

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ПРИ ОБСЛЕДОВАНИИ ОЧАГОВ КОКЛЮШНОЙ ИНФЕКЦИИ

А.С. Пименова¹, О.Ю. Борисова^{1,2}, О.В. Цвиркун¹, А.А. Басов¹, В.А. Алешкин¹,
С.С. Афанасьев¹, Е.Е. Донских², А.П. Пикина², Л.И. Кафарская²,
М.С. Афанасьев³, А.В. Караулов³

¹ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия

²ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

³ФГБОУ ВО Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия

Резюме. Цель исследования: оценка эффективности применения молекулярно-генетической диагностики при обследовании контактных лиц в очагах коклюшной инфекции. *Материалы и методы.* Под наблюдением находилось 4930 человек из 8 общеобразовательных учреждений г. Москвы и Московской области в период с 2012 по 2015 гг. Изучено 430 проб клинического материала. В исследование были включены учащиеся 1–9, 11 классов и работники образования различных категорий. Исследования проводили согласно методическим рекомендациям МР 3.1.2.0072-13. Экстракцию ДНК *B. pertussis* из исследуемых образцов проводили с помощью тест-системы «АмплиПрайм® ДНК-сорб-АМ». Выявление специфических фрагментов генома возбудителя коклюша осуществляли методом ПЦР-РТ с помощью тест-системы «АмплиСенс® Bordetella multi-FL» и методом ПЦР при изотермальных условиях с оригинальной комбинацией праймеров. *Результаты.* Из обследуемых контактных лиц в очагах коклюшной инфекции в 80,9% были дети и 19,1% — взрослые. В трех из восьми образовательных учреждений ранее были выявлены случаи коклюша у 7 детей в возрасте 7, 9, 11 и 15 лет. Диагноз коклюша у них был подтвержден в одном случае с помощью бактериологического метода и в шести случаях — с помощью серологических методов (ИФА и РНГА). Обнаружено 33 положительных ДНК-образца (7,7% от общего числа проб). ДНК-положительные образцы выделены от 18 учащихся и 15 работников образовательных учреждений. Среди учащихся положительные образцы в основном обнаружены у учеников 4-х классов в возрасте 10–11 лет. Среди работников образовательных учреждений ДНК-положительные образцы в большинстве (33,3%) случаев выделены от педагогов, а также от медицинского персонала и работников столовой. В двух очагах, где ранее были установлены источники инфекции, обнаружено 15 ДНК-положительных образцов, при этом у троих обследованных с ДНК-позитивными пробами наблюдались клинические проявления. В тех оча-

Адрес для переписки:

Борисова Ольга Юрьевна
125212, Россия, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10,
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского.
Тел.: 8 (499) 747-64-84 (служебн.); 8 916 147-19-60 (моб.).
Факс: 8 (495) 452-18-30.
E-mail: olgborisova@mail.ru

Contacts:

Olga Yu. Borisova
125212, Russian Federation, Moscow, Admiral Makarov str., 10,
G.N. Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology.
Phone: +7 (499) 747-64-84 (office); +7 916 147-19-60 (mobile).
Fax: +7 (495) 452-18-30.
E-mail: olgborisova@mail.ru

Библиографическое описание:

Пименова А.С., Борисова О.Ю., Цвиркун О.В., Басов А.А., Алешкин В.А.,
Афанасьев С.С., Донских Е.Е., Пикина А.П., Кафарская Л.И.,
Афанасьев М.С., Караулов А.В., Бессолицына Е.А., Волков С.А.,
Столбова Ф.С. Эффективность применения молекулярно-генетической
диагностики при обследовании очагов коклюшной инфекции //
Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 2. С. 162–170. doi: 10.15789/2220-
7619-2017-2-162-170

Citation:

Pimenova A.S., Borisova O.Yu., Tsvircun O.V., Basov A.S., Aleshkin V.A.,
Afanasiev S.S., Donskich E.E., Pikina A.P., Kafarskaya L.I., Afanasiev M.S.,
Karaulov A.V. Efficiency of application of molecular-genetic diagnostics
in case of inspection of the schools of a whooping cough // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2017, vol. 7, no. 2, pp. 162–
170. doi: 10.15789/2220-7619-2017-2-162-170

гах, где ранее не был установлен источник инфекции и проводили обследования длительно кашляющих детей, обнаружено 18 ДНК-положительных образцов, причем у двух обследованных с ДНК-положительными пробами отмечались клинические проявления в виде кашля. *Заключение.* Проведенные исследования подтвердили высокую эффективность применения молекулярно-генетических методов при обследовании очагов коклюшной инфекции для установления источника инфекции и при наличии длительно кашляющих детей.

