

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Борисова А. Б.¹, Урбан Ю. Н.¹, Гадуа Н. Т.¹, Борисова О. Ю.¹, Пименова А. С.¹, Афанасьев М. С.², Петрова М. С.¹, Афанасьев С. С.¹, Сметанина С. В.³

РАЗРАБОТКА УСКОРЕННОЙ МЕТОДИКИ ГЕНОДИАГНОСТИКИ КОКЛЮША И КОКЛЮШЕПОДОБНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ НА ОСНОВЕ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ В МУЛЬТИПЛЕКСНОМ ФОРМАТЕ

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;

³ГБУЗ Инфекционная клиническая больница № 1 Департамента здравоохранения города Москвы, 125367, Москва, Россия

*Цель работы – разработка ускоренной методики генодиагностики на основе ПЦР-РВ в мультиплексном формате для обнаружения ДНК *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. holmesii*. В исследовании использовано 104 штамма микроорганизмов, из них: 50 штаммов *B. pertussis*, 37 – *B. parapertussis*, 17 – гетерологичных видов микроорганизмов. Оценка аналитической специфичности проведена с использованием ДНК штаммов различных микроорганизмов с концентрацией не менее 10^9 ГЭ/мл. Для проверки аналитической чувствительности исследованы серии последовательных разведений бактериальных культур типовых контрольных штаммов *B. pertussis* № 143, *B. parapertussis* № 38б, *B. holmesii* DSM 13416 с концентрацией 5×10^9 – 5 мк/мл. В качестве диагностических мишеней выбраны инсерционные последовательности: для *B. parapertussis* – специфический фрагмент IS1001, для *B. holmesii* – специфический фрагмент hIS1001, для *B. pertussis* – фрагмент IS481. Для разработки методики генодиагностики сконструированы специфические праймеры, которые объединены в единую мультипраймерную смесь, подобран состав реакционной смеси и условия амплификации. Аналитическая чувствительность разработанной методики для выявления возбудителей коклюша и коклюшеподобных заболеваний составила – 5×10^1 ГЭ/мл. Проверка разработанной методики генодиагностики показала 100% аналитическую специфичность. Разработана ускоренная методика генодиагностики на основе ПЦР-РВ в мультиплексном формате, позволяющая идентифицировать ДНК *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. holmesii*, что расширяет возможности обследования больных с подозрением на коклюш и коклюшеподобные заболевания с целью повышения лабораторного подтверждения диагноза.*

Ключевые слова: коклюш; ПЦР-диагностика; *B. holmesii*; *B. pertussis*; *B. parapertussis*; ПЦР в реальном времени в мультиплексном формате.

Для цитирования: Борисова А. Б., Урбан Ю. Н., Гадуа Н. Т., Борисова О. Ю., Пименова А. С., Афанасьев М. С., Петрова М. С., Афанасьев С. С., Сметанина С. В. Разработка ускоренной методики генодиагностики коклюша и коклюшеподобных заболеваний на основе ПЦР в реальном времени в мультиплексном формате. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (9): 567-573. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-9-567-573>

Borisova A. B.¹, Urban Yu. N.¹, Gadua N. T.¹, Borisova O. Yu.¹, Pimenova A. S.¹, Afanasiev M. S.², Petrova M. S.¹, Afanasiev S. S.¹, Smetanina S. V.³

DEVELOPMENT OF ACCELERATED GENODIAGNOSIS METHOD OF PERTUSSIS AND PERTUSSIS-LIKE DISEASES ON THE BASIS OF mPCR-RT

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

²I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 119991, Moscow, Russian Federation;

³Infectious diseases clinical hospital № 1 Moscow Department of Health, 125367, Moscow, Russian Federation

*The aim of the work was to develop an accelerated genodiagnosis method based on mPCR-RT for the detection DNA of *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. holmesii*. Materials and methods. The study used 104 strains of microorganisms, of which: 50 strains of *B. pertussis*, 37 – *B. parapertussis*, 17 – heterologous species of microorganisms. Assessment of analytical specificity was carried out using DNA strains of various microorganisms with a concentration at least 10^9 GE / ml. To check the analytical sensitivity we studied a series of serial dilutions of bacterial cultures of the control strains *B. pertussis* № 143, *B. parapertussis* № 38b, *B. holmesii* DSM 13416 with a concentration of 5×10^9 – 5 μ m/ml. Results. Insertion sequences were chosen as diagnostic targets: for *B. parapertussis* – a specific fragment IS1001, for *B. holmesii* – a specific fragment hIS1001, for *B. pertussis* – a fragment IS481. To develop a genodiagnosis method specific primers were designed and combined into a single multi-primer mixture, the composition of the reaction mixture and the amplification conditions were selected. The analytical sensitivity of the developed method for detecting pertussis and pertussis-like pathogens was 5×10^1 GE / ml. Verification of the developed methodology of gene diagnostics showed 100% analytical specificity. Conclusion. An accelerated genodiagnosis method based on mPCR-RT has been developed,*

it allows you to identify DNA of *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. holmesii*, which expands the possibilities of examining patients with suspected pertussis and pertussis-like diseases in order to increase laboratory confirmation of the diagnosis.

