenosis of students with AH and MS is characterized by a decrease in the number and frequency of occurrence of *Lactobacillus spp.* However, with MS, the prevalence (frequency) and quantity increase *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, and in hypertension – *Bacillus subtilis*, *Neisseria*, *Actinomyces*, *Peptostreptococcus spp.**

Key words: *gastrointestinal microbiota; arterial hypertension; obesity; students.*

For citation: Chervinets V. M., Chervinets Yu.V., Kravchuk E. S. Peculiarities of the mouth and colume in the youth of annous age with arterial hypertension and metabolic disorders. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65 (11): 712-716 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-11-712-716>

For correspondence: *Kravchuk Elina Sergeevna*, post-graduate student, Assistant of the Department of Microbiology and Virology with a course of immunology; e-mail: ellada_92@mail.ru

Information about authors:

Chervinets V. M., <https://orcid.org/0000-0001-6549-0010>;

Chervinets Yu. V., <https://orcid.org/0000-0001-9209-7839>;

Kravchuk E. S., <https://orcid.org/0000-0002-7236-3391>.

Conflict of interest. *The authors declare no conflict of interest.*

Acknowledgment. *The study had no sponsorship.*

Received 20.02.2020
Accepted 19.06.2020

Введение. Распространение сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе артериальной гипертензии (АГ) и метаболических нарушений (МБН) у людей представляет наиболее опасные причины смерти во всем мире. Это способствует тому, что исследователи занимаются непрерывным поиском новых стратегий их профилактики и вы-

явлению новых факторов риска. Одним из обсуждаемых в последние годы направлений служит изучение влияния микробиоты кишечника человека на организм в контексте патогенеза АГ и МБН. Метаболиты бактерий кишечника вносят вклад в развитие атеросклероза, АГ, сердечной недостаточности, ожирения, сахарного диабета [1-5].

Для корреспонденции: *Кравчук Элина Сергеевна*, ассистент каф. микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии; e-mail: ellada_92@mail.ru

Высокая распространённость, быстрые темпы роста, тяжёлые осложнения, ведущие к ухудшению качества жизни, делают ожирение одной из серьёзных проблем здравоохранения начала XXI века [4-7]. В 2017 г., по данным ВОЗ, 39% взрослых старше 18 лет имели избыточный вес (39% мужчин и 40% женщин) и около 13% страдали ожирением (11% мужчин и 15% женщин), от сердечной патологии в 2016 г. в мире умерло 17,9 млн человек (31% смертельных случаев). По оценкам учёных, причиной 9 млн смертельных случаев ежегодно становится повышенное артериальное давление. Актуальным является поиск этиопатогенетических механизмов развития АГ и МБН [8-10]. Актуально дальнейшее исследование особенностей микробиома толстого кишечника и его связь с этиопатогенезом АГ и МБН.

Цель – определить видовой и количественный состав, частоту встречаемости микроорганизмов в ротовой жидкости и фекалиях у здоровых юношей призывного возраста и имеющих АГ и МБН.

Материал и методы. Для микробиологического анализа использованы ротовая жидкость и фекалии студентов (18-22 лет) мужского пола Тверского государственного медицинского университета (ТГМУ). Исследование проведено у 51 человека: 17 практически здоровых юношей, 17 студентов, имеющих АГ, 17 студентов с МБН. Респондентов анкетировали по вопросам наличия сердечно-сосудистых и других хронических неинфекционных заболеваний, морфометрическим показателям, физической активности, характеру питания, вредных привычек, использования лекарственных средств и других данных. На момент исследования юноши были клинически здоровы, не имели в анамнезе инфекционных и соматических заболеваний ЖКТ и других органов и систем, дали информированное письменное согласие на сбор материала. Забор ротовой жидкости и фекалий проводился утром до еды в стерильные одноразовые пластиковые контейнеры лично студентами, предварительно обученными методикам забора материала. Материал доставлялся в бактериологическую лабораторию кафедры микробиологии ТГМУ в течение 2 ч.

Для изучения микробиоценоза пищеварительного тракта использован культуральный метод. Материал сеяли на питательные среды: Shaedler Agar с кровью для анаэробов, хромогенный селективный агар для уропатогенных кишечных бактерий, HiCrome Bacillus Agar для индикации и идентификации бацилл, HiCrome Enterococcus faecium Agar для энтерококков, маннит-солевой агар (M118) с добавлением эмульсии куриного желтка для стафилококков, МРС-лактоагар, бифидоагар, хромогенный агар для грибов рода *Candida* (Himedia). Культивирование велось в аэробных, микроаэрофильных, анаэробных условиях с использованием микроанэростатов (BBL) и газогенераторных пакетов при температуре 37° С в течение 24-48 ч. Количественное содержание бактерий выражали в виде десятичного логарифма колониеобразующих единиц – lg КОЕ/г или lg КОЕ/мл. Анализ микрорейза кишечника проводили в соответствии с ОСТ 91500.11.0004-2003 «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника».

Для статистической обработки результатов экспериментов использована программа STATISTICA (StatSoftRussia), различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты. При анкетировании выявлено наличие вредных привычек у 49% респондентов. Около половины опрошенных (43%) подвержены постоянному влиянию эмоционального напряжения. Все обследуемые указали на двухразовое смешанное питание. Малоподвижный образ жизни ведут 41% всех опрошенных вне зависимости от группы выбора. Студенты, отнесённые в группу с МБН, имеют либо ожирение ($n = 10$): 50% – 1 степени, 40% – 2 степени, 10% – 3 степени, либо недостаточность массы тела ($n = 7$) – 100%.

Анализ результатов микробиологических исследований показал, что микробиота проксимального и дистального отделов пищеварительного тракта студентов с различными хроническими заболеваниями имеет особенности.

При бактериологическом анализе ротовой жидкости у 51 студента выявлены микроорганизмы 13 родов (рис. 1).

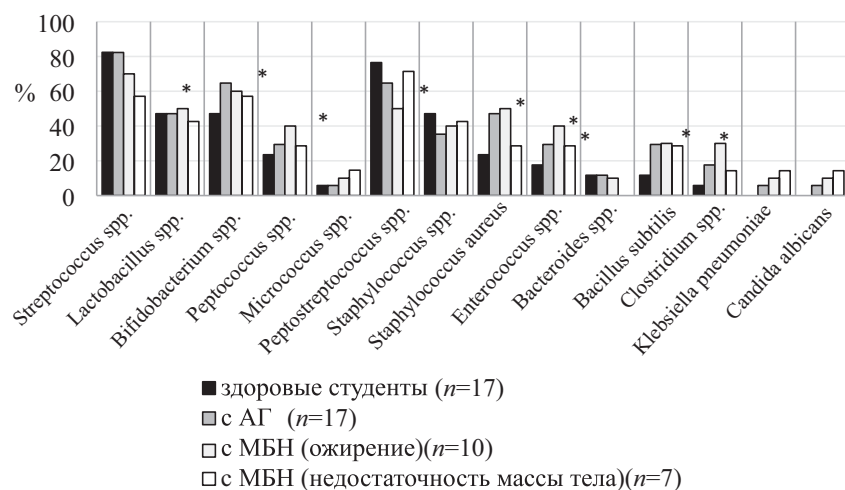


Рис. 1. Спектр и частота встречаемости микроорганизмов в ротовой жидкости здоровых студентов, имеющих АГ и МБН. Здесь и на рис.2: * – значения $p \leq 0,05$. По оси абсцисс – наименования микроорганизмов; по оси ординат – распространенность микроорганизмов (%). n – количество обследуемых юношей, p – требуемый уровень значимости.

В ротовой жидкости у здоровых студентов в 82% случаев выделены *Streptococcus spp.*, в 77% – *Peptostreptococcus spp.*, в 47% – *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.* и *Staphylococcus spp.* В меньшем числе, в 24% случаев изолированы *Peptococcus spp.* и *Staphylococcus aureus*, в 18% – *Enterococcus spp.*, в 12% – *Bacteroides spp.* и *Bacillus subtilis*. Распространение других видов микроорганизмов составило менее 6%. Количество выделенной микробиоты варьировало от $7,62 \pm 1,75$ lg КОЕ/мл для *Peptostreptococcus spp.* до $4,15 \pm 0,21$ lg КОЕ/мл для *Bacillus subtilis*. В большем количестве встречались *Peptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Clostridium spp.*, *Streptococcus spp.*

При исследовании микробиоценоза рта больных АГ (см. рис. 1) в 82% случаев выявлены *Streptococcus spp.*, в 65% – *Bifidobacterium spp.* и *Peptostreptococcus spp.*, в 47% – *Lactobacillus spp.* и *S. aureus*, в 35% – *Staphylococcus spp.*, в 29% – *Peptococcus spp.*, *Enterococcus spp.* и *Bacillus subtilis*, в 18% – *Clostridium spp.*,

в 12% – *Bacteroides spp.*, менее чем в 6% – *Micrococcus spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*. Количество изолированных микроорганизмов варьировало от $6,69 \pm 0,1$ IgKOE/мл у *Micrococcus spp.* до $4,64 \pm 0,95$ IgKOE/мл у *Lactobacillus spp.* Преобладали в количественном отношении *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Clostridium spp.*

В ротовой жидкости студентов с ожирением (см. рис. 1) в 70% случаев выделены *Streptococcus spp.*, в 60% – *Bifidobacterium spp.*, в 50% – *Lactobacillus spp.*, *Peptostreptococcus spp.* и *S. aureus*, в 40% – *Peptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus spp.* в 30% – *Bacillus subtilis* и *Clostridium spp.*, в 10% – *Micrococcus spp.*, *Bacteroides spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*. Количество микробиоты изменялось от $6,98 \pm 0,85$ IgKOE/мл у *Clostridium spp.* до $4,69 \pm 0,1$ IgKOE/мл у *Candida albicans*. В большем количестве высевались *Peptostreptococcus spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*.

У студентов с недостаточностью массы тела (см. рис. 1) в ротовой жидкости изолированы в 71% случаев – *Peptostreptococcus spp.*, в 57% – *Streptococcus spp.* и *Bifidobacterium spp.*, в 43% – *Lactobacillus spp.* и *Staphylococcus spp.*, в 29% – *Peptococcus spp.*, *S. aureus*, *Enterococcus spp.*, *Bacillus subtilis*, в 14% – *Micrococcus spp.*, *Clostridium spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*. Количество выделенных микроорганизмов изменялось от $7,0 \pm 0,6$ IgKOE/мл у *Enterococcus spp.* до $4,05 \pm 1,34$ IgKOE/мл у *Lactobacillus spp.* В преобладающем количестве выделялись *Clostridium spp.*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis*.

При исследовании фекалий 51 студента выделены 19 родов микроорганизмов (рис. 2).

В фекалиях здоровых студентов преобладают: в 82% случаев – *Enterococcus spp.*; в 71% – *E. coli.*, в 59% – *Lactobacillus spp.* *Bifidobacterium spp.*, в 47% – *Staphylococcus spp.*, *Clostridium spp.*, в 41% – *Bacillus spp.*

Реже выделялись в 29% – *Bacteroides spp.*, *Streptococcus spp.*, в 24% – *Peptostreptococcus spp.*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, в 18% – *Peptococcus spp.*, *S. aureus*, *Micrococcus spp.*, менее чем в 12% случаев – *Proteus mirabilis*, *Corynebacterium*, *Stomatococcus spp.* Количество микроорганизмов изменялось от $7,15 \pm 0,65$ IgKOE/г для *Klebsiella pneumoniae* до $4,0 \pm 0,5$ IgKOE/г для *Stomatococcus spp.* В количественном отношении преобладают: *Clostridium spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Peptococcus spp.*, *Peptostreptococcus spp.*

Нормальный микробиоценоз кишечника выявлен у 18% студентов, у 53% – дисбактериоз I степени, у 29% – II степени.

При исследовании микробиоценоза толстой кишки студентов с АГ чаще высевались – *Enterococcus spp.* (88%), в 77% – *E. coli*, в 59% – *Bifidobacterium spp.*, *Bacillus spp.*, в 41% – *Clostridium spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, в 35% – *Lactobacillus spp.*, *Staphylococcus spp.* Реже встречались в 29% – *Peptostreptococcus spp.*, *Proteus vulgaris*, *Micrococcus spp.*, в 24% – *Bacteroides spp.*, *Peptococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, в 12% – *Neisseria spp.*, в 6% – *Corynebacterium spp.*, *Stomatococcus spp.*, *Actinomyces spp.* Количество выделенной микробиоты варьировало от $7,1 \pm 0,8$ IgKOE/г для *Peptostreptococcus spp.* до $3,0 \pm 0,1$ IgKOE/г для *Stomatococcus spp.* В большем количестве встречались *Clostridium spp.*, *Actinomyces spp.*, *Peptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*

У всех обследованных юношей с АГ выявлены дисбиотические нарушения: у 18% – дисбактериоз I степени, у 35% – II степени, у 47% – III степени.