Ключевые слова: коклюш, молекулярно-генетическая диагностика, полимеразная цепная реакция (ПЦР), ПЦР в режиме реального времени, изотермальная амплификация, *Bordetella pertussis*.

EFFECTIVENESS OF MOLECULAR-GENETIC DIAGNOSTICS DURING PERTUSSIS INFECTION FOCI EXAMINATION

Pimenova A.S.^a, Borisova O.Yu.^{a,b}, Tsvircun O.V.^a, Basov A.S.^a, Aleshkin V.A.^a, Afanasiev S.S.^a, Donskich E.E.^b, Pikina A.P.^b, Kafarskaya L.I.^b, Afanasiev M.S.^c, Karaulov A.V.^c

^a G.N. Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

^b The Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russian Federation

^c Sechenov Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Purpose: whooping cough diagnostics by molecular-genetic methods. *Materials and methods.* Under observation there were 4930 people during the period from 2012 to 2015. All samples were received in 8 schools of Moscow and the Moscow region: in 3 schools had been found children with whooping cough, in other 5 schools – only children with prolonged cough. Whooping cough diagnosis had been given earlier by bacteriological and serological methods. 430 clinical samples were studied by 2 methods: PCR with fluorescent hybridized detection of amplified products and isothermal amplification. *Results.* In three of eight schools whooping cough cases at 7 children at the age of 7, 9, 11 and 15 years were revealed earlier. The diagnosis of whooping cough at them was confirmed by means of bacteriological and serological methods. 33 positive DNA samples (7.7%) are revealed. DNA-positive samples are allocated from 18 pupils and 15 employees of schools. In two schools where earlier infection sources were established, 15 DNA-positive samples from which in three cases clinical manifestations were observed are revealed. In those schools where it wasn't earlier established a source of an infection and examinations conducted it is long the coughing children, 18 DNA-positive samples are revealed, and in two cases clinical manifestations in the form of cough were observed. *Conclusion.* Performed research confirmed high effectiveness of molecular-genetic methods during pertussis infection foci examination in schools for infection source identification also amongst long coughing children.

Key words: whooping cough, molecular-genetic methods, polymerase chain reaction (PCR), real-time PCR, isothermal amplification, *Bordetella pertussis*.

Введение

Коклюш — инфекционное респираторное заболевание человека, вызываемое граммотрицательными бактериями *Bordetella pertussis*, характеризующееся тяжелым течением, высокой летальностью у новорожденных и детей первого года жизни, которая обусловлена развитием различного вида осложнений. Передача инфекции происходит воздушно-капельным путем и возможна только при тесном общении с больным или носителем; индекс контагиозности колеблется от 0,7 до 1,0.

Несмотря на успехи вакцинации, коклюш остается причиной детской morbidity и летальности и серьезной проблемой общественного здравоохранения во всем мире. По данным ВОЗ, в мире ежегодно заболевает коклюшем около 60 млн человек и умирает около 1 млн детей, преимущественно в возрасте до 1 года жизни [15].

Массовая специфическая иммунопрофилактика коклюша в Российской Федерации привела к значительному улучшению эпидемиологической обстановки и показала социально-экономическую значимость вакцинопрофилактики для поддержания санитарно-эпидемиологического благополучия по этой инфекции в России [1, 3]. Благодаря достижению и поддержанию высокого охвата вакцинацией и ревакцинацией АКДС-вакциной, заболеваемость коклюшем в Российской Федерации за последние 5 лет стабилизировалась на уровне 3,0–5,0 на 100 тыс. населения [4]. Во внутригодовой динамике наблюдается сглаживание цикличности, что свидетельствует о снижении роли сезонных факторов в поддержании эпидемического процесса коклюша. Несмотря на это, регистрируются локальные вспышки с формированием очагов разной интенсивности в школьных коллективах. Как известно, в очагах коклюшной инфекции прививки

контактным лицам не проводятся, а противоэпидемические мероприятия в соответствии с Санитарно-эпидемиологическими правилами 3.1.2.3162-14 «Профилактика коклюша» сводятся к медицинскому наблюдению и выявлению кашляющих детей для бактериологического или молекулярно-генетического обследования с диагностической целью.

Учитывая, что технологии, основанные на различных вариантах амплификации фрагментов генома возбудителей инфекционных заболеваний, получили широкое распространение [1, 8, 9, 10, 12] благодаря возможности ускоренной прямой детекции микроорганизма, высокой чувствительности, специфичности и воспроизводимости, целью работы явилась оценка целесообразности и эффективности применения молекулярно-генетической диагностики при обследовании контактных лиц в очагах коклюшной инфекции.

Материалы и методы

Исследовано 430 проб клинического материала, полученных в 2012–2015 гг. от контактных лиц из очагов коклюшной инфекции в образовательных учреждениях г. Москвы и Московской области.

