

# СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К КОМПЛЕКСНЫМ ЛАБОРАТОРНЫМ ИССЛЕДОВАНИЯМ НА ДИФТЕРИЮ

Л.А. Краева<sup>1</sup>, Е.А. Алексеева<sup>2</sup>, Г.Я. Ценева<sup>1</sup>, Л.А. Липатова<sup>3</sup>,  
Г.И. Беспалова<sup>4</sup>

<sup>1</sup>ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>ФГУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Вологодской области, г. Вологда

<sup>3</sup>ФГУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Ленинградской области, Санкт-Петербург

<sup>4</sup>ГБОУ ВПО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова  
Минздрава России, Санкт-Петербург

**Резюме.** Установлены критерии достоверной оценки защищенности населения от дифтерии на основании двух показателей: количества суммарных антитоксических противодифтерийных антител и индекса avidности. Для этого предложено использовать модифицированный вариант иммуноферментного анализа с одновременным определением двух показателей. Выведены формулы расчета вероятности заболевания дифтерией в случае контакта с больным или носителем *Corynebacterium diphtheriae* и определения срока последующей ревакцинации. Разработаны «Алгоритм контроля иммунитета населения и оценки невосприимчивости к дифтерии» и «Алгоритм микробиологического исследования клинического материала на поиск *C. diphtheriae*».

**Ключевые слова:** дифтерия, поствакцинальный иммунитет, токсигенные штаммы.

## MODERN APPROACHES IN COMPLEX LABORATORY TESTING FOR DIPHTHERIA

Kraeva L.A., Alekseeva E.A., Tseneva G.Y., Lipatova L.A., Bepalova G.I.

**Abstract.** The criteria of reliable validation of population protection against diphtheria on the base of two indices including quantity of antitoxic antibodies to diphtheria and avidity index have been established. For this purposes it was proposed to use the modified variant of ELISA allowed to detect both indices simultaneously. The formula of probable development of diphtheria in case of the close contact with patients or *Corynebacterium diphtheriae* bacteria carriers as well as determination of revaccination time have been proposed. The authors developed “The algorithm of population immunity control and assessment of non-susceptibility to diphtheria” and “The algorithm of microbiological testing of clinical samples for *C. diphtheriae*”. (*Infekc. immun.*, 2012, vol. 2, N 4, p. 729–734)

**Key words:** diphtheria, post vaccination immunity, toxigenic strains.

## Введение

В настоящее время, спустя 15 лет после прошедшей эпидемии дифтерии, повсеместно отмечается снижение внимания клиницистов к этой инфекции. Профилактические обследования не проводятся, диагностические — проводятся, но не в полном объеме. В то же время по данным статистического анализа в Санкт-Петербурге,

и Северо-Западном регионе в целом регистрируются случаи носительства *Corynebacterium diphtheriae* и заболеваний дифтерией, преимущественно среди лиц из закрытых коллективов. По данным Elek-теста выделенные штаммы *C. diphtheriae* в основном нетоксигенные. Тем не менее, проведенные с помощью молекулярных методов исследования показали, что среди таких штаммов до 40% несут в себе «молчащий»

поступила в редакцию 10.07.2012  
отправлена на доработку 16.07.2012  
принята к печати 31.08.2012

© Краева Л.А. и соавт., 2012

### Адрес для переписки:

Краева Людмила Александровна,  
д.м.н., ведущий научный сотрудник  
лаборатории бактериальных капельных  
инфекций ФБУН НИИЭМ имени Пастера

197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,  
ФБУН НИИЭМ имени Пастера.  
Тел./факс: (812) 498-09-39.  
E-mail: lykraeva@yandex.ru,  
tsenevapasteur@yandex.ru

*tox+* ген [3, 12]. Несомненно, полимеразная цепная реакция (ПЦР) обладает более высокой чувствительностью и скоростью постановки [11, 13, 16, 17]. Однако результат ПЦР свидетельствует о наличии у микроорганизма гена токсигенности, который, как известно, может быть репрессированным и не проявлять себя в фенотипических тестах, таких как Elek-тест. Известно, что при определенных условиях действие гена-супрессора прекращается и штамм возобновляет способность продуцировать токсин [14].