Key words: whooping cough; PCR-diagnostics; *B. holmesii*; *B. pertussis*; *B. parapertussis*; mPCR-RT

For citation: Borisova A. B., Urban Yu. N., Gadua N. T., Borisova O. Yu., Pimenova A. S., Afanasiev M. S., Petrova M. S., Afanasiev S. S., Smetanina S. V. Development of accelerated genodiagnosis method of pertussis and pertussis-like diseases on the basis of mPCR-RT. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65 (9): 567-573. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-9-567-573>

For correspondence: Borisova Anastasia Borisovna, junior researcher of clinical department; e-mail: anastasiaboris93@mail.ru

Information about authors:

Borisova A.B. <https://orcid.org/0000-0003-4425-8428>
Urban Yu.N. <https://orcid.org/0000-0003-0189-360>
Gadua N.T. <https://orcid.org/0000-0001-6247-6176>
Borisova O.Yu. <https://orcid.org/0000-0001-6316-5046>
Pimenova A.S. <https://orcid.org/0000-0002-6914-3531>
Afanasiev M.S. <https://orcid.org/0000-0002-5860-4152>
Petrova M.S. <https://orcid.org/0000-0001-6065-2623>
Afanasiev S.S. <https://orcid.org/0000-0001-6497-1795>

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

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

Received 13.04.2020
Accepted 15.05.2020

Введение. Коклюшная инфекция не теряет актуальности, несмотря на глобальную программу вакцинопрофилактики. По данным ВОЗ в 2018 г. уровень охвата тремя дозами вакцины, содержащей коклюшный компонент, составил 86%, зарегистрировано 151074 тыс. подтвержденных случаев коклюша в мире [1]. За последние два года в Российской Федерации отмечается рост заболеваемости коклюшем. В 2018 г. показатель заболеваемости составил 7,1, в 2019 г. – 9,8 на 100 тыс. населения против 3,7 в 2017 году. В 2019 г. зарегистрировано 14 406 случаев заболевания коклюшем, в том числе у детей до 17 лет – 13 538, среди которых самые высокие интенсивные показатели регистрируются среди детей первого года жизни (<https://www.rosпотребнадзор.ru/>). Всё больше авторов в своих публикациях упоминают об активном вовлечении в эпидемический процесс детей старшего возраста и взрослых в связи с утратой у них поствакцинальной защиты [2-4]. В большинстве случаев коклюш протекает у них в лёгкой или стёртой формах, но именно эти возрастные категории представляют наибольшую опасность для передачи инфекции детям первого года жизни [5-7]. У грудных детей коклюш протекает наиболее тяжело: регистрируются апноэ, признаки дыхательной недостаточности, осложнения со стороны бронхолёгочной системы, энцефалопатии, геморрагического синдрома [8, 9].

В последние годы в развитых странах появились публикации о выявлении среди больных с симптоматикой коклюша микроорганизма, относящегося к роду *Bordetella*, *Bordetella holmesii*. Этот микроорганизм является возбудителем коклюшеподобного заболевания, по клинике сходного с коклюшем, протекающим с характерным приступообразным кашлем, с гиперемией лица и репризами [10-14]. Распространённость коклюшеподобного заболевания, вызванного *B. holmesii*, колеблется в различных странах от 0,4 до 29% [15-17].

Согласно международной классификации болезней 10-го пересмотра (МКБ), классификация коклюша подразделяется на коклюш (A37.0.), вызванный *B. pertussis*, коклюш (A37.1.), вызванный *B. parapertussis*, коклюш (A37.8.), вызванный другим уточненным возбудителем вида *Bordetella*, коклюш неуточнённый (A37.9.).

Для уточнения этиологии заболевания необходимо совершенствование лабораторной диагностики, которое должно быть направлено на расширение возможностей идентификации разных видов бордетелл.

Диагностика коклюшной инфекции в РФ проводится с помощью молекулярно-генетического (ПЦР-диагностика), бактериологического, серологического методов, использование которых определяется сроком развития заболевания [СП 3.1.2.3162-14 «Профилактика коклюша»]. За последние десятилетия разработано значительное количество молекулярно-генетических технологий, которые открыли новые перспективы и возможности в проведении диагностики и эпидемиологического надзора при коклюшной инфекции. Разработана отечественная видоспецифичная тест-система на основе ПЦР-РВ, позволяющая выявлять в клинических образцах *B. pertussis*, содержащие интеграции IS481 и IS1002 в опероне вирулентности *bvgAS* [18]. Сотрудниками МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского разработан способ и набор для ускоренной генодиагностики коклюшной инфекции на основе LAMP, позволяющий выявлять ДНК *B. pertussis*, который в последующих разработках усовершенствован [19-20]. На территории РФ зарегистрирован один набор реагентов для выявления и дифференциации ДНК возбудителей коклюша, паракоклюша и бронхисептикоза в биологическом материале методом ПЦР в режиме реального времени с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® Bordetella multi-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва), обладающий высокой степенью чувствительности и специфичности [21]. В большинстве случаев все перечисленные методики генодиагностики позволяют выявлять ДНК *B. pertussis*, одна тест-система ещё и *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica*, но не идентифицируют ДНК *B. holmesii*. С целью расширения возможностей расшифровки этиологии заболевания и учитывая распространение *B. holmesii*, представляется значимым разработка методики генодиагностики для выявления ДНК *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. holmesii*, как возбудителей коклюша и коклюшеподобных заболеваний.

Цель работы – разработка ускоренной методики генодиагностики коклюша и коклюшеподобных заболеваний на основе ПЦР в реальном времени в мульти-

плексном формате для выявления ДНК *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. holmesii*.