В исследование были включены учащиеся 1–9, 11 классов и работники образования различных категорий (административно-управленческий персонал, педагогические работники, медицинские работники, работники столовой, технический и обслуживающий персонал), что составило 80,9 и 19,1% соответственно. Среди обследованных 59,1% приходился на долю женщин, а 40,9% — на долю мужчин. Возрастной состав был представлен следующим образом: в возрасте 6–7 лет — 6 (1,4%), 8–9 лет — 97 (22,6%), 10–11 лет — 106 (24,6%), 12–13 лет — 46 (10,7%), 14–15 лет — 92 (21,4%), 16–17 лет — 1 (0,2%), 20–29 лет — 5 (1,2%), 30–39 лет — 18 (4,2%), 40–49 лет — 19

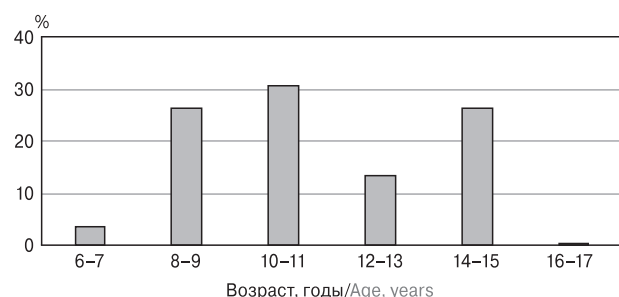


Рисунок 1. Возрастная структура обследуемых учащихся

Figure 1. Age structure of examined pupils

(4,4%), 50–59 лет — 27 (6,3%), 60–69 лет — 11 (2,5%) и 70–79 лет — 2 (0,5%). У 10 (2,3%) обследуемых на момент забора биологического материала отмечалось наличие клинических проявлений респираторной инфекции.

Взятие клинического материала с задней стенки ротоглотки производили двумя стерильными одноразовыми сухими коммерческими тампонами («Сорап», Италия) с последующим их помещением в пробирку типа эппендорф с транспортной средой; доставку, хранение и подготовку биологического материала к ПЦР-исследованию осуществляли в соответствии с МР 3.1.2.0072-13 «Диагностика коклюша и паракоклюша». Экстракцию ДНК *B. pertussis* из исследуемых образцов проводили согласно инструкции по применению комплекта реагентов «АмплиПрайм® ДНК-сорб-АМ» (ООО «НекстБио», Москва).

Выявление специфических фрагментов генома возбудителя коклюша осуществляли методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в соответствии с инструкцией по применению набора реагентов «АмплиСенс® Bordetella multi-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва). Анализ и интерпретацию результатов проводили с помощью программного обеспечения прибора для проведения ПЦР в режиме «реального времени» Rotor-Gene Q 5 plex HRM («QIAGEN GmbH», ФРГ) согласно методическим рекомендациям по применению набора реагентов «АмплиСенс® Bordetella multi-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва).

Также специфические фрагменты генома возбудителя коклюша выявляли методом ПЦР при изотермальных условиях с оригинальной комбинацией праймеров. Реакционная смесь содержала 10x буфер ПЦР, 25 mM MgCl₂, 2 mM dNTP, Bst полимеразу и три пары праймеров — BP-F3 и BP-B3, BP-F1P и BP-B1P, BP-LF и BP-LB — в окончательном объеме 27 мкл. Амплификацию выполняли в изотермальном режиме: 65°C — 60 мин; 80°C — 2 мин. Детекцию продуктов амплификации проводили путем горизонтального электрофореза в 2,0% агарозном геле при 120 В в течение 1 ч с последующим сравнением электрофоретической подвижности полученных фрагментов ДНК *B. pertussis* с подвижностью контрольного образца. В качестве положительного контроля ПЦР использовали ДНК *B. pertussis* №143 (ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, Оболенск). Учет результатов реакции осуществляли с помощью гель-документирующей системы с выдвижным трансиллюминатором Quantum-ST-4-1100/26M («Vilber Lourmat», Франция).

Результаты

Проведено первичное обследование контактных лиц в 8-ми очагах коклюшной инфекции в образовательных учреждениях г. Москвы и Московской области в период с 2012 по 2015 гг. Под медицинским наблюдением в общей сложности находилось 4930 человек. Клинический материал получен от 430 людей.

Из обследуемых контактных лиц в очагах коклюша 80,9% составили дети и 19,1% — взрослые. Среди обследуемых детей, большинство (84,8%) составили дети возрастных групп — 8–9, 10–11 и 14–15 лет (рис. 1).

Среди взрослых преобладали (64%) лица в возрасте 30–39, 40–49 и 50–59 лет (рис. 2).