У студентов с ожирением из фекалий высеваны в 70% случаев – *E. coli*, *Lactobacillus spp.*, *Bacillus spp.*, в 50% – *Bifidobacterium spp.*, *Clostridium spp.*, в 40% – *Bacteroides spp.*, *Staphylococcus spp.*, в 30% – *Enterococcus spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, в 20% – *Proteus vulgaris*, *Candida*

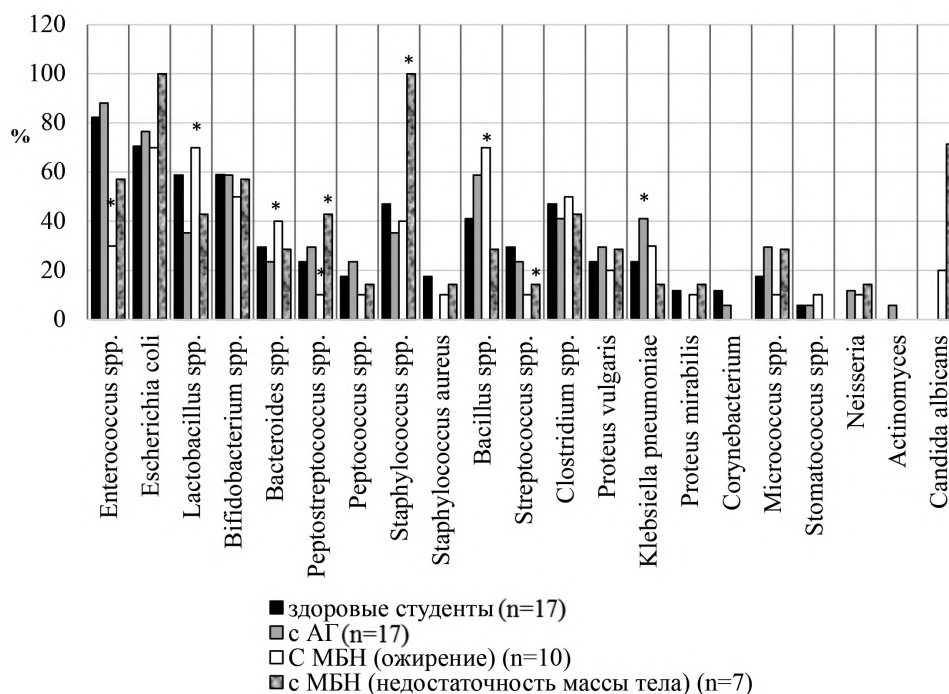


Рис. 2. Спектр и частота встречаемости микроорганизмов в фекалиях здоровых студентов, имеющих АГ и МБН.

albicans, в 10% – *Peptostreptococcus spp.*, *Peptococcus spp.*, *S. aureus*, *Streptococcus spp.*, *Proteus mirabilis*, *Micrococcus spp.*, *Stomatococcus spp.*, *Neisseria spp.*. Количество микробиоты изменялось от $7,47 \pm 0,1$ IgKOE/г у *Peptostreptococcus spp.* до $3,84 \pm 0,1$ IgKOE/г у *Micrococcus spp.*. В большем количестве высевались *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Clostridium spp.*, *Proteus vulgaris*.

Дисбиотические нарушения микробиоценоза I степени выявлены у 30% студентов с ожирением, у 30% – дисбактериоз II степени, у 40% – III степени.

Из фекалий студентов с недостаточностью массы тела выделены в 100% случаев – *E. coli*, *Staphylococcus spp.*, в 71% – *Candida albicans*, в 57% – *Enterococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, в 43% – *Lactobacillus spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Clostridium spp.*, в 29% – *Bacteroides spp.*, *Bacillus spp.*, *Proteus vulgaris*, *Micrococcus spp.*, в 14% случаев – *Peptococcus spp.*, *S. aureus*, *Streptococcus spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Neisseria spp.*. Количество выделенных микроорганизмов изменялось от $6,7 \pm 1,36$ IgKOE/г у *Clostridium spp.* до $3,9 \pm 0,1$ IgKOE/г у *Proteus mirabilis*. В преобладающем количестве встречались *Bacteroides spp.*, *Enterococcus spp.*, *E. coli*.

У всех обследованных юношей с недостаточностью массы тела выявлены дисбиотические нарушения: у 28% – дисбактериоз I степени, у 29% – II степени, у 43% – III степени.

Обсуждение. При обучении в университете студентам приходится постоянно адаптироваться к изменяющимся условиям жизнедеятельности под влиянием различных факторов: особенностей питания, высокой учебной нагрузки, психоэмоционального напряжения, гиподинамии, меняющегося иммунного и гормонального статуса и других. Период адаптации сопровождается функциональной перестройкой всех органов и систем в разной степени выраженности, в том числе желудочно-кишечного тракта. Хронические заболевания могут продолжать прогрессировать, часто при отсутствии жалоб на самочувствие.

Исследования подтверждают факт того, что дисбиотичная кишечная микробиота может вносить вклад в ожирение, связанное с нарушением рациона питания [10], причём у здоровых людей с нормальной массой преобладает тип *Bacteroides*, у людей с ожирением – тип *Firmicutes* [10, 11].

Исследования ротовой жидкости студентов показали, что микробиота при АГ (см. рис. 1) более разнообразна, выделена *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*. По сравнению со здоровой группой увеличилась частота встречаемости *S. aureus* – на 23%, *Bifidobacterium spp.*, *Bacillus subtilis* – на 18%, *Clostridium spp.* – на 12%, *Enterococcus spp.* – на 8%, *Peptococcus spp.* – на 5%. Снизилась распространённость *Peptostreptococcus spp.* и *Staphylococcus spp.* – на 12% каждого. Частота встречаемости *Streptococcus spp.* (82%), *Lactobacillus spp.* (47%), *Bacteroides spp.* (12%), *Micrococcus spp.* (6%) осталась прежней.

Bacillus subtilis, *Clostridium spp.*, *S. aureus* выделялись в достоверно большем количестве у студентов с АГ. *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Peptococcus spp.* определялись в достоверно меньшем количестве у студентов.

В ротовой жидкости студентов с ожирением, по сравнению со здоровыми, чаще изолированы *S. aureus* (на 26%), *Clostridium spp.* (на 24%), *Enterococcus spp.* (на 22%), *Bacillus subtilis* (на 18%), *Peptococcus spp.* (на 16%), *Bifidobacterium spp.* (на 13%), *Lactobacillus*

spp., *Micrococcus spp.* (на 2-3%). Стали выделяться *K. pneumoniae*, *C. albicans* (10%). Снижение частоты встречаемости выявлено для *Peptostreptococcus spp.* (на 27%), *Streptococcus spp.* (на 12%), *Staphylococcus spp.* (на 7%), *Bacteroides spp.* (на 2%). При количественном сравнении достоверно больше выделялись: *S. aureus*, *B. subtilis*, *K. pneumoniae*, *C. albicans*, но меньше *Streptococcus spp.*, *Peptococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*

В ротовой жидкости студентов с недостаточностью массы тела наблюдалось увеличение распространённости *B. subtilis* – на 17%, *Bifidobacterium spp.* – на 10%, *Enterococcus spp.* – на 9%, *Micrococcus spp.*, *Clostridium spp.* – на 8%, *Peptococcus spp.*, *S. aureus* – менее 6%. Реже изолированы *Streptococcus spp.* – на 27%, *Lactobacillus spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.* – менее чем на 6%. *K. pneumoniae*, *C. albicans* обнаружены в 14% случаев, не высевались *Bacteroides spp.* *S. aureus*, *B. subtilis*, *K. pneumoniae*, *C. albicans* – выделены в достоверно большем количестве у студентов с недостаточностью массы тела. *Staphylococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Peptococcus spp.* определялись в достоверно меньшем количестве у этих студентов.

Микробиота толстой кишки студентов с АГ (см. рис. 2) отличается от здоровых лиц. Стали высеваться *Neisseria spp.* (12%), *Actinomyces spp.* (6%), но исчезли *S. aureus* и *P. mirabilis*. Увеличилась частота встречаемости *B. subtilis* (на 18%), *K. pneumoniae* (на 17%). *Enterococcus spp.*, *E. coli*, *Peptostreptococcus spp.*, *Peptococcus spp.*, *P. vulgaris* *Micrococcus spp.* стали выделяться чаще не более чем на 8%. Снизилась распространённость *Lactobacillus spp.* (на 24%), *Staphylococcus spp.* (на 12%), остальных – менее 6%. Осталась прежней распространённость *Bifidobacterium spp.* (по 59%) и *Stomatococcus spp.* (по 6%). Количество представителей облигатных микроорганизмов практически не изменилось сравнении со здоровой группой, условно-патогенных (*Bacillus subtilis*, *Neisseria*, *Actinomyces*, *Peptostreptococcus spp.*) равномерно возросло на несколько порядков.

В фекалиях студентов с ожирением (см. рис. 2), в сравнении со здоровыми, чаще изолировались *Bacillus subtilis* (на 18%), *Lactobacillus spp.*, *Bacteroides spp.* (на 11%), *Clostridium spp.*, *K. pneumoniae*, *Stomatococcus spp.* – менее чем на 6%. Преобладало снижение частоты встречаемости для большинства бактерий: *Enterococcus spp.* – на 52%, *Streptococcus spp.* – на 19%, *Peptostreptococcus spp.* – на 14%, *Bifidobacterium spp.*, *Proteus vulgaris* – на 9%, *Peptococcus spp.*, *S. aureus*, *Micrococcus spp.* – на 8%, остальные – менее 4%. Стали высеваться *C. albicans* (20%), *Neisseria spp.* (10%), исчезли *Corynebacterium spp.*. Количество ряда УПМ достоверно возросло – *Streptococcus spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *P. vulgaris*, *B. Subtilis*, *Neisseria spp.*, но для остальных микроорганизмов осталось практически неизменным.

В фекалиях студентов с недостаточностью массы тела наблюдается увеличение распространённости *Staphylococcus spp.* – на 53%, *E. coli* – на 29%, *Peptostreptococcus spp.* – на 19%, *Micrococcus spp.* – на 11%, уменьшение *Enterococcus spp.* – на 25%, *Lactobacillus spp.* – на 16%, *Streptococcus spp.* – на 15%, *B. subtilis* – на 12%, *K. pneumoniae* – на 10%. Стали изолироваться *Neisseria spp.* (14%), *C. albicans* (71%), исчезли *Corynebacterium spp.* и *Stomatococcus spp.*. Количество УПМ (*Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *P. vulgaris*) и ОМ (*Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*) достоверно снижено для

всех выделенных бактерий при сравнении со здоровой группой.

Результаты наших исследований согласуются с исследованием микробиоты у людей, страдающих АГ, проведенного в 2017 г. J.Li и соавт. [11], и выявившего снижение количества представителей некоторых кишечных филотивов: *Bacteroidetes*, *Bifidobacterium*, *Roseburia*.

Полученные данные дополняют информацию о ранее проведенным исследованиям, где кишечная микрофлора людей с ожирением, в сравнении со здоровыми пациентами, отличалась снижением *Bacteroidetes* и повышением *Fermitutes* [12-14]. При этом отмечена большая концентрация клостридий на фоне относительного снижения бифидобактерий [13, 15, 16].

Заключение. Анализ видовых и количественных характеристик микробиоты в изучаемых биотопах у здоровых юношей, имеющих хронические МБН и АГ, позволил выделить особенности сочетания доминирующей облигатной и факультативной микрофлоры и степень выраженности микробиологических изменений.

Более 70% студентов обеих групп имеют дисбиотические нарушения кишечника II степени и III степени.

Микробиота рта студентов с АГ характеризуется увеличением количества и частоты встречаемости *B. subtilis*, *Clostridium spp.*, *S. aureus*, снижением количества *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Peptococcus spp.*

В ротовой жидкости студентов с МБН преобладают *S. aureus*, *B. subtilis*, *K. pneumoniae*, *C. albicans*, реже встречаются *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Peptococcus spp.*

Микробиом толстой кишки студентов с АГ претерпевает изменения в сторону уменьшения встречаемости *Lactobacillus spp.* и увеличения выявляемости и количества *B. subtilis*, *Neisseria spp.*, *Actinomyces spp.*, *Peptostreptococcus spp.*

Микробиоценоз кишечника студентов с МБН характеризуется снижением количества и частоты встречаемости *Bifidobacterium spp.* и *Lactobacillus spp.* *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *P. Vulgaris*, *B. subtilis* выделяются чаще у лиц с МБН обеих групп.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 4, 8, 9, 11, 14, 15, 16
см. REFERENCES)

1. Драпкина О.М., Ширококих О.Е. Роль кишечной микробиоты в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний и метаболического синдрома. *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. 2018;14(4):567-74. DOI: 10.20996/1819-6446-2018-14-4-567-74.
2. Драпкина О. М., Кабурова А. Н. Кишечная микробиота – новый спутник на маршруте сердечно-сосудистых заболеваний: неожиданные роли старых соседей *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. 2016;12(1):66-71.
3. Червинцев В.М., Червинцев Ю.В., Серова Н.Е., Яковлева М.В., Стулов Н.М., Воеводина В.А., Беляев В.С., Смирнова Л.Е. Клинико-микробиологические особенности больных артериальной гипертензией у жителей Тверского региона. *Современные проблемы науки и образования. Медицинские науки*. 2019; 3:(14.01.00, 14.03.00)
5. Яковлева М.В., Червинцев В.М., Червинцев Ю.В., Смирнова Л.Е. Особенности микробиоты толстого кишечника у больных артериальной гипертензией с метаболическим синдромом. *Проблемы медицинской микологии*. 2019; 21(2): 155.
6. Червинцев В.М., Червинцев Ю.В., Кравчук Э.С., Ганина Е.Б. Динамика изменчивости микробиоты полости рта и толстого кишечника

юношей при перемене условий жизни. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64(8): 507-12.