Более того, в условиях бесконтрольного использования антибиотиков возможно частичное подавление роста и размножения микроорганизмов, попавших на слизистые оболочки, и как следствие — получение отрицательного результата при бактериологическом исследовании из-за временного снижения количества микроорганизмов в месте входных ворот инфекции или низкой активности дифтерийного токсина, которую не всегда удается выявить с помощью Elek-теста [10]. Таким образом, объективно требуется улучшение качества лабораторной диагностики, направленной на поиск *C. diphtheriae*.

С другой стороны, защищенность от дифтерии, согласно нормативным документам, в нашей стране определяется с помощью реакции прямой гемагглютинации (РПГА) [7, 8]. Однако результат реакции, выражаемый в титрах, не позволяет точно определить количество антитоксических антител (АТ-АТ). Разработка ВОЗ и повсеместное внедрение в практику оценочной шкалы защищенности от дифтерии на основании определения количества АТ-АТ позволили контролировать качество вакцинации [15]. Однако информация о количестве вырабатываемых противодифтерийных антител не всегда дает достоверный ответ на вопрос о степени защищенности от дифтерии. Это было продемонстрировано во время последней эпидемии дифтерии в России и после нее, когда у заболевших (до 40% случаев) находили в крови АТ-АТ защитных уровней [1, 6, 9]. Ранее проведенными исследованиями была установлена определяющая роль высокоавидных АТ-АТ в защите от дифтерии, которые могут быть определены наряду с количеством суммарных АТ-АТ в иммуноферментном анализе [4]. При этом была показана динамика формирования и утраты АТ-АТ, равно как и показателя их авидности, изучены особенности специфического иммунитета к дифтерии среди различных групп населения. Тем не менее, отсутствие программ и схем исследования при диагностике дифтерии и изучении напряженности иммунитета у населения, содержащих новые аргументированные данные, не позволяют полноценно и качественно проводить бактериологический и иммунологический контроль в отношении

дифтерии на местах. Поэтому целью работы явилась разработка алгоритмов комплексного лабораторного исследования на дифтерию.

## Материалы и методы

В работе использованы 650 штаммов *C. diphtheriae*, выделенных в Санкт-Петербурге, Ленинградской и Вологодской областях в 1995–2010 гг., 1520 образцов сыворотки крови взрослых лиц, а также референс-штаммы *C. diphtheriae* № 10356 (*tox*–), № 10648 (*tox*+) и № 3984 (*tox*+/-) из NCTC (National Collection of Type Cultures Diphtheriae Reference Laboratory, Central Health Laboratory (CPHL), London, UK).

Для реализации поставленной цели использованы следующие методы: микробиологические, включая исследования по стандартным методикам, прилагаемым к диагностическим наборам, иммунологические (иммуноферментный анализ (ИФА), РПГА и реакция нейтрализации (РН) на клетках Vero, полученных из лаборатории детских инфекций ФБУН НИИЭМ им. Пастера), эпидемиологические (с оценкой характеристики выбранных контингентов), методы математической обработки данных, а также разработанные авторами «Экспресс-способ выявления потенциальной токсигенности у штаммов *C. diphtheriae*» и «Экспресс-способ выявления дифтерийного токсина на основе микротехнологий».

## Результаты

### Определение защищенности населения от дифтерии на основе модернизации серологического мониторинга

По данным центров госсанэпиднадзора в Северо-Западном регионе РФ в постэпидемические годы до 50% лиц, заболевших дифтерией, содержали в крови защитные уровни АТ-АТ, выявляемые с помощью регламентированного метода РПГА. В связи с этим были проведены параллельные исследования образцов сыворотки крови от 350 лиц в трех используемых в нашей стране методах: РН на культуре клеток Vero, в РПГА и ИФА.

Полученные результаты показали, что коэффициент корреляции между результатами исследования сывороток в РПГА и классической РН на культуре клеток Vero составил  $r = 0,5$ . Между тем, этот показатель для ИФА и РН (Vero) составил 0,95 с уровнем достоверности  $p < 0,05$ . Результаты ИФА выражали в международных единицах, что соответствует международным критериям.

В результате исследования образцов сывороток крови заболевших дифтерией лиц с помощью ИФА было установлено, что 29% из них содержали АТ-АТ в количестве  $> 0,1$  МЕ/мл, которые по международным и национальным

критериям защищенности рассматриваются как обеспечивающие невосприимчивость к дифтерии. Поэтому дальнейшие исследования были посвящены изучению качества АТ-АТ и их роли в защите от дифтерии.