В трех из восьми образовательных учреждениях ранее были выявлены случаи коклюша у 7 детей в возрасте 7, 9, 11 и 15 лет, которые были учениками 1, 3–5 и 9 классов, из них четверо детей были из одного очага. Диагноз коклюша у них был подтвержден в одном случае (14,3%) с помощью бактериологического метода и в 6 случаях (по 42,8%) — с помощью серологических методов (ИФА и РНГА). В остальных пяти образовательных учреждениях были проведены обследования контактных лиц с целью выявления больных на разных стадиях заболевания и источника инфекции с помощью молекулярно-генетических методов диагностики.

Выявление специфических фрагментов генома возбудителя коклюша осуществляли двумя методами — методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации с помощью тест-системы «АмплиСенс® Bordetella multi-FL» и методом изотермальной амплификации с оригинальной комбинацией праймеров.

В очаге № 1 всего под наблюдением находилось 263 человека и обследовано 28 человек, из них в возрасте 20–29 лет — 3,6%, 30–39 лет — 28,6%, 40–49 лет — 17,8%, 50–59 лет — 28,6%, 60–69 лет — 17,8% и старше 70 лет — 3,6% человек. В данном очаге ранее было выявлено 4 больных коклюшем, из них 1 ребенок 7 лет, 2 детей 9 лет и 1 ребенок 15 лет, которые являлись учениками 1, 2 и 9 классов соответственно. Диагноз коклюша был установлен с помощью серологических методов исследования (в одном случае — с помощью ИФА и в трех случаях — с помощью РНГА). Обследование проведено на 35 день существования очага коклюшной инфекции. При обследовании данного очага у 5 (17,8%) человек наблюдались клинические проявления в виде кашля. Среди них 3 человека были педагогами,

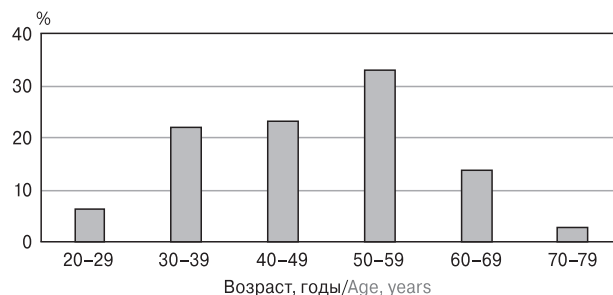


Рисунок 2. Возрастная структура обследуемых взрослых лиц

Figure 2. Age structure of examined adults

1 библиотекарь и 1 воспитатель. ДНК возбудителя коклюша была выявлена с помощью двух методов в 12 (42,8%) случаях, причем в двух случаях у лиц, имевших клинические проявления. Результаты, полученные с помощью тест-системы «АмплиСенс® Bordetella multi-FL» и метода изотермальной амплификации, полностью коррелировали. Положительные ДНК-образцы обнаружены у 8 педагогов, медицинской сестры и трех работников столовой, возрастной состав: 30–39 лет — 4, 40–49 лет — 1, 50–59 лет — 5 человек и по одному человеку в возрасте 60–69 лет и старше 70 лет. У всех остальных обследованных лиц были отрицательные результаты ПЦР-диагностики.

В очаге № 2 под наблюдением находилось 406 человек и обследовано 30 человек, из них 19 (63,3%) учащихся и 11 (36,7%) работников школы, 40% — мужского и 60% — женского пола. Все учащиеся были учениками одного класса. В этом классе был ранее выявлен больной коклюшем ученик (11 лет), у которого диагноз установлен серологически с помощью ИФА. Возрастной состав обследованных лиц — 11–14 лет (63,3%), 30–39 лет 27,3%, 40–49 лет — 27,3%, 50–59 лет — 27,3%, 60–69 лет — 18,1% человек. На основании эпидемиологического расследования число контактных лиц было увеличено за счет сотрудников школы, которые имели контакт с большим числом учащихся (работники столовой и групп продленного дня, классные руководители). При обследовании данного очага с помощью двух молекулярно-генетических методов положительных ДНК-образцов не было обнаружено.

В очаге № 3 под наблюдением находилось 706 человек и обследовано 30 человек, все были учащимися. Из них в возрасте 6–7 лет — 6 (20%), 8–9 лет — 19 (63,3%) и 10–11 лет — 5 (16,7%) человек, которые являлись учениками 1, 2, 3 и 4 классов; мальчиков и девочек было равное количество — по 15 человек (50%). Ранее в этом очаге не было выявлено больных ко-

клюшем, однако регистрировались длительно кашляющие дети. При обследовании очага обнаружено два ребенка из одного класса, у которых выявлена ДНК возбудителя коклюша, причем у одного из них на момент взятия патологического материала были клинические проявления в виде кашля. У остальных обследованных лиц результаты, полученные с помощью двух методов, были отрицательные.