Материал и методы. Для разработки методики генодиагностики использовали 17 типовых коллекционных штаммов микроорганизмов – *C. diphtheriae* № 665, *C. xerosis* № 1911, *C. ulcerans* № 675, *B. pertussis* № 143, *B. parapertussis* № 386, *B. bronchiseptica* № 9, *S. aureus* Wood-46, *S. aureus* Cowan-1, *S. pyogenes* Dick 1 (Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур ГКПМ-ОБОЛЕНСК) ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора); *C. diphtheriae* PW 8, *C. pseudodiphtheriticum* «Соколов» (Государственная коллекция патогенных микроорганизмов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава РФ); *C. minutissimum* ATCC 23348, *C. jeikeium* ATCC 43734, *B. holmesii* ATCC 51541, *C. albicans* ATCC 10231, *S. aureus* ATCC 25923 (American Type Culture Collection), *B. holmesii* DSM 13416 (Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures). Использованы 50 штаммов *B. pertussis* и 37 штаммов *B. parapertussis*, выделенных с диагностической целью и присланных в Референс-центр по мониторингу возбудителей кори, краснухи, эпидемического паротита, коклюша и дифтерии ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора в период 2017-2018 гг. из бактериологических лабораторий медицинских организаций (МО) и Федеральных бюджетных учреждений здравоохранения «Центр гигиены и эпидемиологии» (ФБУЗ ЦГиЭ) в субъектах РФ в соответствии с письмом Роспотребнадзора от 19.06.2012 г. № 01/6830-12-32 «Об организации исследований культур возбудителей дифтерии и коклюша» и приказом Роспотребнадзора от 01.12.2017 г. № 1116 «О совершенствовании системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации». Для оценки аналитической специфичности разработанной методики использованы свежесделанные ДНК микроорганизмов – *C. accolens*, *C. afermentans* subsp. *lipophilum*, *C. amycolatum*, *C. aurimucosum*, *C. coyleae*, *C. diphtheriae* *gravis* *tox*⁺, *C. diphtheriae* *mitis* *tox*⁻, *C. diphtheriae* *gravis* *tox*⁻, *C. durum*, *C. flavescens*, *C. imitans*, *C. jeikeium*, *C. massilienses*, *C. minutissimum*, *C. mucifaciens*, *C. paurometabolum*, *C. propinquum*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. pseudotuberculosis*, *C. simulans*, *C. striatum*, *C. tuberculostearicum*, *C. ulcerans* *tox*⁻, *C. ureicelerivorans*, *C. xerosis*, *S. agalactiae*, *S. anginosus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. mitis*, *S. oligofermentans*, *S. parasanguinis*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. salivarius*, *S. aureus*, *S. caprae*, *S. hominis*, *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *N. meningitidis*, *N. mucosa*, *N. subflava*, *R. dentocariosa*, *R. mucilaginosa*, *Actinomyces* *oral*, *B. cereus*, *B. bifidum*, *H. influenzae*, *M. luteus*, *M. atlantae* (рабочая коллекция лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекции ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора).

Дизайн молекулярной структуры праймеров проведён с учётом общих требований при использовании алгоритма BLAST на основании анализа нуклеотидных последовательностей референсных штаммов, опубликованных в GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Экстракция ДНК из штаммов проведена с использованием наборов реагентов Проба-ГС-плюс («ДНК-технология», Россия) и «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва). Состав реакционной смеси: специфические олигонуклеотидные праймеры, специфические зонды с флуоресцентной меткой, дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, ПЦР-буфер с Taq-полимеразой,

очищенная ДНК. Постановка ПЦР-РВ и последующий анализ результатов проведены с использованием программируемого амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени Rotor-Gene Q 5 plex HRM (QIAGEN GmbH, Германия), руководствуясь инструкцией производителя.

Оценка аналитической надёжности с определением специфичности и чувствительности проведена согласно ГОСТ Р 53079.1-2008 и ГОСТ Р 53022.2-2008. Для проверки аналитической специфичности использована ДНК штаммов различных микроорганизмов с концентрацией матриц не ниже 10⁹ ГЭ/мл. Оценка аналитической чувствительности проведена с помощью линейки последовательных разведений типовых контрольных штаммов *B. pertussis* № 143, *B. parapertussis* № 386, *B. holmesii* DSM 13416, концентрацию исходных взвесей которых измеряли по стандартному образцу мутности 5 единиц (ОСО 42-28-86 П), что соответствует 5×10⁹ микробных клеток в 1 мл взвеси, с последующим высевом на плотную питательную среду Бордетеллагар и инкубированием 72 ч при 37° С.

Анализ результатов проведён с помощью методов описательной статистики в программном пакете «Libre-Office Calc». Количественные данные представлены в формате среднее (М) ± стандартная ошибка среднего (m).

Результаты и обсуждение. Разработана методика генодиагностики коклюша и коклюшеподобных заболеваний, предназначенная для выявления ДНК *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. holmesii*.

Диагностическими мишенями выбраны инсерционные последовательности: для *B. parapertussis* – специфический фрагмент IS1001, для *B. holmesii* – специфический фрагмент hIS1001, для *B. pertussis* – фрагмент IS481. Последняя инсерционная последовательность встречается в высокой степени копийности у *B. pertussis* (от 80 до 100 копий [22-24], но может встречаться от 8 до 10 копий в геномах *B. holmesii* [25]).

Условия проведения ПЦР-исследования подобраны экспериментально. Для приготовления реакционной смеси использованы следующие реактивы: реакционный буфер для ПЦР-РВ – qPCRmix-HS («Евроген», Москва), 25 mM MgCl₂ (Thermo Scientific™, США), H₂O, обработанная диэтилпирикарбонатом (DEPC) («Евроген», Москва), праймеры. Разработка тест-системы включала конструирование специфических праймеров: hIS1001F, hIS1001R, IS481F, IS481R, IS1001F, IS1001R с помощью компьютерной программы BLAST на основании анализа нуклеотидных последовательностей референсных штаммов, опубликованных в GenBank. Последовательности флуоресцентно меченных зондов hIS1001P, IS481P, IS1001P взяты из опубликованных протоколов [13, 15] (табл. 1).