7. Червинцев В.М., Червинцев Ю.В., Серова Н.Е., Стулов В.А., Воеводина В.А., Беляев В.С., Яковлева М.В. Микробиом полости рта и кишечника у больных с артериальной гипертензией. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН*. 2019; 3: 1-6.
10. Новикова Е.А., Байрова Т.А. Питание и кишечная микробиота при ожирении: региональные и этнические аспекты (обзор литературы). *Acta biomedica scientifica*. 2019; 4(1): 19-25.
12. Захарова И.Н., Бережная И.В., Дмитриева Ю.А., Ожирение и кишечная микробиота *Медицинский совет*. 2017; 19: 139-41.
13. Корниенко Е. А. Современные представления о взаимосвязи ожирения и кишечной микробиоты. *Педиатр*. 2013; IV (3):3-14.

REFERENCES

1. Drapkina O. M., Shirobara O. E. the Role of intestinal microbiota in the pathogenesis of cardiovascular diseases and metabolic syndrome. *Ratsional'naya farmakoterapiya v kardiologii*. 2018;14(4):567-74. (in Russian)
2. Drapkina O. M., Kaburova A. N. Intestinal microbiota-a new satellite on the route of cardiovascular diseases: unexpected roles of old neighbors *Ratsional'naya farmakoterapiya v kardiologii*. 2016; 12(1): 66-71. (in Russian)
3. Chervinets V. M., Chervinets Y. V., Serova N. E., Yakovleva M. V., Stulov N. M., Voevodina V. A., Belyaev V. S., Smirnova L. E. Clinical and microbiological features of patients with arterial hypertension in the Tver region. Modern problems of science and education. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya. Meditsinskie nauki*. 2019; 3:(14.01.00, 14.03.00). (in Russian)
4. Darenskaya M.A., Rychkova L.V., Gavrilova O.A., Zhdanova L.V., Bimbaev A.B.Zh, Grebenkina L.A. et al. Lipid peroxidation parameters in Mongoloid-patients with obesity and hepatosis. *Free Rad. Biol. Med*. 2018; 120(S1): S61. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.04.201.
5. Yakovleva M. V., Chervinets V. M., Chervinets Yu. V., Smirnova L. E. Features of the microbiota of the large intestine in patients with arterial hypertension with metabolic syndrome. *Problemy meditsinskoy mikologii*. 2019; 21(2): 155. (in Russian)
6. Chervinets V. M., Chervinets Yu. V., Kravchuk E. S., Ganina E. B. Dynamics of variability of microbiota of oral cavity and large intestine of young men at change of living conditions. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2019; 64(8): 507-12. (in Russian)
7. Chervinets V. M., Chervinets Y. V., Serova N. E., Stulov V. A., Voevodina V. A., Belyaev V. S., Yakovleva M. V. Microbiome of the oral cavity and intestines in patients with arterial hypertension. *Bulleten' Orenburgskogo nauchnogo tsentra Ural'skogo otdeleniya RAN*. 2019; 3: 1-6. (in Russian)
8. Zore T., Lizneva D., Brakta S., Walker W., Suturina L., Azziz R. Minimal difference in phenotype between adolescents and young adults with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2018; pii: S0015-0282(18)32142-3. doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.10.020.
9. WHO. Information Bulletin. Obesity and overweight. October 2017. Available at: <http://www.whois.com/mediacentre/factsheets/fs311/ru>.
10. Novikova E. A., Bairova T. A. Nutrition and intestinal microbiota in obesity: regional and ethnic aspects (literature review). *Acta biomedica scientifica*. 2019; 4(1): 19-25. (in Russian)
11. Li J., Zhao F., Wang Y., Chen J., Tao J., Tian G. et. al Gut microbiota dysbiosis contributes to the development of hypertension. *Microbiome*. 2017;5(1):14.
12. Zakharova I. N., Berezhnaya I. V., Dmitrieva Yu. A. Obesity and intestinal microbiota *Meditsinskiy sovet*. 2017; 19: 139-41. (in Russian)
13. Kornienko E. A. Modern ideas about the relationship between obesity and intestinal microbiota. *Pediatr*. 2013; 4 (3): 3-14. (in Russian)
14. Kalliomäki M., Collado M. C., Salminen S., Isolauri E. Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *Am. J. Clin. Nutr*. 2008; 87 (3): 534-8.
15. Santacruz A., Marcos A., Wärnberg J., Martí A., Martín-Matillas M., Campoy C. et al. Interplay Between Weight Loss and Gut Microbiota Composition in Overweight Adolescents. *Obesity. Blackwell Publishing Ltd*. 2009; 17 (10): 1906-15.
16. Collado M.C., Isolauri E., Laitinen K., Salminen S. Effect of mother's weight on infant's microbiota acquisition, composition, and activity during early infancy: a prospective follow-up study initiated in early pregnancy. *Am. J. Clin. Nutr*. 2010; 92(5): 1023-30.

Поступила 20.02.20

Принята к печати 19.06.20

ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Борисова О.Ю.¹, Гадуа Н.Т.¹, Пименова А.С.¹, Афанасьев С.С.¹, Афанасьев М.С.², Миронов А.Ю.¹, Алёшкин В.А.¹

СОСТОЯНИЕ И ПРОБЛЕМЫ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ДИФТЕРИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

¹ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия;

²ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава РФ, 119991, Москва, Россия

*Цель работы – оценка состояния бактериологической диагностики дифтерийной инфекции в России для установления возможных причин снижения выделяемости *C. diphtheriae*. Референс-центром по мониторингу за возбудителями кори, краснухи, эпидемического паротита, коклюша и дифтерии в 2018 г. в 85 субъектах России проведено анкетирование лабораторий лечебно-профилактических организаций и Центров гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, осуществляющих бактериологические исследования на дифтерийную инфекцию. Установлено, что количество проведенных исследований за пятилетний период сократилось в 1,2 раза. Тенденция уменьшения количества бактериологических исследований на дифтерию прослеживается на территориях практически всех федеральных округов. Учреждения ФБУЗ ЦГиЭ и ЛПО в 99% и 29% случаев используют в своей работе документы, регламентирующие бактериологические исследования на дифтерию. На ряде территорий в перечне используемых документов фигурируют документы, утратившие силу или не определяющие такие исследования. Большинство учреждений при обследовании на дифтерию используют сухие тампоны, однако 13,1% и 53,4% учреждений Роспотребнадзора и ЛПО (соответственно) применяют коммерческие транспортные среды, что не соответствует нормативной документации. Анализ качества работы бактериологических лабораторий показал недостатки на этапе приготовления сред первичного посева (применение донорской крови или отсутствие добавления крови и теллурита калия), пробы на токсигенность (добавление в среду лошадиной сыворотки или отсутствие сыворотки), постановка неполного биохимического ряда (отсутствие тестов на уреазу и нитратредуктазу), отсутствие контрольных типовых штаммов, неполный объем проведения внутрилабораторного контроля качества. Учитывая продолжающуюся циркуляцию возбудителя в различных странах мира и в РФ, возможность завозных случаев инфекции из эндемичных регионов, проведенный анализ направлен на привлечение внимания специалистов к проблеме улучшения качества лабораторной диагностики дифтерии в России.*

Ключевые слова: *C. diphtheriae*; бактериологическая диагностика; определение токсигенности; Российская Федерация.

Для цитирования: Борисова О.Ю., Гадуа Н.Т., Пименова А.С., Афанасьев С.С., Афанасьев М.С., Миронов А.Ю., Алёшкин В.А. Состояние и проблемы бактериологической диагностики дифтерийной инфекции в Российской Федерации. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65 (11): 717-723. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-11-717-723>

Borisova O.Yu.¹, Gadua N.T.¹, Pimenova A.S.¹, Afanasiev S.S.¹, Afanasiev M.S.², Mironov A.Yu.¹, Aleshkin V.A.¹

STATUS AND PROBLEMS OF BACTERIOLOGICAL DIAGNOSIS OF DIPHTHERIA INFECTION IN THE RUSSIAN FEDERATION

¹G. N. Gabrichevsky Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 125212, Moscow, Russian Federation;

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, 119991, Moscow, Russian Federation

*The purpose of the work was to assess the state of bacteriological diagnosis of diphtheria infection in Russia in order to establish possible reasons for the decrease in the release of *C. diphtheriae*. The Reference Center for Monitoring the Pathogens of Measles, Rubella, Mumps, Pertussis and Diphtheria in 2018 in 85 subjects of Russia conducted a questionnaire of laboratories of medical organizations and the Centers for Hygiene and Epidemiology of Rosпотребнадзор, carrying out bacteriological studies for diphtheria infection. It was found that the number of studies conducted over the five-year period decreased by 1.2 times. The tendency to decrease the number of bacteriological studies for diphtheria is observed in the territories of almost all federal districts. In 99% and 29% of cases, the institutions of the FBUZ Centers for Hygiene and Epidemiology and medical organizations (MO) and use in their work documents regulating bacteriological studies for diphtheria infection. In a number of territories, the list of documents used includes documents that are invalid or do not define such studies. Most organizations use dry tampons when examining for diphtheria, however, 13.1% and 53.4% of FBUZ Centers for Hygiene and Epidemiology and medical organizations (respectively) use commercial transport environments, which does not comply with regulatory documentation. Analysis of the quality of work of bacteriological laboratories showed shortcomings at the stage of preparation of media (use of donor blood, or absence of addition of blood and potassium tellurite), Elek tests (addition of horse serum or absence of serum to the medium), setting of incomplete biochemical series (absence of tests for urease and nitrate reductase), absence of standard control strains, incomplete volume of internal laboratory quality control. Given the continuing circulation of the pathogen in various countries of the world and in our country, as well as the possibility of imported cases of infection*

Для корреспонденции: Борисова Ольга Юрьевна, д-р мед. наук, проф., рук. лаб. диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций, e-mail: olgaborisova@mail.ru

from endemic regions, the analysis was aimed at drawing the attention of specialists to the problem of improving the quality of laboratory diagnosis of diphtheria in Russia.

Key words: *C. diphtheriae; bacteriological diagnosis; detection of toxigenicity; Russian Federation.*

For citation: Borisova O.Yu., Gadua N.T., Pimenova A.S., Afanasiev S.S., Afanasiev M.S., Mironov A.Yu., Aleshkin V.A. Status and problems of bacteriological diagnosis of diphtheria infection in the Russian Federation. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65 (11): 717-723 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-11-717-723>

Information about authors:

Borisova O.Yu., <https://orcid.org/0000-0001-6316-5046>;
Gadua N.T., <https://orcid.org/0000-0001-6247-6176>;
Pimenova A.S., <https://orcid.org/0000-0002-6914-3531>;
Afanasiev S.S., <https://orcid.org/0000-0001-6497-1795>;
Afanasiev M.S., <https://orcid.org/0000-0002-5860-4152>;
Mironov A.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-8544-5230>;
Aleshkin V.A., <https://orcid.org/0000-0002-2701-431X>.

For correspondence: Borisova O.Yu., doctor of medicine (MD), professor, head of laboratory of diagnostic of diphtheria and pertussis infections' e-mail: olgborisova@mail.ru

Acknowledgment. *The study had no sponsorship.*

Conflict of interest. *The authors declare no conflict of interest.*

Received 03.09.2020
Accepted 07.09.2020

Введение. Несмотря на успехи вакцинопрофилактики, дифтерия по-прежнему является серьёзной проблемой общественного здравоохранения и причиной детской смертности в странах с недостаточным уровнем охвата населения профилактическими прививками [1]. По данным ВОЗ и CDC в Индии, Индонезии, Пакистане, Иране, Непале, Гане, Бразилии, Гаити, Доминиканской Республике дифтерия по сей день остается эндемичным заболеванием, течение которого характеризуется многообразием клинических форм и различной локализацией. В течение последних пяти лет регистрируются локальные вспышки в Таиланде, Лаосе, странах Африки [1, 2, 3]. Наряду с этим в странах Европы стали появляться сообщения о случаях заболевания дифтерией среди мигрантов и туристов, посетивших эндемичные по этой инфекции территории [1].

Широкая иммунизация детей АКДС-вакциной против дифтерии в России начала проводиться с 1959 года. Достиженные результаты подтвердили значимость массовой специфической иммунопрофилактики среди населения для поддержания в стране санитарно-эпидемиологического благополучия по этой инфекции [4]. В России в течение последних 30 лет были отмечены два периода усиления эпидемического процесса [4 – 7], последний из которых был зарегистрирован в 90-е годы [4, 5]. В настоящее время в условиях поддержания высокого уровня привитости (95% и более) достигнута стабилизация заболеваемости, регистрируются единичные случаи заболевания и бактерионосительства, в структуре клинических форм преобладают лёгкие локализованные формы дифтерии [6-10].