В очаге № 4 всего под наблюдением находилось 649 человек и обследовано 26 человек, из них 25 (96,2%) учащихся и 1 (3,8%) учитель, 65,4% — мужского и 34,6% — женского пола. Все учащиеся были учениками одного 4 класса в возрасте 9–10 лет и учитель (классный руководитель) в возрасте 30 лет. В данном очаге ранее было выявлено 2 больных коклюшем, из них 1 ребенок 11 лет 1 ребенок 15 лет, которые являлись учениками 4 и 9 классов соответственно. Диагноз коклюша был установлен с помощью ИФА у ученика 4 класса и ученика 9 класса — с помощью бактериологического метода. Обследование проведено на 20 день существования очага коклюшной инфекции. При обследовании данного очага у одного ребенка (3,8%), ученика 4 класса, наблюдались клинические проявления в виде кашля. ДНК возбудителя коклюша была выявлена в 2 (7,7%) случаях (ученики 4 класса) с помощью двух методов, причем в обоих случаях у этих лиц клинические проявления не наблюдались, и в одном случае (3,5%) ДНК возбудителя коклюша обнаружена с помощью метода изотермальной амплификации у ребенка 4 класса с клиническими проявлениями. У всех остальных обследованных лиц результаты ПЦР-диагностики были отрицательные.

В очаге № 5 под наблюдением находилось 352 человека и обследован 31 человек, все были учащимися 2 класса, из них 51,6% — мужского и 48,4% — женского пола. Обследование проводилось по первому случаю, подозрительному на коклюш, при этом в классе находились длительно кашляющие дети. При обследовании данного очага с помощью двух молекулярно-генетических методов положительных ДНК-образцов не было обнаружено.

В очаге № 6 всего под наблюдением находилось 985 человек и обследовано 130 человек, из них 96 (73,8%) учащихся и 34 (26,2%) работников школы, 42 (32,3%) — мужского и 88 (67,7%) — женского пола. Возрастной состав обследованных учащихся распределился следующим образом: в возрасте 8–9 лет — 2 (1,5%), 10–11 лет — 42 (32,3%), 12–13 лет — 32 (24,6%), 14–15 лет — 19 (14,6%), которые были учениками 3, 4, 6, 7, 8, 9 и 11 классов. Возрастной состав

обследованных взрослых: 20–29 лет — 4 (3,1%), 30–39 лет — 4 (3,1%), 40–49 лет — 9 (6,9%), 50–59 лет — 13 (10%), 60–69 лет — 3 (2,3%) человек и старше 70 лет — 1 (1,6%) человек. Наряду с учениками были обследованы сотрудники образовательного учреждения, среди которых 91,2% педагогов, 2,9% работников административно-управленческого аппарата и 5,9% технический персонал и буфетчицы. Обследование не только длительно кашляющих, но и контактных лиц было организовано по первым случаям, подозрительным на коклюш. При обследовании данного очага с помощью метода изотермальной амплификации обнаружено 12 положительных ДНК-образцов, из них 7 образцов у детей, учеников 4, 6, и 9 классов, и 2 — у взрослых (учителя). Из 12 ДНК-положительных образцов, с помощью тест-системы «АмплиСенс® Bordetella multi-FL» обнаружено 9 положительных результатов. В трех случаях выявлены расхождения: в одном случае (ученик 6 класса) обнаружено ДНК представителя рода *Bordetella* spp. и в двух случаях (1 ученик 4 класса и 1 учитель) получен отрицательный результат. Во всех остальных случаях с помощью двух молекулярно-генетических методов получены отрицательные результаты.

В очаге № 7 всего под наблюдением находилось 514 человек и обследовано 45 человек, из них 43 (95,6%) учащихся и 2 (4,4%) учителя, 44,4% — мужского и 55,6% — женского пола. Все учащиеся были учениками 3 классов в возрасте 8–9 лет и учителя (классные руководители) в возрасте 39 и 45 лет. Ранее в этом очаге не было выявлено больных коклюшем, однако регистрировались длительно кашляющие дети. При обследовании данного очага с помощью двух молекулярно-генетических методов положительных ДНК-образцов не было обнаружено. При обследовании данного очага с помощью метода изотермальной амплификации обнаружено 2 положительных ДНК-образца у детей, причем у одного из них на момент обследования были клинические проявления в виде кашля. Данные образцы с помощью тест-системы «АмплиСенс® Bordetella multi-FL» оказались отрицательными. Во всех остальных случаях (95,6%) с помощью обоих методов выявлены отрицательные результаты ПЦР-диагностики.