При конструировании праймеров и модификации зондов учитывали: степень гомологии с выбранными участками генов; отсутствие самокомплементарных участков внутри олигонуклеотидов и комплементарности друг другу с целью недопущения возникновения устойчивых вторичных структур (димеров); близость значений температуры отжига праймеров. Все три группы праймеров объединены в единую мультипраймерную смесь, при этом гибридационно-флуоресцентные зонды мечены различными парами флуорофор-тушителем. Для *B. pertussis* использовалась пара Cy5-BHQ-2, для *B. parapertussis* – пара HEX-BHQ-1, для *B. holmesii* – пара 6-FAM-BHQ-1. Такое разделение позволило провести отдельную детек-

Таблица 1

Используемые праймеры

Название	Нуклеотидная последовательность 5' – 3'	Ориентация праймера	Примечание
hIS1001F	GATCCGTGCCAATCGGTAAAGTT	прямой	оригинальный
hIS1001R	CAAGGGCTGGTTGGCCTGGAGCAAC	обратный	оригинальный
hIS1001P	(6-FAM)-TGAGCAAGGGCTGGTTGGCCTG-(BHQ-1)	флуоресцентный зонд	[13]
IS481F	GCCGGATGAACACCCATAAGCATG	прямой	оригинальный
IS481R	GGGCGATCAATTGCTGGACCAT	обратный	оригинальный
IS481P	(Cy5)-ATGAACACCCATAAGCATGCCCG-(BHQ-2)	флуоресцентный зонд	[13]; подобран флуоресцентный краситель
IS1001F	AATTGCTGCAAGCCAACCA	прямой	оригинальный
IS1001R	CCAGAGCCGTTTGTAGTTCGTCAC	обратный	оригинальный
IS1001P	(HEX)-ACATAGACCGTCAGCAG-(BHQ-1)	флуоресцентный зонд	[15]; подобран флуоресцентный краситель

Таблица 2

Принцип интерпретации результатов ПЦР-исследования

Идентифицируемая ДНК микроорганизма	Канал детекции // Выявляемая мишень		
	FAM/Green // hIS1001	HEX/Yellow // IS1001	Cy5/Red // IS481
<i>B. holmesii</i>	+	-	-/+
<i>B. paraptussis</i>	-	+	-
<i>B. pertussis</i>	-	-	+

цию разных видов бордетелл. Конечная концентрации праймеров в составе реакционной смеси – по 300 нМ и зондов – по 100 нМ. В реакционную смесь объемом 20 мкл вносили 5 мкл ДНК клинического образца.

Аmplification в режиме реального времени проводили с помощью прибора Rotor-Gene Q 5 plex HRM (QIAGEN GmbH, Германия) при следующих условиях: 95° С – 10 мин – 1 цикл, 95° С – 15 с, 60° С – 60 с, 50 циклов.

Для проведения реакции использованы следующие контрольные образцы: положительные контрольные образцы, содержащие ДНК выявляемых микроорганизмов, – ДНК *B. holmesii* DSM 13416, ДНК *B. paraptussis* № 386, ДНК *B. pertussis* № 143; отрицательный контрольный образец, содержащий ДНК микроорганизма, для контроля отсутствия ложноположительных результатов, связанных с возможной контаминацией реактивов, – ДНК *B. bronchiseptica* № 9; отрицательный контроль – чистый ТЕ-буфер. В случае наличия положительного результата в отрицательном контроле, полученные результаты по всем образцам, исследуемым в данной постановке, считались не пригодными для интерпретации.

Анализ и интерпретация результатов проведены с помощью программного обеспечения прибора Rotor-Gene Q 5 plex HRM (QIAGEN GmbH, Германия). Интерпретация результатов проведена путём оценки по кривым накопления флуоресцентного сигнала по каждому из заданных для образцов каналов – FAM/Green, HEX/Yellow, Cy5/Red. По первому каналу для флюорофора FAM/Green идентифицируется специфический фрагмент ДНК *B. holmesii* – hIS1001, по второму каналу для флюорофора HEX/Yellow выявляется специфический фрагмент ДНК *B. paraptussis* – IS1001, по третьему каналу Cy5/Red детектируется фрагмент ДНК *B. pertussis* – IS481. При учёте результатов пороговая линия (threshold) устанавливается вручную на уровне 20% от максимального уровня флуоресценции в последнем цикле амплификации. Уровень пороговой линии (threshold) составил не более 0,01. Значение показателя «С» (точка накопления сигнала флуоресценции, отражает точку пересечения

кривой роста флуоресценции и установленного порога) определено в автоматическом режиме. В положительных образцах кривая флуоресценции пересекает линию threshold и имеет вид экспоненциальной кривой. В отрицательных образцах флуоресценции не наблюдается, что отражается прямой детекции на уровне или ниже линии threshold. Принцип интерпретации результатов представлен в табл. 2.

При высокой концентрации ДНК-матрицы *B. holmesii* на уровне $\geq 5 \times 10^6$ КОЕ/мл возможно получение положительного сигнала по каналу Cy5/Red (Ct – 35) в связи с тем, что мишень IS481 может встречаться в единичных копиях в геномах этого вида бордетелл [21].

На способ и набор для генодиагностики коклюша и коклюшеподобных заболеваний получен патент на изобретение РФ № 2702240 от 12.10.2018 г.

Для оценки аналитической чувствительности разработанной методики готовили по три линейки последовательных разведений бактериальных культур трёх типовых контрольных штаммов – *B. pertussis* № 143, *B. paraptussis* № 386, *B. holmesii* DSM 13416: 5×10^9 – 5 м.к. в 1 мл. Из 100 мкл каждого разведения суспензий выделяли ДНК. Параллельно с этим, для определения общего количества жизнеспособных микроорганизмов в 1 мл бактериальной взвеси, из каждого разведения производили высеив по 100 мкл на плотную питательную среду Бордетелагар и инкубировали при 37° С. Через 72 ч подсчитывали число выросших колоний (КОЕ/мл) (табл. 3).