Актуальность проблемы дифтерийной инфекции в условиях единичных случаев заболеваний сохраняется по сей день [6-10]. Во-первых, утрачивается опыт клинического и бактериологического распознавания дифтерии. Во-вторых, сохраняется резервуар возбудителя в форме бактерионосительства. В-третьих, эпидемический процесс протекает среди привитого населения. При этом продолжают регистрировать случаи заболеваний как среди непривитых детей, так и среди взрослых (на данный момент около 3-х млн человек не привиты

против дифтерии) [10]. В условиях спорадической заболеваемости главная роль в распространении инфекции отводится бактерионосителям токсигенных коринебактерий, поскольку они являются резервуаром возбудителя и поддерживают его существование как биологического вида.

Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции на территории РФ осуществляется с помощью культурального метода, который считается «золотым стандартом», и порядок проведения которого строго регламентирован действующими нормативными и методическими документами – санитарно-эпидемиологическими правилами СП 3.1.2.3109-13 «Профилактика дифтерии» и методическими указаниями МУК 4.2.3065-13 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции».

Система бактериологической диагностики дифтерии в РФ создавалась и разрабатывалась на протяжении десятилетий несколькими поколениями микробиологов, среди которых ведущая роль принадлежит сотрудникам Московского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского. Основной задачей является идентификация возбудителя дифтерии в максимально сжатые сроки (3-4 дня от начала исследования) с помощью минимального количества диагностических тестов. Культуральный метод диагностики дифтерии является эффективным и наиболее точным. При выделении из биологического материала возбудителя заболевания изучаются его токсигенные и биохимические свойства с целью определения у него способности к продукции дифтерийного токсина и биовара. Продолжительность исследования составляет от трёх до пяти рабочих дней (МУК 4.2.3065-13 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции»). Эффективность любого исследования определяется не только качеством проводимых бактериологических тестов, но и напрямую зависит от правильности взятия биологического материала у обследуемого и соблюдения условий доставки его в лабораторию, что составляет преаналитический этап [11].

В Российской Федерации в течение более 20 лет проводится эпидемиологический надзор за дифтерийной инфекцией [12], который в настоящее время регламен-

тирован действующими методическими указаниями МУ 3.1.3018-12 «Эпидемиологический надзор за дифтерийной инфекцией». В рамках эпидемиологического надзора осуществляется микробиологический мониторинг возбудителя, включающий слежение за выделяемостью токсигенных и нетоксигенных штаммов, и наблюдение за их биологическими свойствами. Результаты проведения эпидемиологического надзора за дифтерийной инфекцией ежегодно публикуются в виде информационно-методических материалов, включающих данные о заболеваемости дифтерией, уровне напряжённости антитоксического иммунитета, биологических свойствах циркулирующих штаммов [8 – 10]. Согласно проведённым исследованиям [8 – 10], отмечается тенденция к снижению выделяемости не только токсигенных, но и нетоксигенных *Corynebacterium diphtheriae* (*C. diphtheriae*), что может свидетельствовать о возможных нарушениях на всех этапах проведения лабораторной диагностики дифтерийной инфекции.

Цель работы – оценка состояния лабораторной диагностики дифтерийной инфекции в России для установления возможных причин снижения выделяемости *C. diphtheriae*.

Материал и методы. В соответствии с приказом Роспотребнадзора от 01.12.2017 г. № 1116 «О совершенствовании системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации» Референс-центром по мониторингу за возбудителями кори, краснухи, эпидемического паротита, коклюша и дифтерии, действующим на базе ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского, в период с июля по сентябрь 2018 г. в 85 субъектах РФ проведено анкетирование клинично-диагностических лабораторий лечебно-профилактических организаций (ЛПО) и Центров гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора (ЦГиЭ), осуществляющих бактериологические исследования на дифтерию. Анкетирование проведено с целью проведения заседания проблемной комиссии Учёного совета Роспотребнадзора «Профилактика инфекций, управляемых средствами вакцинопрофилактики» и оценки состояния бактериологической диагностики дифтерийной инфекции в РФ. В работе использовали методы описательной статистики.

Результаты и обсуждение. Анализ состояния бактериологической диагностики дифтерийной инфекции проведён по трём направлениям – анализ количества обследуемых на дифтерию лиц; качество проведения преаналитического этапа в медицинских организациях; качество проведения бактериологического исследования в лабораториях.

Обследование на дифтерию на территории РФ, согласно СП 3.1.2.3109-13 «Профилактика дифтерии», проводится с диагностической целью, по эпидемиологическим показаниям, с профилактической целью. В ходе анализа установлено, что на территории России в 2013-2017 гг. всего проведено 16 014 252 бактериологических исследований. Количество проведённых исследований за 5-летний период к 2017 г. сократилось в 1,2 раза (рис. 1).

Количество проведённых исследований в ЛПО сохранялось практически на одинаковом уровне, в то время как в учреждениях Роспотребнадзора их число уменьшилось в 1,8 раза (рис. 2).

Большинство (30% и 19%) бактериологических исследований проведено на территории

Центрального (ЦФО) и Сибирского (СФО) федеральных округов соответственно, 8-14% на территориях Приволжского (ПФО), Северо-Западного (СЗФО), Южного (ЮФО) федеральных округов, 5-6% на территориях Уральского (УФО), Северо-Кавказского (СКФО), Дальневосточного (ДВФО) федеральных округов. На территориях всех федеральных округов прослеживалась тенденция уменьшения количества бактериологических исследований на дифтерию (рис. 3).

Анализ тенденции количества обследуемых лиц показал, что на 15,5% территорий количество обследуемых лиц увеличивалось, на 15,5% – не изменялось, на 69% территорий отмечалось уменьшение количества обследуемых на дифтерию лиц. Снижение количества обследуемых лиц по федеральным округам регистрировалось на 30,8% территорий в ЦФО, 33,3% – в СЗФО, 83,3% – в ЮФО, 80% – в СКФО, 55,6% – в ПФО, 75% – в УФО, 77,8% – в СФО, 100% – в ДВФО.

Согласно действующим СП 3.1.2.3109-13 «Профилактика дифтерии» и МУК 4.2.3065-13 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции», от одного человека при обследовании на дифтерию должно быть взято два анализа. На отдельных территориях это соотношение нарушено – или в сторону увеличения числа анализов (18 территорий), что должно быть аргументировано, так как может свидетельствовать о другой локализации патологического процесса и необходимости взятия дополнительного анализа, или наоборот – взят один анализ от одного человека (42 территории), что является серьёзным нарушением действующих нормативных документов.

Всего за анализируемый период на территории страны выделено 7002 культур *C. diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans* (*C. ulcerans*), *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*C. pseudotuberculosis*). Из них 95 токсигенных (из них 21 штамм *C. diphtheriae*) и 6907 – нетоксигенных штаммов (из них 2294 штаммов *C. diphtheriae*) (рис. 4).

При обследовании по различным показаниям большинство (93,7%) выделенных культур принадлежали к *Corynebacterium spp.* (см. таблицу).

На втором месте по количеству выделенных культур с диагностической целью и по эпидпоказаниям были штаммы *C. pseudotuberculosis* (4,03% и 8,9% соответственно), с профилактической целью – *C. diphtheriae* (3,7%). С диагностической целью на

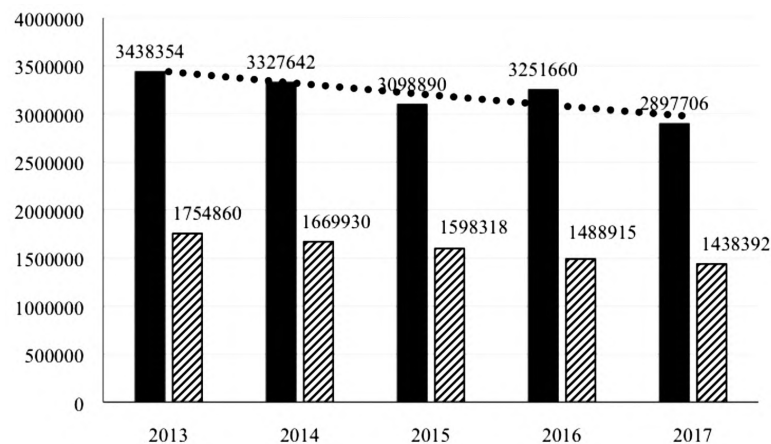


Рис. 1. Количество проведённых бактериологических исследований и обследованных на дифтерийную инфекцию лиц в РФ.

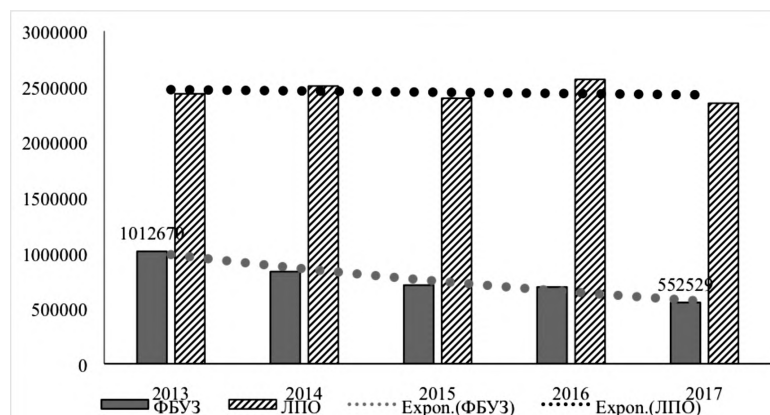


Рис. 2. Количество проведённых анализов на дифтерийную инфекцию в лабораториях ЛПО и ФБУЗ ЦГиЭ.

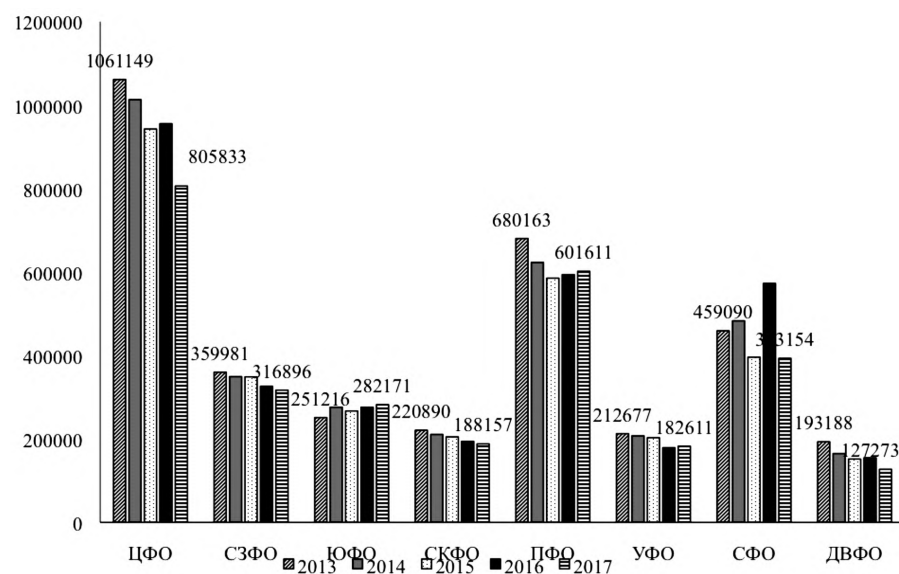


Рис. 3. Количество проведённых анализов на дифтерийную инфекцию в лабораториях федеральных округов.

третьем месте по частоте выделения были штаммы *S. diphtheriae* (1,7%) и с профилактической целью – *S. pseudotuberculosis* (3,1%), по эпидпоказаниям – *S. ulcerans* (5,2%). По данным верификации присланных в Референс-центр штаммов коринебактерий в 2018-2020 гг., все штаммы *S. pseudotuberculosis* идентифицированы как *S. ulcerans*.

Проведение бактериологических исследований на дифтерию регламентируется СП 3.1.2.3109-13 «Профилактика дифтерии» и МУК 4.2.3065-13 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции». На одной из территорий в ФБУЗ ЦГиЭ использовались нерегламентированные нормативные документы, в ЛПО на 28,5% территорий – регламентированные документы. На 71,5% территорий информации о том, какой нормативной и методической документацией руководствовались в своей работе, не предоставлено. Среди перечисленных документов, которые использовали в своей работе лаборатории ФБУЗ ЦГиЭ, на 10 территориях в списке были документы, которые утратили силу (МУК 4.2.698-98, Приказ № 36 от 03.02.1997 г.), и на 10 территориях – документы, которые не регламентируют проведение исследований на дифтерию (Приказ № 535 от 22.04.1985 г.,

МР 28-6/31, Клинические рекомендации 2014 г.). В документах, предоставленных из лабораторий ЛПО, среди перечисленных нормативных документов, в лабораториях на 2-х территориях в списке были устаревшие документы (МУК 4.2.698-98, Приказ № 36 от 03.02.1997 г., Приказ № 450 от 02.04.1986 г.), на 11 территориях – документы, которые не регламентируют проведение исследований на дифтерию (Приказ № 535 от 22.04.1985 г., Приказ № 575 от 11.1982 г., Приказ № 585 от 1985 г., Письмо № 203-н от 10.05.2017 г., МР 4.2.0020-2011, Руководство ВОЗ 1995 г.).

Следующий этап анализа посвящён оценке правильности проведения преаналитического этапа исследования, включающего взятие и транспортировку биологического материала, которые осуществляются в медицинских организациях. Согласно СП 3.1.2.3109-13 «Профилактика дифтерии» и МУК 4.2.3065-13 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции», взятие биологического материала производится двумя сухими коммерческими или лабораторно-приготовленными тампонами с доставкой в течение 3 часов. Для взятия биологического материала во второй половине дня допускается помещение биологического материала в лабораторно-приготовленные транспортные среды и не допускается использование коммерческих транспортных агаризованных сред, предназначенных для взятия материала на микрофлору.