В очаге № 8 всего под наблюдением находилось 1055 человек и обследовано 110 человек, из них 104 (94,5%) учащихся и 6 (5,5%) работников школы, 49 (44,6%) — мужского и 61 (55,4%) — женского пола. Возрастной состав обследованных учащихся распределился следующим образом: в возрасте 8–9 лет — 5 (4,5%),

10–11 лет — 20 (18,2%), 12–13 лет — 7 (6,4%), 14–15 лет — 72 (65,4%), которые были учениками 4-х, 8-х, 9-х классов. Возрастной состав обследованных взрослых: 31, 49, 50, 53 и 61 лет. Все обследованные взрослые были классными руководителями. Ранее в этом очаге не было выявлено больных коклюшем, однако регистрировались длительно кашляющие дети. На момент обследования очага у двух детей (учеников 4-х классов) были клинические проявления в виде кашля. При обследовании данного очага с помощью двух молекулярно-генетических методов обнаружено 2 положительных ДНК-образца у учеников 4 классов и один положительный ДНК-образец (у ученика 8 класса) обнаружен в методе изотермальной амплификации, который с помощью тест-системы «АмплиСенс® Bordetella multi-FL» идентифицирован как ДНК представителя рода *Bordetella* spp. Во всех трех случаях у обследованных лиц клинических проявлений не было.

Обсуждение

Несмотря на высокий уровень иммунизации, коклюш остается актуальной инфекцией во всем мире. В последние 10 лет высокая заболеваемость коклюшем регистрируется в странах с высоким уровнем охвата профилактическими прививками (Австрия, Норвегия, Польша, Нидерланды, Великобритания, Австралия и США) [5, 6, 7, 13, 14]. Так, около 5000 случаев коклюша было зарегистрировано в 2012 г. в Вашингтоне, что является максимальным показателем за последние 70 лет. В Японии наибольший эпидемический подъем заболеваемости был 2008–2010 гг., когда было зарегистрировано 17 349 случаев коклюша [11, 12]. Рост заболеваемости коклюшем объясняется целым рядом факторов, в том числе недостатками вакцинации ацеллюлярными вакцинами, адаптацией возбудителя под селективным давлением иммунизации [6], а также широким внедрением молекулярно-генетических методов диагностики. Кроме того, были показаны возможности и доказана эффективность применения с диагностической целью молекулярно-генетических методов одновременной детекции возбудителя коклюша и возбудителей воздушно-капельных вирусных инфекций [10, 12, 13].

В настоящее время лабораторная диагностика коклюша в России основывается на использовании трех методов — бактериологического, молекулярно-генетического и серологического, которые применяются в зависимости от сроков начала заболевания. Однако

проведение бактериологического исследования имеет целый ряд недостатков: занимает продолжительное время (от 5 до 7 дней); эффективность выделения в практических условиях не превышает 10–15%; трудности культивирования, связанные с сниженной выживаемостью во внешней среде, биологическими свойствами возбудителя коклюша; отсутствие в настоящее время диагностических агглютинирующих сывороток. Кроме того, результативность бактериологической диагностики зависит от сроков обследования: в более поздние сроки и на фоне антибиотикотерапии высеваемость возбудителя коклюша резко снижается, кроме того могут быть ошибки на этапах взятия и транспортировки исследуемого материала. Поэтому применение бактериологической диагностики ограничено использованием ее на ранних сроках заболевания (в первые 2–3 недели от начала заболевания).

Серологическая диагностика коклюша проводится с помощью ИФА и применяется для определения уровня специфических противокклюшных антител классов IgM, IgA, IgG. Данный метод имеет ограничения по срокам использования, так как результативен не ранее 3–4 недели от начала заболевания, и информативен для невакцинированных детей старше 1 года и взрослых. Также существует сложность интерпретации результатов серологического обследования у привитых детей и отмечается низкая продукция противокклюшных антител у детей в возрасте до 1 года. Поэтому бактериологические и серологические методы исследования, несмотря на многолетний успешный опыт их применения, имеют ряд ограничений, главное из которых — продолжительность исследования, что существенно затрудняет раннюю диагностику инфекции, раннее начало этиотропной терапии и своевременное проведение противоэпидемических мероприятий в очагах инфекции.

В последнее десятилетие технологии, основанные на различных вариантах амплификации фрагментов генома возбудителей инфекционных заболеваний, получили широкое распространение благодаря возможности прямой детекции микроорганизма, высокой чувствительности, специфичности и воспроизводимости методов. Кроме того, сами методики тестирования достаточно просты и могут быть использованы в любой лаборатории, проводящей ПЦР-исследования, и в последние годы активно автоматизируются, с целью минимизации прямого участия исследователя. В последнее десятилетие разработано значительное количество вариантов методов амплификации

нуклеиновых кислот для идентификации возбудителя коклюша, основанные на выявлении различных мишеней в геноме *B. pertussis* как в классическом варианте с электрофорезом, так и в режиме реального времени и изотермальной амплификации [2, 8, 9, 10, 11, 12].