Выделение ДНК из исследуемого материала осуществлено с помощью двух коммерческих наборов Проба-ГС-плюс («ДНК-технология», Россия) и «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва). Для определения аналитической чувствительности каждое разведение исследовано в разработанной методике в трёх повторях. Установлено, что при использовании наборов реагентов для выделения Проба-ГС-плюс («ДНК-технология», Россия) и «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва) аналитическая чувствительность по трём мишеням составила – 5×10^1 ГЭ/мл (табл. 4).

Таблица 3

Разведения и учёт КОЕ/мл типовых контрольных штаммов *B. pertussis* № 143, *B. parapertussis* № 386, *B. holmesii* DSM 13416

Разведение условное	Количество м. к. в 1 мл взвеси бактериальной культуры по стандарту мутности (5 ME)	Число колониеобразующих единиц в 1 мл взвеси бактериальной культуры (КОЕ/мл)
<i>B. pertussis</i> № 143		
исходная	5×10 ⁹	сплошной рост
– 1	5×10 ⁸	сплошной рост
– 2	5×10 ⁷	сплошной рост
– 3	5×10 ⁶	сплошной рост
– 4	5×10 ⁵	густой рост
– 5	5×10 ⁴	множественный рост
– 6	5×10 ³	3,1×10 ¹
– 7	5×10 ²	5
– 8	5×10 ¹	рост отсутствовал
– 9	5	рост отсутствовал
<i>B. parapertussis</i> № 386		
исходная	5×10 ⁹	сплошной рост
– 1	5×10 ⁸	сплошной рост
– 2	5×10 ⁷	сплошной рост
– 3	5×10 ⁶	сплошной рост
– 4	5×10 ⁵	густой рост
– 5	5×10 ⁴	множественный рост
– 6	5×10 ³	1,9×10 ¹
– 7	5×10 ²	3
– 8	5×10 ¹	рост отсутствовал
– 9	5	рост отсутствовал
<i>B. holmesii</i> DSM 13416		
исходная	5×10 ⁹	сплошной рост
– 1	5×10 ⁸	сплошной рост
– 2	5×10 ⁷	сплошной рост
– 3	5×10 ⁶	густой рост
– 4	5×10 ⁵	множественный рост
– 5	5×10 ⁴	2,5×10 ¹
– 6	5×10 ³	7
– 7	5×10 ²	2
– 8	5×10 ¹	рост отсутствовал
– 9	5	рост отсутствовал

Таблица 4

Аналитическая чувствительность разработанной методики при использовании разных наборов для выделения ДНК

Вид м/о	Разведение	Значения порогового цикла (Ct)	
		Проба-ГС-плюс	РИБО-преп
<i>B. pertussis</i> № 143	5×10 ¹	49,08±0,0	35,36±2,53
	5×10 ²	30,23±3,61	34,38±2,73
	5×10 ³	28,42±3,40	37,08±3,44
<i>B. parapertussis</i> № 386	5×10 ¹	40,87±0,32	40,45±5,35
	5×10 ²	33,78±1,07	45,07±3,20
	5×10 ³	38,04±3,54	34,49±5,07
<i>B. holmesii</i> DSM 13416	5×10 ¹	32,56±2,01	32,31±2,04
	5×10 ²	28,35±1,01	27,05±0,13
	5×10 ³	26,16±0,76	24,05±0,29

Для подтверждения определённого уровня аналитической чувствительности нами было проведено 10 серий экспериментов с изучением точки разведения на уровне чувствительности. Во всех сериях экспериментов получены положительные результаты. При оценке аналитической чувствительности при выявлении ДНК *B. holmesii* в концентрациях 5×10¹-5×10⁵ КОЕ/мл (т. е. на уровне клинического образца) положительных сигналов по каналу Cy5/Red // IS481 – не обнаружено.

Кривые амплификации по трём каналам для контрольных образцов с концентрацией на уровне выявленной аналитической чувствительности приведены на рисунке.

Оценка аналитической специфичности разработанной методики генодиагностики проведена с использованием 17 типовых коллекционных штаммов микроорганизмов различных родов, колонизирующих ротоглотку, 87 свежевыделенных штаммов представителей рода *Bordetella* и 54 ДНК свежевыделенных штаммов микроорганизмов других родов из рабочей коллекции лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекции МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора. Для выявления перекрёстного реагирования использованы концентрированные образцы матриц не ниже 10⁹ ГЭ/мл. Оценка аналитической специфичности показала, что во всех образцах матриц, содержащих ДНК типовых коллекционных штаммов *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. holmesii* и свежевыделенных штаммов *B. pertussis*, *B. parapertussis*, регистрировали положительные сигналы (табл. 5).

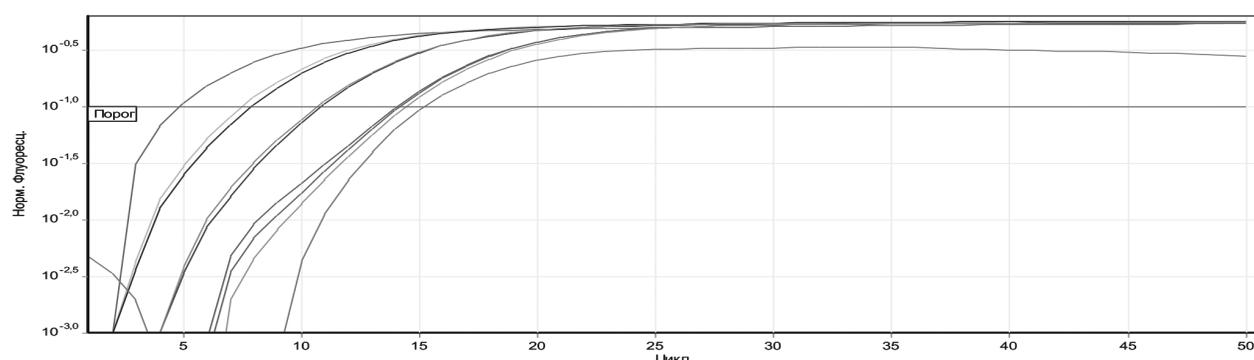
Перекрестных реакций обнаружения кривых в ходе ПЦР-РВ, свидетельствующих об амплификации посторонней мишени, во всех образцах, содержащих ДНК типового коллекционного штамма *B. bronchiseptica*, и во всех образцах, содержащих ДНК различных микроорганизмов, колонизирующих ротоглотку, положительных сигналов не обнаружено. Разработанная методика генодиагностики обладает 100% аналитической специфичностью.