Анализ присланных документов показал, что на 45,2% территорий в лабораториях ФБУЗ ЦГиЭ взятие материала осуществлялось в первой половине дня, на 1,2% – во второй половине дня, в 53,6% случаях – в течение всего дня; на 29,8% территорий использованы лабораторно-приготовленные тампоны, на 32,1% – коммерческие, на 38,1% – комбинированный вариант (коммерческие и лабораторно-приготовленные тампоны). На 81% территорий в лабораториях ФБУЗ ЦГиЭ не использовались транспортные среды, 5,9% территорий – регламентированные лабораторно-приготовленные транспортные среды, 13,1% (11 территорий) применяли коммерческие транспортные среды, что противоречит действующим нормативным документам. После проведения сравнительных экспериментальных исследований, нами внесены коррективы в раздел использования транспортных сред и прописано, что допускается использование коммерческих только жидких транспортных сред с помещением в определённые условия хранения. Взятие в первой половине дня предполагает, что материал будет доставлен в лабораторию в течение рабочего дня (интервал 3 час), и, по представленным материалам, на 89,5% территорий, где взятие осуществлялось только в первой половине дня, забор биологического материала осуществлялся на сухих тампонах и на 2,6% территорий – на сухих тампонах и в лабораторно-приготовленные транспортные среды. Вызывает вопрос почему на 7,9% территорий для забора материала в пер-

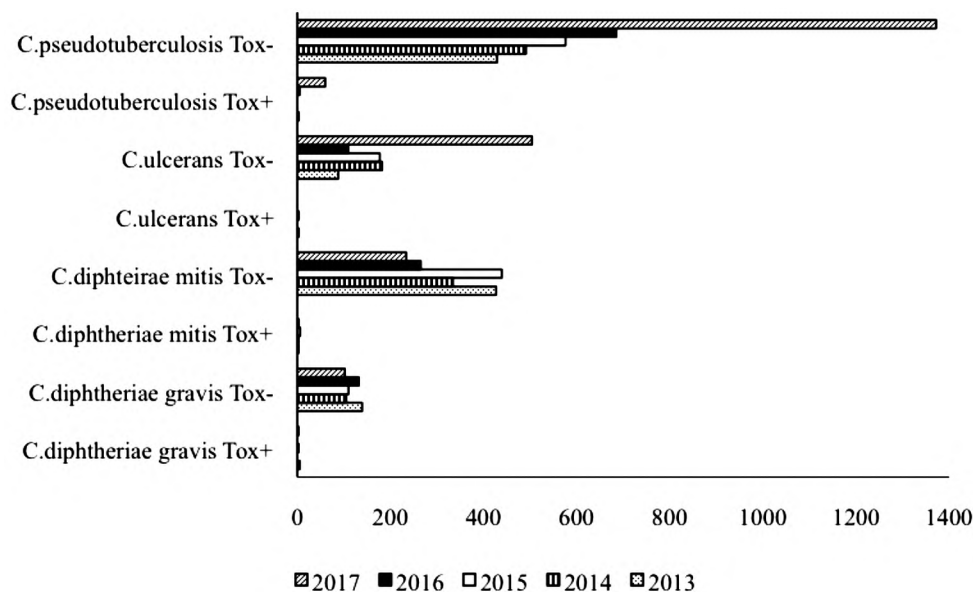


Рис. 4. Количество выделенных токсигенных и нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae*, *C. ulcerans*, *C. pseudotuberculosis*.

Количество выделенных культур при обследовании на дифтерийную инфекцию

| Годы | Выделение культур | | | | | | | | | | | |
|-------|-----------------------|------|----|--------------------|-----|----|------------------------------|-----|-----|-----------------------------|-------|------|
| | <i>C. diphtheriae</i> | | | <i>C. ulcerans</i> | | | <i>C. pseudotuberculosis</i> | | | <i>Corynebacterium spp.</i> | | |
| | ДЦ | ПЦ | ЭП | ДЦ | ПЦ | ЭП | ДЦ | ПЦ | ЭП | ДЦ | ПЦ | ЭП |
| 2013 | 233 | 334 | 6 | 56 | 29 | 6 | 365 | 62 | 5 | 10049 | 5170 | 198 |
| 2014 | 235 | 195 | 11 | 149 | 26 | 7 | 390 | 97 | 4 | 11327 | 6270 | 251 |
| 2015 | 309 | 247 | 0 | 152 | 26 | 2 | 405 | 169 | 2 | 11773 | 5074 | 108 |
| 2016 | 182 | 219 | 3 | 78 | 28 | 3 | 536 | 152 | 2 | 12313 | 5899 | 323 |
| 2017 | 167 | 172 | 2 | 152 | 299 | 53 | 843 | 481 | 108 | 13256 | 6021 | 263 |
| Всего | 1126 | 1167 | 22 | 587 | 408 | 71 | 2539 | 961 | 121 | 58718 | 28434 | 1143 |

Примечание. ДЦ – диагностическая цель, ПЦ – профилактическая цель, ЭП – эпидемиологические показания.

вой половине дня применяли сухие тампоны и коммерческие транспортные среды (рис. 5,а). Из территорий, где осуществлялось взятие материала в течение всего дня (рис. 5,б), на 70,4% территорий материал забирался сухими тампонами, на 11,4% на сухих тампонах и в лабораторно-приготовленные транспортные среды и на 18,2% (8 территорий) применяли сухие тампоны и коммерческие транспортные среды, однако последний факт противоречит нормативной документации.

По ЛПО предоставлена неполная информация, так как 54 территории (64,3%) не предоставили информацию об этапе взятия материала на дифтерию. Из 30 ЛПО, представивших информацию, на 16,7% территорий использовались лабораторно-приготовленные сухие тампоны, на 33,3% – коммерческие сухие тампоны, на 50% территорий – комбинация тампонов; на 43,3% территорий транспортные среды не применялись, на 1 территории (3,3%) использовали регламентированную лабораторно-приготовленную транспортную среду, на 53,4% (16 территорий) – коммерческие транспортные среды, что противоречит действующей нормативной документации. В ЛПО 23,8% территорий обследование на дифтерию проводили весь день, на 11,9% – только в первой половине (рис. 6, а,б). Обследование в первой половине дня сухими тампонами проводили 50% ЛПО, 50%

ЛПО – с помощью сухих тампонов и в коммерческие транспортные среды (рис. 6,а). В ЛПО 45% территорий, которые проводили обследование весь день, биологический материал забирали сухими тампонами, однако в ЛПО на 55% (11) территорий взятие материала весь день осуществляли как сухими тампонами, так и в коммерческие транспортные среды (рис. 6,б), что противоречит действующей нормативной документации.

Следующий этап анализа включал оценку качества работы бактериологических лабораторий. В лабораториях ФБУЗ ЦГиЭ на 17,8% территорий использовались лабораторно-приготовленные питательные среды для первичного посева, 46,4% – только коммерческие, 35,8% – комбинацию сред (лабораторно-приготовленные и коммерческие). В лабораторно-приготовленные среды первичного посева – кровяно-теллуриновые – обязательным является добавление крови. 15,5% лабораторий используют коммерческую кровь, 39,3% – не добавляют кровь, 45,2% лабораторий применяют препараты крови или донорскую кровь (в т. ч. с истекшим сроком годности), последний факт противоречит Федеральному закону № 125 статья 16 «О донорстве крови и её компонентов». Применение Коринебакагара (КБА) не предполагает использование крови, так как содержит необходимый набор факторов роста, исключающих её добавление. Кровь не добавляют в КБА

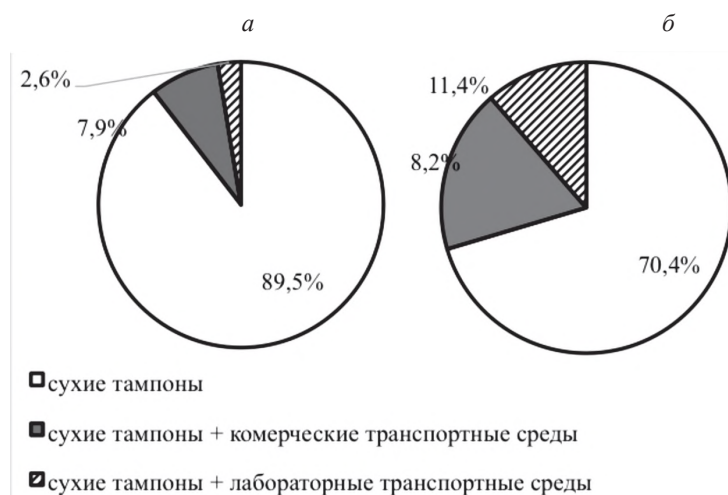


Рис. 5. Виды материалов, используемых для взятия биологического материала на дифтерийную инфекцию в ФБУЗ ЦГиЭ в первой (а) половине дня и в течение всего дня (б).

– 28,6% лабораторий, 19% лабораторий её применяют в качестве добавки, 35,7% лабораторий – в сочетании КБА + лабораторно-приготовленные среды + кровь, что провоцирует вопрос о результатах проведения внутрилабораторного контроля качества сред первичного посева в этих лабораториях и тех аргументах, которые служат основой для внесения крови в среду, которая не предполагает её использование. Три лаборатории (3,6%), по присланным документам, не добавляют кровь в лабораторно-приготовленные среды, что полностью противоречит рецепту приготовления кровяно-теллуритовых сред первичного посева. На 4 территориях (4,8%) в лабораториях не добавляют в среды первичного посева теллурит калия, что является обязательным этапом при их приготовлении, так как этот реактив придает колониям характерные культуральные свойства (окраска колоний в серо-чёрный цвет).

По материалам, предоставленным из лабораторий ЛПО, 2,4% территорий используют лабораторно-приготовленные питательные среды для первичного посева, 9,5% – только коммерческие, 21,4% – комбинацию сред, на 56 (66,7%) территориях информация о используемых пита-

тельных средах отсутствует. В лабораторно-приготовленные среды первичного посева (кровяно-теллуритовые) обязательным является добавление крови. 3,7% лабораторий используют коммерческую кровь, 25,9% – не добавляют кровь, 70,4% территорий применяют препараты крови или донорскую кровь (в т. ч. с истекшим сроком годности). Кровь не добавляют в КБА – 41,7% территорий, 27,8% территорий её используют, 27,8% территорий – в сочетании КБА + лабораторно-приготовленные среды + кровь, что провоцирует вопрос о результатах проведения внутрилабораторного контроля качества. На одной территории, согласно присланным документам, не добавляют кровь в лабораторно-приготовленные среды, что полностью противоречит технологии приготовления кровяно-теллуритовых сред первичного посева.

Основной задачей бактериологической диагностики дифтерийной инфекции является выявление токсигенности (продукции дифтерийного токсина) у возбудителя, которая проводится в реакции преципитации в агаре с дифтерийным антитоксином. Для постановки пробы на токсигенность в лабораториях ФБУЗ ЦГиЭ 90,5% территорий используют коринетоксагар, 22,6% – ОТДМ. В среду на токсигенность регламентировано добавление сыворотки крупного рогатого скота. Её используют 79,8% лабораторий, 25% лабораторий – добавляют лошадиную сыворотку, что противоречит МУК 4.2.3065-13 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции». 4 лаборатории вообще не добавляли сыворотку в среду на токсигенность, что вызывает сомнения в качестве постановки пробы на токсигенность. Информация о постановке пробы на токсигенность, которую проводят в лабораториях ЛПО, отсутствует с 59 территорий РФ. По информации, предоставленной из лабораторий 30 учреждений ЛПО, для постановки пробы на токсигенность 54% лабораторий используют коринетоксагар, 13% – ОТДМ, 1% – импортную среду; 36% лабораторий применяют сыворотку крупного рогатого скота, в 20% лабораторий в среду добавляют лошадиную сыворотку, что является нарушением нормативной документации. 12% учреждений вообще не добавляют сыворотку в среду на токсигенность, в 1 лаборатории для постановки пробы на токсигенность используют КБА, в 1 лаборатории – среду Пизу. Данные факты могут свидетельствовать о нарушении правил постановки пробы на токсигенность.

Важной составляющей работы каждой лаборатории является проведение внутрилабораторного контроля качества, который осуществляется с помощью контрольных типовых штаммов, регламентированных действующими нормативными документами. 83% лабораторий ФБУЗ ЦГиЭ имеют необходимый набор контрольных штаммов, в 17% лабораторий – набор штаммов не соответствует нормативной документации; в ЛПО (из представленной информации 30-ти учреждений) – 8% лабораторий имеют необходимый набор штаммов, 42% – не соответствуют требованиям.