В настоящей работе нами изучена и показана целесообразность и эффективность применения молекулярно-генетической диагностики при обследовании в очагах коклюшной инфекции не только длительно кашляющих детей, но и здоровых контактных лиц. Всего под наблюдением находилось 4930 человек из 8 общеобразовательных учреждений г. Москвы и Московской области в период с 2012 по 2015 гг. Изучено 430 проб клинического материала.

В ходе проведенных исследований обнаружено 33 положительных ДНК-образца, что составило 7,7% от общего числа исследованных проб. ДНК-положительные образцы были выделены от 18 (54,5%) учащихся и 15 (45,5%) работников образовательных учреждений различных категорий. Среди учащихся положительные образцы обнаружены у учеников 2–4, 6 и 9 классов в возрасте 8–9 лет — 15,1%, 10–11 лет — 27,3%, 12–13 лет — 9,1% и 14–15 лет — 3,0%, то есть среди обследованных по контакту детей основная доля приходилась на учеников 4-х классов в возрасте 10–11 лет. Среди работников образовательных учреждений ДНК-положительные образцы выявлены в материале лиц в возрасте 30–39 и 50–59 лет — по 15,1%, 40–49 и 60–69 — по 6,1%, и старше 70 лет — 3,0%; из них большинство (33,3%) были педагогами; медицинские работники и работники столовой составили 3,0 и 9,1% соответственно. В трех очагах, где ранее были установлены источники инфекции, нами обнаружено 15 (17,9%) ДНК-положительных образцов, при этом у троих обследованных с ДНК-позитивными пробами наблюдались клинические проявления.

В тех очагах, где не был ранее установлен источник инфекции и проводили обследования длительно кашляющих детей, обнаружено 18 (5,2%) ДНК-положительных образцов, причем у двух обследованных с ДНК-положительными пробами отмечались клинические проявления в виде кашля.

Анализ результатов по обследуемым очагам показал, что в двух из них, где ранее не был установлен источник инфекции, но были обследованы длительно кашляющие дети, положительные ДНК-образцы с помощью двух молекулярно-генетических методов не обнаружены, что может свидетельствовать о наличии в этих очагах респираторных инфекций другой этиологии.

Интересным является тот факт, что при обследовании очагов в общеобразовательных учреждениях положительные ДНК-образцы (33,3% случаев от общих положительных находок) выявляются не только среди детей, но и у взрослых, большинство из которых это педагогические работники, имеющие наибольший контакт с детьми.

При изучении клинического материала с помощью метода изотермальной амплификации у 33 лиц обнаружена ДНК возбудителя коклюша и при использовании коммерческой тест-системы ДНК возбудителя выявлена у 27 лиц. Причем в 5 (15,2%) случаях применение метода изотермальной амплификации позволило обнаружить ДНК возбудителя коклюша у лиц с клиническими проявлениями, в то время как при использовании коммерческой тест-системы только в трех из этих пяти случаев были получены положительные результаты. У лиц без клинических проявлений с помощью изотермальной амплификации обнаружено 28 положительных образцов, в то время как из них, с помощью коммерческой тест-системы, в двух случаях не было положительных результатов и в одном случае результатом исследования явилось обнаружение ДНК микроорганизмов рода *Bordetella* spp. Расхождения между результатами, полученными с помощью метода изотермальной амплификации и метода ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени, по-видимому объясняется тем, что метод изотермальной амплификации обладает более высокой чувствительностью за счет использования трех пар специфических праймеров на один фрагмент генома возбудителя коклюша, кодирующего ген коклюшного токсина. В одном случае в результате изотермальной амплификации был получен отрицательный результат, а при использовании коммерческой тест-системы обнаружена ДНК микроорганизма рода *Bordetella* spp., что может быть обусловлено наличием в одном очаге разных видов бордетелл.

Положительные результаты молекулярно-генетических исследований не всегда свидетельствуют о наличии заболевания; для постановки окончательного диагноза коклюша необходимо учитывать клинические проявления инфекции, наличие эпидемиологической связи с лабораторно-подтвержденным случаем.

Для оценки эффективности молекулярно-генетических методов мы сравнили результативность ПЦР-диагностики и бактериологического методов на примере Московской области в ранее проведенных исследованиях.

В 7 очагах 317 контактных лиц обследовали с использованием ПЦР-диагностики на разных сроках существования очага, границы очагов были расширены, и медицинское наблюдение проводилось за 3875 детьми в течение инкубационного периода (21 день). При обследовании было выявлено 23 больных, что составило 7,3%, тогда как при бактериологическом обследовании около 1,5 тысяч контактных было выявлено всего 0,3% (5 человек).