Аналитическая надёжность диагностического теста оценена по частоте совпадения обнаружения ДНК *B. pertussis*, ДНК *B. parapertussis*, ДНК *B. holmesii* в многочисленных пробах одного и того же однородного образца трёх исследуемых микроорганизмов согласно (ГОСТ Р 53022.2-2008; ГОСТ Р 53079.1-2008) с определением сходности и воспроизводимости метода. В качестве контрольных образцов использованы типовые контрольные штаммы *B. pertussis* № 143, *B. parapertussis* № 386, *B. holmesii* DSM 13416. Для этого выращивали 72-часовые бактериальные культуры *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. holmesii* на плотной питательной среде Бордетеллагаре. Готовили однородные образцы: в 1 мл 0,9% раствора хлорида натрия (рН 7,0) суспендировали полную микробиологическую петлю каждой из трёх бактериальных культур. Готовили по 10 одинаковых

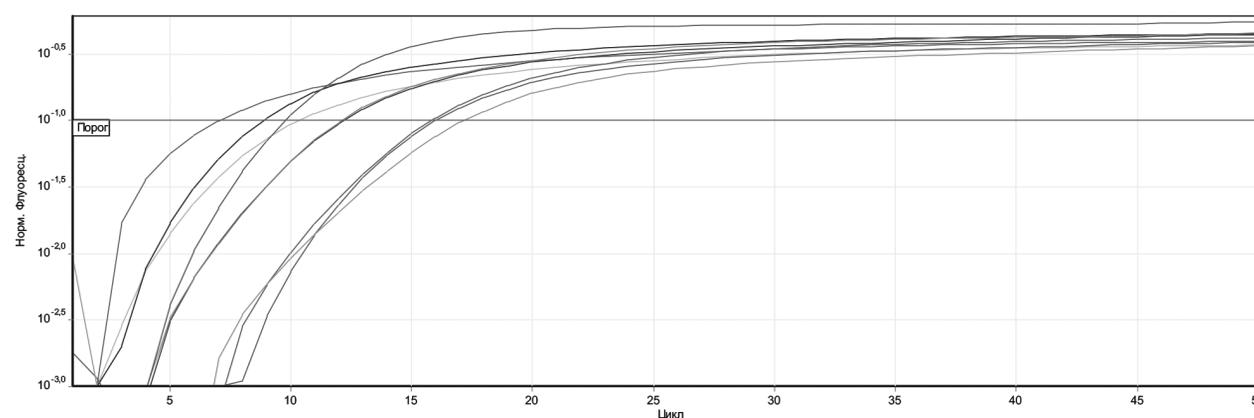
Таблица 5

Аналитическая специфичность праймеров

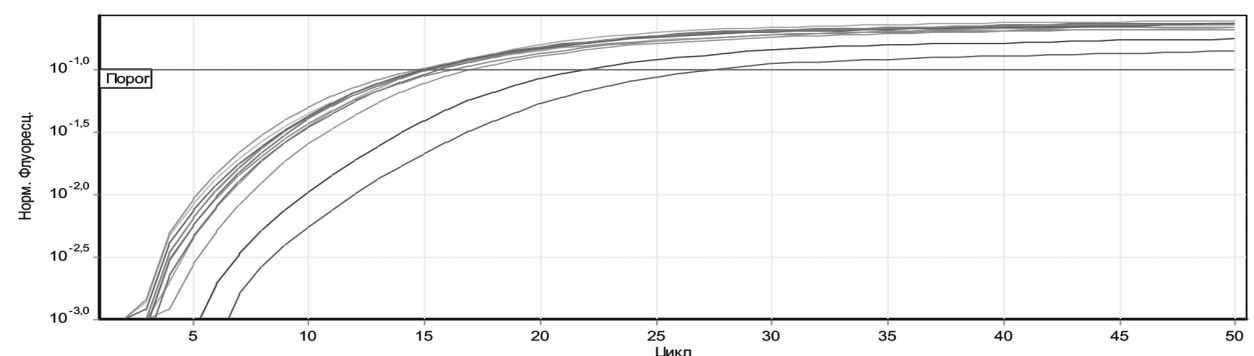
Мишень	Значения порогового цикла (Ct)			
	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. holmesii</i>	<i>B. bronchiseptica</i>
IS481	14,85±0,62	-	26,81±1,51	-
IS1001	-	16,89±0,87	-	-
hIS1001	-	-	5,13±0,04	-



а



б



в

Кривые амплификации по каналу FAM/Green для выявления ДНК *B. holmesii* (а), каналу Cy5/Red для выявления ДНК *B. pertussis* (б), каналу HEX/Yellow для выявления ДНК *B. parapertussis* (в).

проб, содержащих по 100 мкл бактериальной взвеси. Готовили реакционные смеси и проводили амплификацию в режиме реального времени с тестированием каждой пробы в трёх повторах.