Внутрилабораторный контроль качества при проведении бактериологических исследований должен осуществляться на всех этапах, включая контроль сред первичного посева, постановку пробы на токсигенность, биохимическую идентификацию. Контроль качества сред первичного посева с регламентированным набором контрольных штаммов проводят только 55% лабораторий, постановку про-

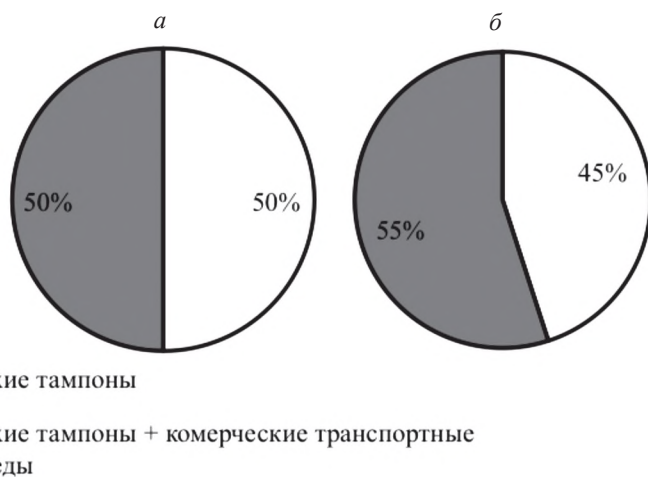


Рис. 6. Виды материалов, используемых для взятия биологического материала на дифтерийную инфекцию в ЛПО в первой половине дня (а) и в течение всего дня (б).

бы Пизу – 44% лабораторий, пробу на токсигенность – только 54% лабораторий.

Биохимическая идентификация возбудителя дифтерии осуществляется путём обязательного определения сахаролитической (ферментация глюкозы, сахарозы и крахмала) и уреазной активности, при положительном результате последнего теста проводится определение нитратредуктазной активности. Вместе с тем, 13% лабораторий не определяли уреазную и 25% лабораторий – нитратредуктажную активности.

В рамках последипломного образования и с целью поддержания квалификации необходимым условием работы специалистов, проводящих бактериологические исследования на дифтерийную инфекцию, является прохождение повышения квалификации, которое осуществляется по соответствующей специальности и в виде периодического тематического усовершенствования каждые три года (МУК 4.2.3065-13 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции»). Согласно приложенным документам, специалисты 58% лабораторий ФБУЗ ЦГиЭ и только специалисты 14% лабораторий ЛПО проходили тематическое усовершенствование по лабораторной диагностике дифтерийной инфекции, что может свидетельствовать о возможной утрате практических навыков при проведении данных исследований.

Заключение. Проведенный анализ состояния лабораторной диагностики дифтерийной инфекции выявил проблемы на всех этапах его осуществления – снижение количества обследованных лиц и анализов на дифтерию, нарушения на этапе взятия биологического материала, в работе бактериологических лабораторий, что в целом может отражаться на снижении выделяемости штаммов *C. diphtheriae*. Несмотря на благополучную эпидемиологическую обстановку, возбудитель дифтерии продолжает циркулировать на территории РФ, существует скрытое бактерионосительство, в связи с увеличением транспортных связей имеется возможность завозных случаев инфекции из эндемичных регионов. Всё это свидетельствует о необходимости усиления внимания к лабораторной диагностике дифтерии для поддержания её на высоком уровне. Полученные результаты послужили основанием для пересмотра действующей нормативной документации по лабораторной диагностике дифтерийной инфекции.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-3 см. REFERENCES)

1. Маркина С. С., Тымчаковская И. М., Максимова Н. М., Сухорукова Н. Л. Эпидемический процесс дифтерийной инфекции в РСФСР в условиях внедрения эпидемиологического надзора. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 1989; 5: 38-40.
2. Маркина С. С., Максимова Н. М., Котова Е. А., Жилина Н. Я. Заболеваемость дифтерией в России в 1993-1995 гг. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 1997; 4: 8-10.
3. Максимова Н. М., Маркина С. С., Яцковский К. А., Черкасова В. В., Корженкова М. П., Сафронова А. В. и др. Дифтерия в России в 2005-2009 годах. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2010; 3: 31-6.
4. Якимова Т. Н., Маркина С. С., Максимова Н. М. Дифтерия сегодня. *Здоровье населения и среда обитания*. 2013; 12: 18-9.
5. О заболеваемости дифтерией, мониторинге за возбудителем и состоянием антитоксического противодифтерийного иммунитета населения России. *Информационное письмо № 01/13216-17-27 от*

6. 29.09.2017 г. *Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор)*.
7. О заболеваемости дифтерией, мониторинге за возбудителем и состоянием антитоксического противодифтерийного иммунитета населения России. *Информационное письмо № 01/16590-2018-27 от 19.12.2018 г. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор)*.
8. О заболеваемости дифтерией и состоянии антитоксического противодифтерийного иммунитета населения России. *Информационное письмо № 02/14390-2019-27 от 10.10.2019 г. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор)*.
9. Национальный стандарт Российской Федерации. Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа. *Лабораторная служба*. 2013;(2): 19-63.
10. Фаворова Л.А., Сухорукова Н.Л., Иванова Л.М. Об эпидемиологическом надзоре. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 1981; 8: 8-13.

REFERENCES

1. World Health Organization. Who vaccine-preventable diseases: *Monitoring system 2020 global summary*. https://apps.who.int/immunization_monitoring/globalsummary (дата обращения: 18.07.2020).
2. Centers for Disease Control and Prevention. Diphtheria [Электронный ресурс] // *Manual for the surveillance of vaccine-preventable diseases*. – Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention. – Chap. 1. – URL: <https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/surv-manual/chpt01-dip.pdf> (дата обращения: 18.07.2020).
3. Centers for Disease Control and Prevention. Diphtheria [Электронный ресурс] // *Yellow Book 2020: health information for international travel*. – New York: Oxford University Press, 2020. – Chap. 4. – URL: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2020/travel-related-infectious-diseases/diphtheria> (дата обращения: 18.07.2020).
4. Markina C. S., Tymchakovskaya I. M., Maximova N. M., Sukhorukova N. L. Epidemic process of diphtheria infection in the RSFSR in the context of the introduction of epidemiological supervision. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 1989; 5: 38-40. (in Russian)
5. Markina S. S., Maximova N. M., Kotova E. A., Zhilina N. Ya. The incidence of diphtheria in Russia in 1993-1995. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni*. 1997; 4: 8-10. (in Russian)
6. Maksimova N. M., Markina S. S., Yatskovsky K. A., Cherkasova V. V., Korzhenkova M. P., Safronova A. V. and others. Diphtheria in Russia in 2005-2009. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika*. 2010; 3: 31-6. (in Russian)
7. Yakimova T. N., Markina S. S., Maximova N. M. Diphtheria today. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya*. 2013; 12: 18-9. (in Russian)
8. On the incidence of diphtheria, monitoring the causative agent and the state of antitoxic antidiphtheria immunity of the Russian population. *Information letter № 01/13216-17-27 от 29.09.2017 Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rosпотребнадзор)*. (in Russian)
9. On the incidence of diphtheria, monitoring the causative agent and the state of antitoxic antidiphtheria immunity of the Russian population. *Information letter № 01/16590-2018-27 от 19.12.2018 Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rosпотребнадзор)*. (in Russian)
10. On the incidence of diphtheria and the state of antitoxic antidiphtheria immunity of the Russian population. *Information letter № 02/14390-2019-27 от 10.10.2019 Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rosпотребнадзор)*. (in Russian)
11. National standard of the Russian Federation. Laboratory clinical technologies. Quality assurance of clinical laboratory studies. Part 4. Rules for conducting the preanalytic stage. *Laboratornaya sluzhba*. 2013; (2): 19-63. (in Russian)
12. Favorova L. A., Sukhorukova N. L., Ivanova L. M. On epidemiological supervision. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 1981; 8: 8-13. (in Russian)

Поступила 03.09.20

Принята к печати 07.09.20

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Лубова В.А.¹, Леонова Г.Н.¹, Шутикова А.Л.¹, Бондаренко Е.И.²

ИНДИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ КУ-ЛИХОРАДКИ НА ЮГЕ ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г. П. Сомова» Министерства высшего образования и науки РФ, 690087, Владивосток, Россия;

²АО «Вектор-Бест», 630559, п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

Ку-лихорадка (коксиеллёз) – широко распространенное в мире природно-очаговое заболевание. Возбудитель коксиеллёза – грамотрицательная бактерия Coxiella burnetii, отличающаяся высокой контагиозностью и низкой вирулентностью. Основными переносчиками C. burnetii являются иксодовые клещи, которые в антропоургических очагах питаются на домашних и сельскохозяйственных животных.

Для решения вопроса о возможной циркуляции C. burnetii на территории Приморского края исследовано 334 образца разнообразного природного материала, собранного в весенне-летний период 2019 г. В окрестностях Владивостокского городского округа (на о. Рейнеке) генетические маркеры C. burnetii выявлены в 19,7% у всех видов клещей. В Ханкайском районе ДНК коксиелл чаще (в 6,3%) выявляли в клещах D. silvarum, в клещах I. persulcatus и H. japonica обнаружено по 1 случаю. Из 56 экз. иксодовых клещей, присосавшихся к людям, ДНК C. burnetii выявлена в клещах I. persulcatus в 38,8%, H. concinna – в 14,3%. В сыворотках крови сельскохозяйственных животных детектировано наличие коксиелл у овец в 3-х образцах, у лошадей – в двух. Секвенирование полученных последовательностей показало в сыворотках крови животных наличие C. burnetii. В клещах, присосавшихся к людям, в 6 образцах идентифицированы C. burnetii, в 6 образцах – Coxiella-like endosymbiont. Представленные результаты свидетельствуют о циркуляции C. burnetii на территории Приморского края. Для получения более полной характеристики сложившейся эпидемиологической ситуации необходимо провести более широкие исследования природного материала и крови людей с подозрением на Ку-лихорадку.

Ключевые слова: *Coxiella burnetii; Coxiella-like endosymbiont; Ку-лихорадка; ПЦР-РВ; диагностика; Приморский край.*

Для цитирования: Лубова В.А., Леонова Г.Н., Шутикова А.Л., Бондаренко Е.И. Индикация возбудителя Ку-лихорадки на юге Дальнего востока. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65 (11): 724-728.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-724-728>

Lubova V. A.¹, Leonova G. N.¹, Shutikova A. L.¹, Bondarenko E. I.²

INDICATION Q FEVER PATHOGEN IN THE SOUTH OF FAR EAST

¹Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, 690087, Vladivostok, Russia;

²АО «Vector-Best», 630559, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

Q fever (coxiellosis) is a widespread natural focal disease in the world. The causative agent of coxiellosis is the gram-negative bacterium Coxiella burnetii, which is highly contagious and low virulence. The main carriers of C. burnetii are ixodid ticks, which feed on domestic and farm animals in anthropurgic foci. To address the possible circulation of the Q fever pathogen in the territory of the Primorsky Territory, 334 samples of various natural material collected in the spring-summer period of 2019 were studied. In the vicinity of the Vladivostok (on Reineke island), genetic markers of C. burnetii were detected in 19.7% of all tick species. In the Khankaish region, coxiella DNA was detected more often (in 6.3%) in ticks of D. silvarum, in ticks of I. persulcatus and H. japonica, 1 case was detected. From 56 copies. ixodid ticks sucked to humans, C. burnetii DNA was detected in ticks of I. persulcatus in 38.8%, H. concinna – in 14.3%. In the serum of farm animals, the presence of coxiella in sheep in 3 samples was detected, in horses – in two. Sequencing of the obtained sequences showed the presence of the pathogen C. burnetii in the blood serum of animals. The ticks have stuck to people in 6 samples were identified C. burnetii and 6 samples – Coxiella-like endosymbiont. The presented results indicate the circulation of the causative agent of Q fever in the territory of the Primorsky Territory. To obtain a more complete description of the current epidemiological situation, it is necessary to conduct more extensive studies of natural material and blood of people with suspected Q fever.

Key words: *Coxiella burnetii; Coxiella-like endosymbiont; Q fever; PCR-RV; diagnostics; Primorsky Territory.*

For citation: Lubova V.A., Leonova G.N., Shutikova A.L., Bondarenko E.I. Indication Q fever pathogen in the south of Far east. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65 (11): 724-728 (in Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-724-728>

For correspondence: *Lubova V.A.*, junior researcher of natural-focal transmissible infections laboratory; e-mail: valeri_priority@mail.ru

Information about authors:

Lubova V.A., ORCID: <https://0000-0002-4290-6164>;

Shutikova A.L., ORCID: <https://0000-0002-6803-0439>;

Leonova G.N., ORCID: <https://0000-0001-5387-1127>;

Bondarenko E.I. ORCID: <https://0000-0002-4699-9548>.

Conflict of interests. *The authors declare absence of conflict of interests.*

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 08.05.2020

Accepted 19.06.2020

Для корреспонденции: Лубова Валерия Александровна, мл. науч. сотр. лаб. природно-очаговых трансмиссивных инфекций; e-mail: valeri_priority@mail.ru

Возбудитель коксииеллёза – грамотрицательная бактерия *Coxiella burnetii* с внутриклеточным механизмом жизнедеятельности, отличающаяся низкой вирулентностью, но высокой контагиозностью (при аэрогенном пути инфицирования даже единичная бактерия может привести к заболеванию) [1].