Для исследования были выбраны две панели из 185 образцов сывороток крови, взятых от больных дифтерией (на 3–5 день заболевания, не получавших в этот период лечебной противодифтерийной сыворотки) и контактных лиц, кровь от которых была взята на 1–2-й неделе после контакта с заболевшим дифтерией. Сравнивали не только уровни суммарных АТ-АТ, но и их avidность. При этом среднее значение индекса avidности (ИА) в группе заболевших дифтерией составило 17,5%, а в группе не заболевших дифтерией — 64% (рис. 1).

С помощью математической обработки данных установлено, что ИА более 30% соответствует вероятности защиты от заболевания дифтерией на 95%, а ИА, равный 10%, является показателем критического уровня, ниже которого вероятность заболевания возрастает до 99% ( $p < 0,001$ ).

С помощью математического анализа был выведен комплексный показатель (КП), получаемый из данных о количестве АТ-АТ и ИА, который указывает на вероятность заболевания дифтерией у данного обследуемого в случае его контакта с дифтерийным больным. При этом коэффициент Стьюдента ( $t$ ) = 16,4; достоверность ( $p$ ) < 0,001, а коэффициент Фишера ( $F$ ) = 83,7,  $p < 0,001$ .

Наиболее достоверные результаты получены при использовании дискриминантного анализа. При этом степень достоверности выведенных формул была наивысшей ( $p = 5,64E-26$ ). В результате примененного статистического анализа выведена формула расчета вероятности заболевания человека дифтерией по двум известным показателям: АТ-АТ и ИА путем использования их производной — КП. Для этого сначала необходимо рассчитать функцию для лиц, не заболевших дифтерией:

$$y_0 = -3,805 + 0,49 \cdot КП, \quad (1)$$

где  $КП = АТ-АТ \cdot ИА$  (2)

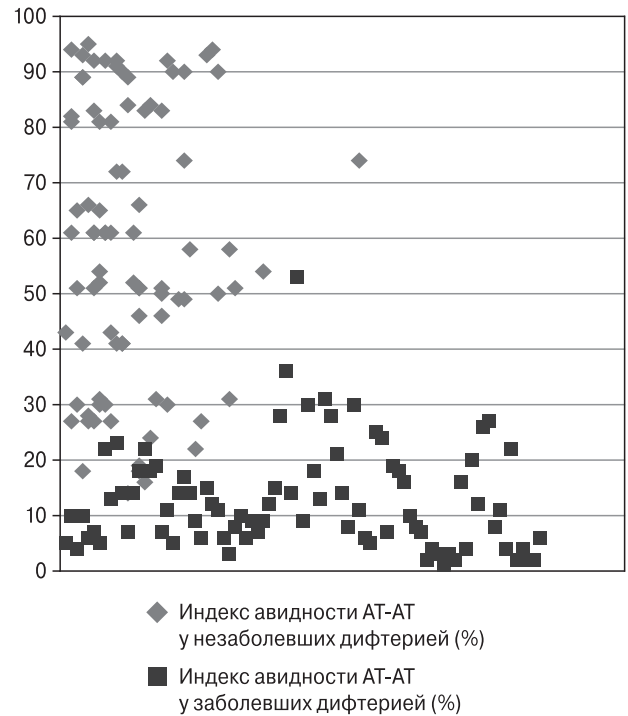
Затем рассчитывается функция для лиц, заболевших дифтерией:

$$y_1 = -0,713 + 0,017 \cdot КП \quad (3)$$

Если значение  $y_1 > y_0$ , то вероятность заболеть дифтерией, чем не заболеть. Для расчета вероятности заболевания дифтерией (ВЗд) получена следующая формула:

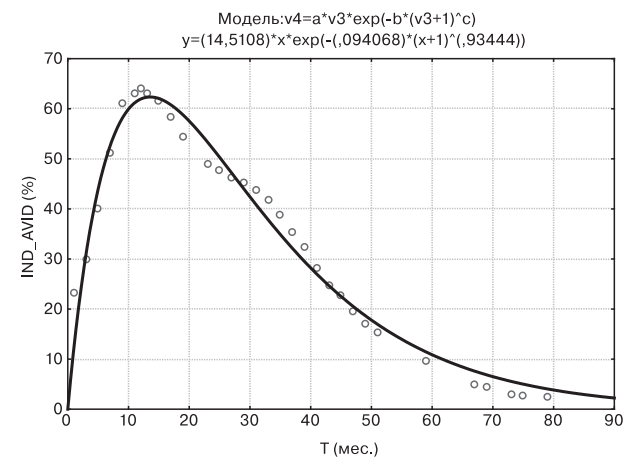
$$ВЗд = 0,82 - 0,05 \cdot КП \quad (4)$$

Показатель вероятности заболевания может варьировать от 0 до 1: чем выше показатель, тем выше вероятность заболевания.



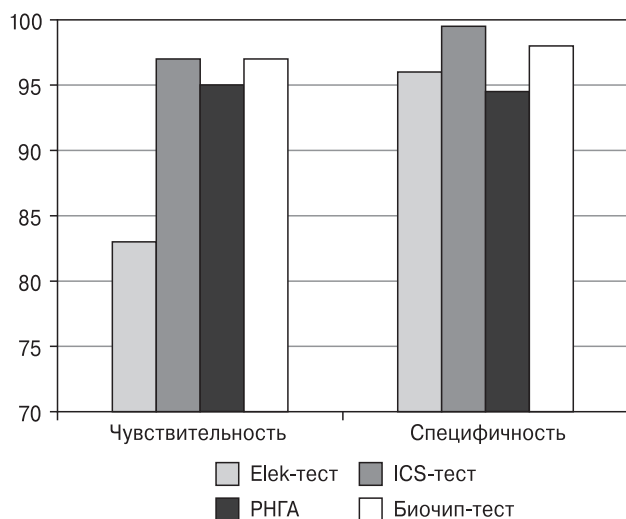
**Рисунок 1. Результаты определения ИА АТ-АТ в двух группах сывороток**

Поскольку avidность антител, как показано, имеет определяющее значение при оценке защищенности от дифтерии, была установлена динамика их накопления и утраты. При этом созревание высокоавидных антител достигает максимума в среднем через год после ревакцинации, в то время как наибольшее количество суммарных антитоксических антител образуется через 6–9 месяцев. Период регрессии для суммарных антител более длителен, чем для высокоавидных: через 5 лет после очередной ревакцинации индекс avidности антител до-



**Рисунок 2. Математическая модель динамики индексов avidности после ревакцинации**

**Примечания.** IND\_AVID (%) — индексы avidности (%), Т (мес.) — время после ревакцинации (месяцы). Средняя погрешность модели = 5%.



**Рисунок 3. Сравнение диагностической эффективности различных методов определения токсигенности у штаммов *C. diphtheriae***

стигает минимального (критического) уровня (10%), в то время как количественное содержание анитоксических антител остается в пределах защитных уровней (0,1–0,5 МЕ/мл) и снижается до критических значений (0,01 МЕ/мл) к 7–8-му году после ревакцинации.

Поскольку avidность антител, защищающая от заболевания дифтерией, снижается быстрее, чем количественный показатель суммарных антител, то в прогнозе необходимо ориентироваться на индекс avidности антител. Для этого на графике, представляющем собой математическую модель из исходных данных о динамике индексов avidности после ревакцинации (рис. 2), находим значение, наиболее приближенное к полученному индексу avidности антител (с учетом предыдущей вакцинации) и определяем по графику: через сколько месяцев индекс avidности снизится до критической отметки (10%). Очередную ревакцинацию (или повторное исследование) рекомендуется пройти до этой даты.

Кроме того, полученные данные о различиях в защите от дифтерии некоторых социальных и профессиональных групп аргументируют необходимость дифференцированного подхода к отбору лиц для серологического мониторинга и коррекции защищенности от заболевания.

### **Совершенствование лабораторной диагностики по своевременному выявлению токсигенных штаммов *C. diphtheriae***

Ранее проведенными исследованиями [5] было показано, что низкоинтенсивное лазерное излучение (НИЛИ) индуцирует выработку токсина штаммами *C. diphtheriae*, несущими *tox+* ген. При этом наибольший эффект (увеличение

в 2 раза) отмечался в отношении тех штаммов, которые имели низкие уровни токсинопродукции, то есть могли остаться неучтенными при визуальной оценке токсигенности в Elek-тесте.