Сходимость методики определена на 90 пробах при использовании одного и того же метода, в одной лаборатории, одним исследователем, одной партией реактивов, одного оборудования в пределах короткого промежутка времени (пяти рабочих дней). В результате экспериментальных исследований в 30 пробах с контрольными образцами, каждая из которых тестировалась в трёх повторах, ДНК *B. pertussis*, ДНК *B. parapertussis*, ДНК *B. holmesii* идентифицирована в 100% случаев. Воспроизводимость методики определена на многочисленных пробах одного и того же однородного образца, исследование которых

проведено одним и тем же методом двумя специалистами с использованием разных партий реактивов в различные рабочие дни. В результате проведённых экспериментов получены идентичные результаты у двух исследователей.

Заключение. Разработанная методика ускоренной генодиагностики на основе ПЦР-РВ в мультиплексном формате позволяет выявлять ДНК *B. pertussis*, ДНК *B. parapertussis*, ДНК *B. holmesii* в клиническом материале от больных, что расширяет возможности обследования больных коклюшем и коклюшеподобными заболеваниями. Разработанная методика позволит оценить распространённость *B. holmesii*, как возбудителя коклюшеподобного заболевания, оценить патогенный потенциал возбудителя и роль в эпидемическом процессе коклюшной инфекции в России.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 5-7, 10-17, 22-25)
см. REFERENCES

2. Попова О.П., Мазанкова Л.Н., Скирда Т.А., Бунин С.В., Власов Е.В. Клинико-диагностические особенности коклюша у детей старшего возраста. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2019; 64(4): 70-5. DOI: 10.21508/1027-4065-2019-64-4-70-75.
3. Пименова А.С., Борисова О.Ю., Цвиркун О.В., Басов А.А., Алешкин В.А., Афанасьев С.С. и др. Эффективность применения молекулярно-генетической диагностики при обследовании очагов коклюшной инфекции. *Инфекция и иммунитет*. 2017; 7(2): 162-70. DOI: 10.15789/2220-7619-2017-2-162-170.
4. Басов А.А., Цвиркун О.В., Герасимова А.Г., Зекорева А.Х. Проблема коклюша в некоторых регионах мира. *Инфекция и иммунитет*. 2019; 9(2): 354-62. DOI: 10.15789/2220-7619-2019-2-354-362.
8. Петрова М.С., Попова О.П., Борисова О.Ю., Абрамова Е.Н., Вартамян Р.В., Келли Е.И. Коклюш у детей раннего возраста. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2012; 6: 12-24.
9. Бабаченко И.В., Нестерова Ю.В., Чернышова Ю.Ю., Карасев В.В., Починяева Л.М., Калисникова Е.Л. Клинико-эпидемиологические аспекты коклюша у детей в условиях массовой вакцинопрофилактики. *Журнал Инфектологии*. 2019; 11(2): 88-96. DOI: 10.22625/2072-6732-2019-11-2-88-96.
18. Каратаев Г.И., Синяшина Л.Н., Медкова А.Ю., Семин Е.Г., Шевцова З.В., Матуа А.З. и др. Инсерционная инактивация оперона вирулентности в популяции персистирующих бактерий *Bordetella pertussis*. *Генетика*. 2016; 52(4): 422-30.
19. Борисова О.Ю., Гадуа Н.Т., Петрова М.С., Попова О.П., Комбарова С.Ю., Мазурова И.К. и др. Ускоренный молекулярно-генетический метод выявления возбудителя коклюша. *Медицинский альманах*. 2009; 2(7): 51-3.
20. Пименова А.С., Борисова О.Ю., Петрова М.С., Воронина И.С., Борисова А.Б., Шамшева О.В. и др. Эффективность применения изотермической амплификации при обследовании больных коклюшем. *Инфекция и иммунитет*. 2018; 8(3): 361-8.
21. Прадед М.Н., Яцышина С.Б., Селезнёва Т.С., Малинина С.В., Бирюлева Н.В., Любимова Т.Е. и др. ПЦР-диагностика инфекций, вызванных *B. pertussis*, *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica*. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; 1: 53-6.

REFERENCES

1. https://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/surveillance_type/passive/pertussis/en/. Accessed 6 April 2020.
2. Popova O.P., Mazankova L.N., Skirda T.A., Bunin S.V., Vlasov E.V. Clinical and diagnostic features of pertussis in older children. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii*. 2019; 64(4): 70-5. DOI: 10.21508/1027-4065-2019-64-4-70-75. (in Russian)
3. Pimenova A.S., Borisova O.Yu., Tsvirkun O.V., Basov A.S., Aleshkin V.A., Afanasiev S.S. et al. Efficiency of application of molecular-genetic diagnostics in case of inspection of the schools of a whooping cough. *Infektsiya i immunitet*. 2017; 7(2): 162-70. DOI: 10.15789/2220-7619-2017-2-162-170. (in Russian)
4. Basov A.A., Tsvirkun O.V., Gerasimova A.G., Zekoreeva A.Kh. The problem of pertussis in some geographic regions of the world. *Infektsiya i immunitet*. 2019; 9(2): 354-62. DOI: 10.15789/2220-7619-2019-2-354-362. (in Russian)
5. Nelson J.D. The changing epidemiology of pertussis in young infants: the role of adults as reservoirs of infection. *Am. J. Dis. Child*. 1978; 132(4): 371-3. DOI: 10.1001/archpedi.1978.02120290043006.
6. Kwon H.J., Yum S.K., Choi U.Y., Lee S.Y., Kim J.H., Kang J.H. Infant pertussis and household transmission in Korea. *J. Korean Med. Sci*. 2012; 27(12): 1547-51. DOI: 10.3346/jkms.2012.27.12.1547.
7. Wendelboe A.M., Hudgens M.G., Poole C., Van Rie A. Estimating the role of casual contact from the community in transmission of *Bordetella pertussis* to young infants. *Emerg. Themes Epidemiol*. 2007; 4: 15. DOI: 10.1186/1742-7622-4-15.
8. Petrova M.S., Popova O.P., Borisova O.Yu., Abramova E.N., Vartanyan R.V., Kelli E.I. Pertussis in children of early age. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni*. 2012; 6: 12-24. (in Russian)