На территории Российской Федерации за весь период изучения показатель заболеваемости колебался от 1,0 на 100 тыс. населения в 1957 г. до 0,02 – в 2014 г. По данным Федерального центра гигиены и эпидемиологии в 2018 г. абсолютное число заболевших составило 110 случаев [2]. В последние годы коксииеллёз регистрируется на 50 административных территориях РФ. При этом наибольшее количество выявленных случаев Кулихорадки приходится на Южный Федеральный округ [3]. В Приморском крае с 2009 г. по настоящее время официально не зарегистрировано ни одного случая заболевания коксииеллёзом [4], но при этом исследования сельскохозяйственных животных и клещей, собранных с растительности в этот период, не проводились.

Основными резервуарами коксииеллы в природе являются иксодовые клещи, а так же их прокормители – теплокровные животные (мелкие грызуны, крупные и мелкие копытные). Клещи при питании на прокормителе выделяют экскременты, содержащие коксииеллы, которые рассеиваются воздушными потоками, контаминируя окружающую среду [5]. В антропоургических очагах основным резервуаром и источником инфекции для человека являются домашние животные (крупный рогатый скот, овцы, лошади, козы, кошки, собаки и другие) [6]. Заражение сельскохозяйственных животных в очагах может происходить как от инфицированных клещей во время выпаса, так и при совместном содержании здоровых и больных животных. У домашних животных коксииеллёз часто протекает как латентная инфекция, обостряющаяся в период беременности и родов [7]. Особую опасность в плане заражения для скота и для человека представляют заражённые возбудителем плацента и околоплодная жидкость. Трансмиссивный путь заражения человека маловероятен [7], тем не менее, исследования образцов смывов, взятых у пациентов с места присасывания клеща, в Республике Алтай в 2017 г. показали наличие генетического маркера *C. burnetii* у двух лихорадящих больных. Результаты секвенирования выделенной ДНК по гену *IS1111* подтвердило данные ПЦР-анализа о наличии ДНК-маркера коксииеллёза [8]. В антропоургических очагах человек может инфицироваться алиментарным путём (при употреблении инфицированного молока, заражённой воды), воздушно-пылевым (при вдыхании пыли) или контактным (через слизистые оболочки или поврежденные участки кожи) [7, 9]. Для коксииеллёза характерна весенняя сезонность. Наибольшее число случаев заболевания регистрируется в марте-мае, как раз во время массового отёла и окота животных. Среди заболевших коксииеллёзом чаще встречаются мужчины, занятые сельскохозяйственными работами, животноводством, убоем, обработкой шкур и шерсти животных, птичьего пуха и т. д. [9].

Коксииеллёз характеризуется полиморфизмом клинических проявлений [10]. В связи с различием путей передачи возбудителя человеку, разнообразием симптомов, отсутствием патогномичных признаков заболевания при коксииеллёзе для подтверждения диагноза требуется использование комплекса методов лабораторной диагностики.

Методами диагностики коксииеллёза являются иммуноферментный анализ (ИФА) и полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Цель работы – показать возможную циркуляцию опасной для человека *C. burnetii* на приграничных и прилегающих к Владивостоку территориях Приморского края.

Материал и методы. Для решения вопроса о возможной циркуляции *C. burnetii* на территории Приморского края исследовано 334 образца разнообразного природного материала, собранного в весенне-летний период 2019 г. в окрестностях с. Новокачалинск (Ханкайский район), на о. Рейнеке (Владивостокский городской округ). Иксодовых клещей с растительности собирали на флаг стандартным способом согласно методическим указаниям [11]. На о. Рейнеке собрано 71 экз., в Ханкайском районе – 86 экз. иксодовых клещей.

В Ханкайском районе, используя живоловки, отловлены 34 экз. мелких грызунов. Ловушки выставляли в вечернее время в местах травянисто-леспещицовой границы между сельскохозяйственными полями прямой линией с интервалом 5 метров, [12]. Для исследования у грызунов забирали внутренние органы (мозг, сердце, печень, селезёнка).

При содействии КГБУ «Хорольская ветеринарная СББЖ «Ханкайская станция по борьбе с болезнями животных»» собраны 52 пробы крови от крупного и мелкого рогатого скота.

Исследованы 56 экз. иксодовых клещей, присосавшихся к людям и 35 образцов сывороток крови людей, пострадавших от укусов клеща на территории, прилегающей к г. Владивостоку.

Клещей промывали в 96%-м этаноле, затем в физиологическом растворе. Образцы помещали в пробирки, добавляли по 250 мкл охлажденного раствора для подготовки образцов (РПО) из набора реагентов для выделения нуклеиновых кислот «РеалБэст экстракция 100» АО «Вектор-Бест» (Новосибирск). Клещей измельчали на гомогенизаторе TissueLyser LT (Qiagenhilden, Германия).

Выделение нуклеиновых кислот исследуемых образцов проводили с использованием набора реагентов «РеалБэст экстракция 100», согласно инструкции производителя.

ПЦР в режиме реального времени выполняли с помощью экспериментальной лабораторной версии тест-системы «Coxbur-1», представляющей набор реагентов для обнаружения ДНК-маркера *C. burnetii* (фрагмент генома *IS1111*) методом ПЦР с гибридиционно-флуоресцентным учётом результатов, разработанной АО «Вектор-Бест» (Новосибирск). В состав теста «Coxbur-1» входят лиофильно высушенные ПЦР-смеси, содержащие праймеры Cbur-IS-F5 (AGAGTCTGTGGTTAAAAGCAC), Cbur-IS-R2 (TATTCGCTAACGCCACACA), зонд Cbur-IS-Z2(ROX-TCATTTGAGCGCCGCGGAATGAATCG-(BHQ-2)), с конечной концентрацией в реакции 0,5 мкМ и 0,25 мкМ, соответственно. Использована программа амплификации: 1 стадия: 50° С – 2 мин; 2 стадия: 95° С – 2 мин; 3 стадия: 50 циклов (94° С – 10 сек, 60° С – 20 сек). Измерение флуоресценции проводилось при температуре 60° С. Все постановки реакции сопровождалось отрицательными и положительными контролями. В качестве набора сравнения использована тест-система «АмплиСенс *Coxiella burnetii*-FL» (ЦНИИ эпидемиологии, Москва) согласно инструкции производителя. Амплификация

положительных образцов ДНК *C. burnetii* по участку гена *IS1111* проводили с использованием пары праймеров РКО-Cbur-F4 (AAGAGTCTGTGGTAAAGCA) и РКО-Cbur-R2 (TATTCGCTAACGCCACACA), обеспечивающих наработку ампликона длиной 390 п. нк. Амплификацию ДНК *Coxiella-like endosymbiont* по участку гена *16SrRNA* размером 419 п. нк. осуществляли с использованием комбинации праймеров С-Lk-F2 (TCGGGTTGTAAAGCACTTTC) и С-Lk-R5 (AGCTAGTTCTCATCGTTGAC). Для амплификации ДНК-фрагментов микроорганизмов использовали 45 мкл выделенных из образца суммарной ДНК при концентрации праймеров 0,5 мкМ. Использована программа амплификации: 1 стадия: 94° С – 1 мин; 2 стадия 5 циклов: 45° С – 15 сек., 62° С – 20 сек., 72° С – 20 сек.; 3 стадия 45 циклов: 94° С – 15 сек., 60° С – 30 сек., 72° С – 30 сек.

Для проведения электрофоретического анализа полученных ампликонов применяли 1,5% агарозный гель. Секвенирование проводилось по методу Сэнгера на секвенаторе ABIPrism 3100 GeneticAnalyzer (Applied-Biosystems, США) в Центре коллективного пользования «Геномика» СОРАН (г. Новосибирск). Полученные в результате секвенирования данные сопоставляли с нуклеотидными последовательностями ДНК коксиилл, представленными в международной базе данных NCBI с помощью приложения BLAST.

Результаты и обсуждение. Видовой состав иксодовых клещей о. Рейнке представлен *I. persulcatus* (26,8%), *H. concinna* (56,3%), *H. japonica* (8,5%), *D. silvarum* (8,5%) (табл. 1). С помощью экспериментального ПЦР-теста «Сохбур-1» установлено, что генетический маркер *C. burnetii*, фрагмент генома *IS1111*, выявляли у всех видов клещей, что составило 19,7% положительных результатов. ДНК-маркер коксиилл чаще детектировали в клещах *H. concinna* – 27,5% (в 11 из 40 случаев). В суспензиях остальных видов клещей генетический маркер выявлен по одному случаю (см. табл. 1).

В Ханкайском районе из 86 исследованных клещей, собранных с растительности, на долю *I. persulcatus* пришлось 2,3%, *H. concinna* – 1,2%, *H. japonica* – 3,5%. Клещи *D. silvarum* составили самую многочисленную группу – 93% (80 из 86). ДНК коксиилл чаще (в 6,3%) выявляли в клещах *D. silvarum*, в клещах *I. persulcatus*, *H. japonica* – по 1 случаю. В клещах *H. concinna* генетический маркер *C. burnetii* не обнаружен. Общая заражённость клещей коксииллами на данной территории составила 8,1% (7 случаев) (см. табл. 1).

Из 56 образцов иксодовых клещей, присосавшихся к людям в 2019 г., видовой состав представлен в

следующем соотношении: *I. persulcatus* – 87,5%, *H. concinna* – 12,5%. С помощью экспериментального теста «Сохбур-1» ДНК-маркер выявлен в клещах *I. persulcatus* в 38,8% (в 19 из 49), у представителей *H. concinna* в одном случае (см. табл. 1).

В положительных образцах, содержащих исследуемую ДНК-мишень возбудителя, при постановке ПЦР-РВ значения *Сt* варьировали от 34 до 38 цикла, что свидетельствовало о невысокой нагрузке ДНК коксиилл в исследуемых суспензиях клещей.

В качестве диагностического набора сравнения использован ПЦР-тест «АмплиСенс *Coxiella burnetii*-FL», с помощью которого показано, что только в 14 пробах из 20 положительных клещей, снятых с людей после присасывания, присутствовала ДНК *C. burnetii*. С помощью комбинации праймеров РКО-Cbur-F4, РКО-Cbur-R2 и секвенирования ДНК по фрагменту генома *IS1111* подтверждено присутствие *C. burnetii* в 6 образцах, в которых ДНК-маркеры *C. burnetii* выявлены обоими тестами. Другие же 8 положительных образцов, результаты которых получены с помощью обоих тестов, не удалось секвенировать из-за низкой нагрузки возбудителя в пробах.

Полученные в результате секвенирования последовательности в 100% идентичны последовательностям *C. burnetii* str. RSA439 (CP040059), str. 2014-PE-15890 (CP032542), str. 18430 (CP014557) и другим последовательностям этого вида, представленным в базе данных NCBI. В результате секвенирования по участку гена *16SrRNA* получены дополнительные данные о том, что в других 6 из 20 положительных пробах, обследованных с помощью теста «Сохбур-1» выявлен ДНК-маркер не *C. burnetii*, а коксиилла-подобного микроорганизма (*Coxiella-like endosymbiont*). Полученные нами и секвенированные с помощью комбинации праймеров С-Lk-F2 и С-Lk-R5 последовательности ДНК в 98,6% идентичны *Coxiella-like endosymbiont isolate Iran/1943/49* (MN612068). Эти образцы (*n*=6), содержащие ДНК коксииллоподобные микроорганизмы, показали отрицательные значения ПЦР-РВ при использовании набора сравнения «АмплиСенс *Coxiella burnetii*-FL», попытки секвенировать их по фрагменту генома *IS1111 C. burnetii* не удалось. В клещах, присосавшихся к людям на территории Приморского края, детектированы как ДНК возбудителя коксииллеза – *C. burnetii*, так и ДНК *Coxiella-like endosymbiont* (см. табл. 2).

До настоящего времени в литературе нет сведений о причастности коксиилла-подобных бактерий к случаям заболевания у людей, известно, что возбудителем летальной инфекции у домашних птиц является *Coxiella-like endosymbiont* [13].