Кроме того, после воздействия НИЛИ на штаммы *C. diphtheriae* с «молчащим» геном, у 45% из 80 штаммов наступало восстановление токсинопродукции, регистрируемое в РНГА и Elek-тесте.

Однако определение токсигенности штаммов *C. diphtheriae* с помощью Elek-теста весьма субъективно. Поэтому нами ранее был разработан высокочувствительный способ детекции дифтерийного токсина, основанный на использовании в диагностическом наборе высокоавидных анитоксических противодифтерийных антител и современных микро-технологий [2].

Разработанный экспресс-способ обладает высокой диагностической эффективностью. При количественной оценке чувствительность способа составила 0,001 Lf/ml дифтерийного токсина, что выше показателей любого имеющегося в настоящее время метода детекции дифтерийного токсина. Из всех фенотипических методов разработанный способ обладает наилучшими показателями по скорости пробоподготовки, проведения реакции, а также возможности одновременной постановки большого количества проб (рис. 3).

Высокая эффективность предложенных способов и скорость осуществления наряду с низкими финансовыми затратами позволяют широко использовать их как в научных, так и в практических целях.

### **Обсуждение**

Результаты статистической обработки данных позволили убедиться в том, что для контроля уровня иммунитета к дифтерии целесообразней использовать метод ИФА вместо РПГА, что соответствует международным стандартам. Показатель ИА АТ-АТ имеет большую достоверность (99%), чем уровень суммарных АТ-АТ (71%) при оценке защищенности от дифтерии, что объясняет, почему отмечались случаи заболевания дифтерией среди лиц, имеющих в крови защитные уровни суммарных антител. Однако наибольшую достоверность при оценке защищенности от дифтерии имеет КП. Поэтому в инструкцию по применению отечественной тест-системы включены дополнения по методике определения индекса avidности антител.

Более того, использование современного математического аппарата позволило разработать методику определения сроков последующей ревакцинации обследуемого. При отсутствии данных о защищенности отдельных лиц необходимо отталкиваться от следующей общей

тенденции: к 7–8 году после очередной ревакцинации уровень противодифтерийных АТ-АТ снижается до самых низких защитных уровней, в то время как ИА антител снижается до ниже «порогового» уровня уже через 5 лет. Поэтому контроль популяционного иммунитета необходимо проводить в эти сроки, так же как и планировать очередную ревакцинацию среди незащищенных лиц.

Выявление групп «риска» среди населения позволило сделать вывод о необходимости проведения периодических профилактических обследований среди лиц старше 50 лет, медицинских работников, рабочих промышленных предприятий с вредными условиями труда. Более того, выявление носителей токсигенных штаммов *S. diphtheriae* в психоневрологических интернатах говорит о целесообразности регулярных обследований контингентов в закрытых коллективах, например, 2 раза в год, для предотвращения циркуляции возбудителя и контроля защищенности от дифтерии вновь поступивших лиц.

Результатом проведенной работы явилась разработка алгоритма контроля иммунитета населения и оценки невосприимчивости к дифтерии как отдельных лиц, так и коллективов по этапам:

1. отбор крови, заполнение анкеты в БД (возраст, прививочный статус, профессия, хроническое заболевание, дата заболевания);
2. определение АТ-АТ и ИА;
3. определение вероятности заболевания по формулам;
4. определение сроков ревакцинации или повторного контроля иммунитета.

Считаем обоснованным в периоды подъемов уровней заболеваемости ЛОР-органов всех диагностических больных обследовать на дифтерию. Нетоксигенные по данным Elek-теста штаммы *S. diphtheriae* необходимо контролировать с помощью полимеразной цепной реакции на предмет наличия «молчащего» гена токсигенности. Источников штаммов с «молчащим» геном необходимо обследовать клинически и эпидемиологически и проводить санацию.

Разработка способа усиления токсинопродукции штаммами *S. diphtheriae* и высокочувствительного экспресс-способа выявления дифтерийного токсина позволили разработать алгоритм микробиологического исследования клинического материала на поиск *S. diphtheriae* по этапам:

1. Выделение из клинического материала коринебактерий. Определение вида и биохимического варианта.
2. Определение токсигенности с помощью Elek-теста. Определение токсигенности в ПЦР.