9. Babachenko I.V., Nesterova Yu.V., Chernyshova Yu.Yu., Karasyov V.V., Pochinyayeva L.M., Kalisnikov E.L. Kliniko-epidemiologichesky aspects of whooping cough at children in the conditions of mass vaccinal prevention. *Zhurnal infektologii*. 2019; 11(2): 88-96. (in Russian)
10. Rodgers L., Martin S.W., Cohn A., Budd J., Marcon M., Terranella A. et al. Epidemiologic and laboratory features of a large outbreak of pertussis-like illnesses associated with cocirculating *Bordetella holmesii* and *Bordetella pertussis* – Ohio, 2010-2011. *Clin. Infect. Dis*. 2013; 56(3): 322-31. DOI: 10.1093/cid/cis888.
11. Kamiya H., Otsuka N., Ando Y., Odaira F., Yoshino S., Kawano K. et al. Transmission of *Bordetella holmesii* during pertussis outbreak, Japan. *Emerg. Infect. Dis*. 2012; 18(7): 1166-9. DOI: 10.3201/eid1807.120130.
12. Miranda C., Porte L., Garcia P. *Bordetella holmesii* in nasopharyngeal samples from Chilean patients with suspected *Bordetella pertussis* infection. *J. Clin. Microbiol*. 2012; 50: 1505. DOI: 10.1128/JCM.06747-11.
13. Fong W., Timms V., Holmes N., Sintchenko V. Detection and incidence of *Bordetella holmesii* in respiratory specimens from patients with pertussis-like symptoms in New South Wales, Australia. *Pathology*. 2018; 50(3): 322-6. DOI: 10.1016/j.pathol.2017.10.014.
14. Mooi F.R., Bruisten S., Linde I., Reubsaet F., Heuvelman K., van der Lee S. et al. Characterization of *Bordetella holmesii* isolates from patients with pertussis-like illness in Netherlands. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*. 2012; 64(2): 289-91. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2011.00911.x.
15. Lotfi M.N., Nikbin V.S., Nasiri O., Badmasti F., Shahcheraghi F. Molecular detection of *Bordetella holmesii* in two infants with pertussis-like syndrome: the first report from Iran. *Iran J. Microbiol*. 2017; 9(4): 219-23.
16. Mir-Cross A., Codina G., Martin-Gomez T.M., Fabrega A., Martinez X., Jane M. et al. Emergence of *Bordetella holmesii* as a Causative Agent of Whooping Cough, Barcelona, Spain. *Emerg Infect Dis*. 2017; 23(11): 1856-9. DOI: 10.3201/eid2311.170960.
17. Yih K.W., Silva E.A., Ida J., Harrington N., Lett S.M., George H. *Bordetella holmesii*-Like Organisms Isolated from Massachusetts Patients with Pertussis-Like Symptoms, Boston, Massachusetts, USA. *Emerg. Infect. Dis*. 1999; 5(3): 441-3.
18. Karataev G.I., Sinjashina L.N., Medkova A.Ju., Semin E.G., Shevcova Z.V., Matus A.Z. et al. Insertional inactivation of the virulence operon in a population of persistent bacteria *Bordetella pertussis*. *Genetika*. 2016; 52(4): 422-30. (in Russian)
19. Borisova O.Yu., Gadua N.T., Petrova M.S., Popova O.P., Kombarova S.Yu., Mazurova I.K. et al. Accelerated molecular genetic method of detection of pertussis agent. *Meditsinskiy al'manakh*. 2009; 2(7): 51-3. (in Russian)
20. Pimenova A.S., Borisova O.Yu., Petrova M.S., Voronina I.S., Borisova A.B., Shamsheva O.V. et al. Efficiency of application of isothermal amplification at inspection of patients with whooping cough. *Infektsiya i immunitet*. 2018; 8(3): 361-8. DOI: 10.15789/2220-7619-2018-3-361-368. (in Russian)
21. Praded M.N., Yatsyschyna S.B., Selezneva T.S., Malinina S.V., Biryuleva N.V., Lubimova T.Ye. et al. The kit of reagents for polymerase chain reaction diagnostic of infections caused by *B. pertussis*, *B. parapertussis* and *B. bronchiseptica*. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2013; 1: 53-6. (in Russian)
22. Van der Zee A., Groenendijk H., Peeters M., Mooi F.R. The differentiation of *Bordetella parapertussis* and *Bordetella pertussis* from humans and animals as determined by DNA polymorphism mediated by two different insertion sequence elements suggests their phylogenetic relationship. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 1996; 46: 640-7.
23. Glare E.M., Paton J.C., Premier R., Lawrence A.J., Nisbet L.T. Analysis of a repetitive DNA sequence from *Bordetella pertussis* and its application to the diagnosis of pertussis using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol*. 1990; 28: 1982-7.
24. Stibitz S. IS481 and IS1002 of *Bordetella pertussis* create a 6-base-pair duplication upon insertion at a consensus target site. *J. Bacteriol*. 1998; 180: 4963-6.
25. Reischl U., Lehn N., Sanden G.N., Loeffelholz M.J. Real-time PCR assay targeting IS481 of *Bordetella pertussis* and molecular basis for detecting *Bordetella holmesii*. *J. Clin. Microbiol*. 2001; 39: 1963-6.

Поступила 13.04.20

Принята к печати 15.05.20