Таблица 1

Видовой состав иксодовых клещей на различных территориях Приморского края и выявление в них генетического маркера коксиилл с помощью экспериментального теста «Сохбур-1»

| Вид иксодовых клещей | о. Рейнке | | | | Ханкайский район | | | | Пригородная территория Владивостока (клещи, присосавшиеся к людям) | | | |
|-------------------------------|----------------|------|------------------------|------|------------------|-----|------------------------|------|--|------|------------------------|------|
| | Всего образцов | | ДНК <i>C. burnetii</i> | | Всего образцов | | ДНК <i>C. burnetii</i> | | Всего образцов | | ДНК <i>C. burnetii</i> | |
| | абс | % | абс | % | абс | % | абс | % | абс | % | абс | % |
| <i>Ixodes persulcatus</i> | 19 | 26,8 | 1 | 5,3 | 2 | 2,3 | 1 | | 49 | 87,5 | 19 | 38,8 |
| <i>Haemaphysalis concinna</i> | 40 | 56,3 | 11 | 27,5 | 1 | 1,2 | 0 | | 7 | 12,5 | 1 | 14,3 |
| <i>Haemaphysalis japonica</i> | 6 | 8,5 | 1 | 16,7 | 3 | 3,5 | 1 | 33,3 | 0 | | 0 | |
| <i>Dermacentor silvarum</i> | 6 | 8,5 | 1 | 16,7 | 80 | 93 | 5 | 6,3 | 0 | | 0 | |
| Всего | 71 | | 14 | 19,7 | 86 | | 7 | 8,1 | 56 | | 20 | 35,7 |

ПЦР-индикация генетических маркёров *Coxiella burnetii* и *Coxiella-like endosymbiont* в клещах, присосавшихся к людям в лесной зоне пригорода Владивостока

| Пары сравнения использованных тестов | Комбинация результатов ПЦР-анализа | Количество образцов сравнения | Результаты секвенирования |
|---|------------------------------------|-------------------------------|--|
| «Coxburg-1» «АмплиСенс <i>Coxiella burnetii</i> -FL» | положительный положительный | 14 | В 6-ти образцах выявлена <i>Coxiella burnetii</i> (фрагмент генома IS1111) |
| «Coxburg-1» «АмплиСенс <i>Coxiella burnetii</i> -FL» | положительный отрицательный | 6 | В 6-ти образцах выявлена <i>Coxiella-like endosymbiont</i> (фрагмент генома 16SrRNA) |
| «Coxburg-1» «АмплиСенс <i>Coxiella burnetii</i> -FL» | отрицательный отрицательный | 36 | 0 |

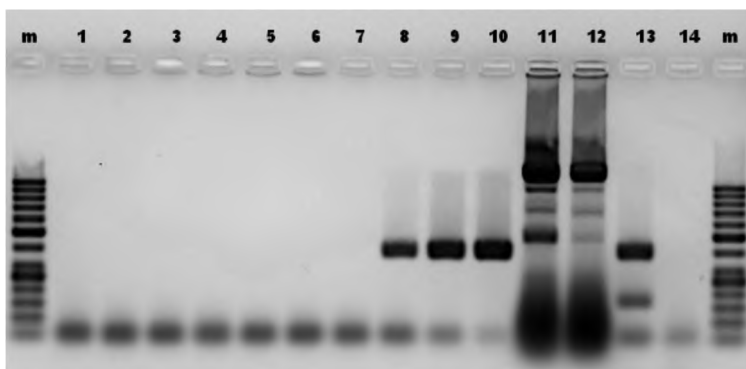
Таблица 3

Детекция генетического маркёра *C. burnetii* в сыворотках крови домашних животных

| Сельскохозяйственные животные | Всего образцов, абс. | ДНК <i>Coxiella burnetii</i> , абс./% |
|-------------------------------|----------------------|---------------------------------------|
| Овцы | 10 | 3/30 |
| Лошади | 5 | 2/40 |
| Коровы | 37 | 0 |
| Всего | 52 | 5/9,6 |

Из 34 экз мелких грызунов, отловленных в Ханкайском районе, видовой состав представлен *Apodemus agrarius* – 79,4% (27 особей), *Apodemus peninsulae* – 5,9% (2 особи), *Microtus fortis* – 14,7% (5 особей). С помощью обеих тест-систем в суспензиях органов диких грызунов ДНК *C. burnetii* не обнаружена.

Исследование сывороток крови сельскохозяйственных животных с помощью экспериментальной тест-системы «Coxburg-1» показало наличие ДНК-маркёра коксиелл в 3 из 10 образцах сывороток обследованных овец, в 2 из 5 образцах лошадей. В сыворотках крови коров (37 проб) ДНК *C. burnetii* не обнаружена (см. табл. 3). Подобные результаты заражённости скота в хозяйствах Омской области получены в период 1997-2007 гг., в среднем этот показатель достигал 9,3±1,0% [14].



Электрофореграмма ампликонов по участку гена IS1111 длиной 390 п.нк. *C. burnetii*.

Дорожка № 8 – ампликон соответствующей длины наработанный с образца ДНК, выделенной из сыворотки крови лошади № 1; дорожки № 9 и 10 – наработка ампликона с образца ДНК, выделенной из сыворотки лошади № 2 в двух повторах; № 13 – “К+”, № 14 – “К-”, сыворотка крови коровы. С № 1 по № 7, а так же дорожки № 11 и № 12- отрицательные результаты с образцами ДНК, выделенными из сывороток других животных.

В 35 образцах крови людей, имеющих в анамнезе укус клеща, возбудитель коксиеллёза не выявлен.

Дополнительно проведённые исследования сельскохозяйственных животных с помощью диагностического набора «АмплиСенс *Coxiella burnetii*-FL» подтвердили наличие ДНК *C. burnetii* в сыворотках крови овец и лошадей. Результаты ПЦР-анализа, полученные с помощью теста «Coxburg-1» и «АмплиСенс *Coxiella burnetii*-FL» показали одинаковые результаты. Использование комбинации праймеров РКО-Cburg-F4 и РКО-Cburg-R2 обеспечило наработку ампликонов участка генома IS1111 *C. burnetii* длиной 390 п. нк. в пробах ДНК, выделенных из двух положительных образцов сывороток лошадей (см. рисунок).

Наработанные ампликоны успешно секвенированы. Анализ полученных последовательностей с помощью приложения BLAST показал, что они соответствуют последовательностям IS1111 *C. burnetii*, и в частности полностью гомологичны последовательности *C. burnetii* str. *Namibia* (CP007555).

Случаи заражения населения после укуса клеща на территории РФ, выявление *C. burnetii* и *Coxiella-like endosymbiont* в клещах, присосавшихся к людям в лесной зоне пригорода Владивостока, свидетельствуют о возможной трансмиссивной передаче возбудителя от клеща к человеку на территории юга Дальнего Востока.

Полученные в результате проведённого пилотного исследования иксодовых клещей и сельскохозяйственных животных свидетельствуют о выявлении *C. burnetii* на территории Приморского края. В первую очередь, это касается Ханкайского района, приграничных зон КНР, что указывает на необходимость проведения дополнительных исследований природного материала для более точной и полной оценки сложившейся эпидемиологической ситуации по распространению *C. burnetii*. Особое внимание следует уделить приграничным зонам, густонаселённым территориям и местам массового отдыха населения. Выполненные исследования пока не отвечают на вопрос, являются ли фермерские хозяйства антропоургическими очагами Ку-лихорадки, или же в Приморском крае существуют природные очаги этого заболевания, в которых клещи принимают непосредственное участие. Последующие исследования необходимо направить на определение в крови ДНК-маркёров *C. burnetii* у работников ферм, где содержатся инфицированные животные, на выявление возможных случаев заболевания у людей.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки. Работа выполнена в рамках научного проекта (0545-2019-0007) Министерства науки и высшего образования РФ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лобан К.М., Лобзин Ю.В., Лукин Е.П. Риккетсиозы человека: руководство для врачей. СПб: Элби; 2002.
2. Яковлев Э.А., Борисевич С.В., Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В. Заболеваемость лихорадкой Ку в Российской Федерации и странах Европы: реалии и проблемы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015; 4: 49-54.
3. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 году: государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2019. Available at: <https://www.rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/798/gosudarstvennyy-doklad-o-sostoyanii-sanitarno-epidemiologicheskogo-blagopoluchiya-naseleniya-v-rossiyskoy-federatsii-v-2018-godu.pdf>.
4. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Приморском крае в 2018 году: государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2018. Available at: http://25.rospotrebnadzor.ru/c/document_library/get_file?uuid=66d89a32-b813-45f4-926a-0224e04a5f4a&groupId=10156.
5. Фрейлихман О.А., Панферова Ю.А., Сайнес Т.В., Шапарь А.О., Токарев Н.К. Инфицированность клещей возбудителями инфекционного клещевого боррелиоза и лихорадки Ку на территории Санкт-Петербурга. *Инфекция и иммунитет*. 2016; 6 (3):118.
6. Злобин В.И., Рудаков Н.В., Малов И.В. Клещевые трансмиссивные инфекции. Новосибирск: Наука; 2015.
7. Дайтер А.Б., Рыбакова Н.А., Токарев Н.К. Эпидемическая проекция внутривисцеральных очагов лихорадки Ку. *Журнал микробиологии*. 1988; 11: 51-6.
8. Шучинова Л.Д., Бондаренко Е.И. Случаи заражения людей Ку-лихорадкой трансмиссивным путем. В кн.: Материалы XI ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням с международным участием (1-3 апреля 2019 г.). М.; 2019.
9. Малов В.А., Горобченко А.Н., Гюлазян Н.М., Немилостива Е.А., Каншина Н.Н., Нехаев С.Г. и др. «Неясная лихорадка»: восемьдесят лет спустя. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2017; 22 (4): 200-7.
10. Малов В.А., Пономарев С.В., Тарасевич И.В., Кубенский Е.Н., Горобченко А.Н., Пантюхина А.Н., и др. Описание случая тяжелого течения Q-лихорадки. *Терапевтический архив*. 2015; 11: 84-91.
11. МУ 3.1.3012-12 Сбор, учёт и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих в природных очагах опасных инфекционных болезней. Методические указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2011.
12. МУ 3.1.1029-01 Отлов, учёт и прогноз численности мелких млекопитающих и птиц в природных очагах инфекций. Методические указания. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России; 2002.
13. Бондаренко Е.И., Кравцов В.Ю., Соловьёв А.И., Ракин А.И., Тимофеев Д.И., Швалов А.Н., и др. Молекулярно-генетическое исследование аргасовых клещей *Ornithodoros papillipes* из коллекции академика Е.Н. Павловского. *Новости «Вектор-Бест»*. 2020; 1 (95): 7-15.
14. Красиков А.П., Рудаков Н.В. Риккетсиозы, коксиеллёз и анаплазмозы человека и животных. Омск: Омский научный вестник; 2013.

REFERENCES

1. Loban K.M., Lobzin Y.V., Lukin E.P. Human Rickettsioses: A Guide for Physicians. [Rikketsiozy cheloveka: rukovodstvo dlya vrachej]. St. Petersburg: Alby; 2002. (in Russian)
2. Yakovlev E.A., Borisevich S.V., Popova A.Y., Ezhlova E.B., Demina Y.V. The incidence of Q fever in the Russian Federation and European countries: realities and problems. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2015; 4: 49-54. (in Russian)
3. On the state of sanitary-epidemiological well-being of the population in the Russian Federation in 2018: State report. Moscow: Federal'naya sluzhba po nadzoru v sfere zashchity prav potrebiteley i blagopoluchiya cheloveka; 2019. Available at: http://25.rospotrebnadzor.ru/c/document_library/get_file?uuid=66d89a32-b813-45f4-926a-0224e04a5f4a&groupId=10156 (accessed 7 April 2020). (in Russian)
4. On the state of the sanitary-epidemiological well-being of the population in the Primorsky Territory in 2018: State report. Moscow: Federal'naya sluzhba po nadzoru v sfere zashchity prav potrebiteley i blagopoluchiya cheloveka]. 2018. Available at: http://25.rospotrebnadzor.ru/c/document_library/get_file?uuid=66d89a32-b813-45f4-926a-0224e04a5f4a&groupId=10156 (accessed 7 April 2020). (in Russian)
5. Freylikhman O.A., Panferova Y.A., Saynes T.V., Shapar' A.O., Tokarevich N.K. Tick infection by pathogens of tick-borne borreliosis and Q fever in St. Petersburg. *Infektsiya i immunitet*. 2016; 6 (3):118. (in Russian)
6. Zlobin V.I., Rudakov N.V., Malov I.V. Tick-transmitted diseases. [Kleshchevye transmissivnye infektsii]. Novosibirsk: Nauka; 2015. (in Russian)
7. Dayter A.B., Rybakova N.A., Tokarevich N.K. Epidemic projection of the intraocardial foci of Q fever. *Zhurnal mikrobiologiya*. 1988; 11: 51-6. (in Russian)
8. Shuchinova L.D., Bondarenko E.I. Cases of human exposure to Q-fever by vector-borne transmission. In: Proceedings of the XI Annual All-Russian Congress on Infectious Diseases with International Participation (April 1-3, 2019). Moscow; 2019: 234-5. (in Russian)
9. Malov V.A., Gorobchenko A.N., Gyulazyan N.M., Nemilostiva E.A., Kanshina N.N., Nekhaev S.G. et al. "Unclear fever": eighty years later. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni*. 2017; 22 (4): 200-7. (in Russian)
10. Malov V.A., Ponomarev S.V., Tarasevich I.V., Kubenskij E.N., Gorobchenko A.N., Pantyhina A.N. et al. Description of severe Q fever. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2015; 11: 84-91. (in Russian)
11. Guidelines 3.1.3012-12 Collection, accounting and preparation for laboratory research of blood-sucking arthropods in natural foci of dangerous infectious diseases: Methodological instructions. Moscow: Federal'ny tsentr gigeny i epidemiologii Rosspotrebnadzora; 2011. (in Russian)
12. Guidelines 3.1.1029-01 Catching, accounting and forecasting the number of small mammals and birds in natural foci of infections: Guidelines. Moscow: Federal'ny tsentr gossanepidnadzora Minzdrava Rossii; 2002. (in Russian)
13. Bondarenko E.I., Kravcov V.Y., Solov'yov A.I., Rakin A.I., Timofeev D.I., Shvalov A.N. et al. Molecular genetic study of Argas ticks *Ornithodoros papillipes* from the collection of Academician E.N. Pavlovsky. *Novosti «Vektor-Best»*. 2020; 1 (95): 7-15. (in Russian)
14. Krasikov A.P., Rudakov N.V. Rickettsioses, coxiellosis and anaplasmoses of humans and animals. [Rikketsiozy, koksiielloz i anaplazmozy cheloveka i zhivotnykh]. Omsk: Omskiy nauchnyi vestnik; 2013. (in Russian)