3. Если штамм не имеет *tox+* гена, то выдается окончательный отрицательный ответ. Если же штамм имеет *tox+* ген, то его нужно простимулировать с помощью НИЛИ.
4. Повторное определение токсигенности в микрочиповом тесте и выдача окончательного ответа по результатам теста.

## Список литературы

1. Васильев К.Г., Савчук А.И. Клинико-эпидемиологические аспекты вакцинации против дифтерии // Первый конгресс педиатров-инфекционистов России. — М., 2002. — С. 26.
2. Краева Л.А., Зимица Т.М., Ценева Г.Я., Соловьев А.В. Микротехнологии в экспресс-диагностике токсигенных штаммов *S. diphtheriae* // ЖМЭИ. — 2011. — № 3. — С. 62–66.
3. Краева Л.А., Ценева Г.Я. Особенности биологических свойств *S. diphtheriae*, циркулирующих в постэпидемический период // ЖМЭИ. — 2009. — № 3. — С. 3–6.
4. Краева Л.А., Ценева Г.Я., Николаева А.М., Алексеева Е.А. Роль высокоavidных антитоксических антител в оценке невосприимчивости к дифтерийной инфекции // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2011. — № 4. — С. 20–24.
5. Краева Л.А., Ценева Г.Я., Сбойчаков В.Б., Беспалова Г.И. Способ ускоренного определения токсигенности *S. diphtheriae* // Вестник Российской военно-медицинской академии. — 2010. — № 4 (32). — С. 144–147.
6. Матохина А.Г. Исследование специфического иммунитета у больных дифтерией // VI Росс. съезд врачей-инфекционистов. — СПб., 2003. — С. 243.
7. МУ 3.1.2943-11.3.1. Профилактика инфекционных болезней. Организация и проведение серологического мониторинга состояния коллективного иммунитета к инфекциям, управляемым средствами специфической профилактики (дифтерия, столбняк, коклюш, корь, краснуха, эпидемический паротит, полиомиелит, гепатит В). Методические указания (утв. Роспотребнадзором 15.07.2011.).
8. СП 3.1.2.1108-02 «Профилактика дифтерии».
9. Харченко Г.А., Чанпалова Л.С., Харченко О.Г. Дифтерия у привитых детей // VI Росс. съезд врачей-инфекционистов. — СПб., 2003. — С. 413–414.
10. Ценева Г.Я., Краева Л.А., Габриелян С.А., Щедеркина Е.Е. Методы определения токсигенности у штаммов *S. diphtheriae* // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. — Иркутск, 2005. — № 7. — С. 182–186.
11. Ценева Г.Я., Щедеркина Е.Е. Применение полимеразной цепной реакции в диагностике дифтерийной инфекции // ЖМЭИ. — 2000. — № 5. — С. 72–74.
12. Щедеркина Е.Е. Основные патогенные свойства *S. diphtheriae* и усовершенствование лабораторной диагностики дифтерийной инфекции. — Дис. ... канд. мед. наук. — СПб., 2001. — 132 с.
13. Aravena-Roman M., Bowman R., O'Neill G. Polymerase chain reaction for the detection of toxigenic

- Corynebacterium diphtheriae* // Pathol. — 1995. — N 27. — P. 71–73.
14. Cianciotto N.P., Groman N.B. Characterization of bacteriophages from tox-containing, non-toxigenic isolates of *Corinebacterium diphtheriae* // Microbial Pathog. — 1997. — Vol. 22. — P. 343–351.
  15. Efstratiou A., Maple P.A.C. Manual for the laboratory diagnosis of diphtheria. Copenhagen: The Expanded Programme on Immunization in the European Region of WHO. — 1994 (ICP/EPI038).
  16. Mikhailovich V.M., Melnikov V.G., Mazurova I.K. Application of PCR for detection of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains isolated during the Russian diphtheria epidemic, 1990 through 1994 // J. Clin. Microbiol. — 1995. — Vol. 33. — P. 3061–3063.
  17. Pallen M.J., Hay A.J., Puckey L.H. Polymerase chain reaction for screening clinical isolates of corynebacteria for the production of diphtheria toxin // J. Clin. Pathol. — 1994. — Vol. 47. — P. 353–356.