Если предположить, что метод ПЦР использовался бы в 338 очагах, при обследовании более 10 тысяч контактных лиц, то было бы выявлено более 700 больных коклюшем, в том числе, легкими и субклиническими формами. Все это существенно приблизило бы к истинному числу заболевших коклюшем, сократив число возможных пропущенных случаев заболевания.

Следовательно, применение молекулярно-генетических методов лабораторной диагностики при обследовании очагов коклюшной инфекции позволяет выявить ДНК возбудителя коклюша у контактных лиц при их обследовании и установить больных со стертой,

атипичной формой заболевания. Кроме того, исследования с помощью этих технологий в качестве противоэпидемических мероприятий в очагах дает возможность в короткие сроки обнаружить источник инфекции, а также выявить скрытый источник инфекции в виде бактерионосителей.

Заключение

Проведенные исследования подтвердили целесообразность и эффективность применения молекулярно-генетических методов при обследовании не только кашляющих, но и контактных в очагах коклюшной инфекции, а также показали преимущества данного метода перед бактериологическим и серологическим лабораторными исследованиями. В очагах коклюшной инфекции, где было зарегистрировано вторичное распространение инфекции, удалось выявить 17,9% ДНК-положительных образцов возбудителя коклюша и в очагах при обследовании по первым случаям, подозрительным на коклюш, обнаружено 5,2% ДНК-положительных образцов возбудителя коклюша.

Список литературы/References

1. Онищенко Г.Г. Эпидемиологическое благополучие населения России // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2013. № 1. С. 42–51. [Onischenko G.G. Epidemiological well-being of population of Russia. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2013, no. 1, pp. 42–51. (In Russ.)]
2. Прадед М.Н., Яцышина С.Б., Селезнева Т.С., Малинина С.В., Бирюлева Н.В., Любимова Т.Е., Воробьева Н.С. ПЦР-диагностика инфекций, вызванных *B. pertussis*, *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica* // Клиническая лабораторная диагностика. 2013. № 1. С. 53–56. [Praded M.N., Yatsyshyna S.B., Selezneva T.S., Malinina S.V., Birulyeva N.V., Lubimova T.Ye., Vorobyeva N.S. The kit of reagents for polymerase chain reaction diagnostic of infections caused by *B. pertussis*, *B. parapertussis* and *B. bronchiseptica*. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Clinical Laboratory Diagnostics*, 2013, no. 1, pp. 53–56. (In Russ.)]
3. Селезнева Т.С., Титова Н.С., Заргарьянц А.И., Максимова Н.М., Маркина С.С. Влияние вакцинопрофилактики на эпидемический процесс управляемых инфекций в Российской Федерации // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2002. № 2. С. 6–11. [Selezneva T.S., Titova N.S., Zargaryants A.I., Maksimova N.M., Markina S.S. Effect of vaccination on the epidemic process of vaccine-preventable diseases in Russian Federation. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases*, 2002, no. 2, pp. 6–11. (In Russ.)]
4. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека: инфекционная заболеваемость в Российской Федерации за январь–декабрь 2015 года. [Federal'naya sluzhba po nadzoru v sfere zashchity prav potrebiteli i blagopoluchiya cheloveka: infektsionnaya zaboлеваemost' v Rossiiskoi Federatsii za yanvar'-dekabr' 2015 goda]. URL: http://rospotrebnadzor.ru/activities/statistical-materials/statictic_details.php?ELEMENT_ID=5525 (07.10.2016)
5. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Pertussis – United States, 1997–2000. *MMWR Morb. Mortal. WKLY Rep.*, 2002, vol. 51, no. 4, pp. 73–76.
6. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Pertussis Epidemic – California, 2014. *MMWR Morb. Mortal. WKLY Rep.*, 2014, vol. 63, no. 48, pp. 1129–1132.
7. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Pertussis Epidemic – Washington, 2012. *MMWR Morb. Mortal. WKLY Rep.*, 2012, vol. 61, no. 28, pp. 517–522.
8. King A.J., Van Gakom T., Van der Heide H.G., Advani A., Van der Lee S. Changes in the genomic content of circulating *Bordetella pertussis* strains isolated from the Netherlands, Sweden, Japan and Australia: adaptive evolution or drift? *BMC Genom.*, 2010, no. 11: 64. doi: 10.1186/1471-2164-11-64
9. Litt D.J., Jauneikaite E., Tchipeva D., Harrison T.G., Fry N.K. Direct molecular typing of *Bordetella pertussis* from clinical specimens submitted for diagnostic quantitative (real-time) PCR. *J. Med. Microbiol.*, 2012, vol. 61, no. 12, pp. 1662–1668. doi: 10.1099/jmm.0.049585-0
10. Stone B.L., Daly J., Srivastava R. Duration of *Bordetella pertussis* polymerase chain reaction positivity in confirmed pertussis illness. *J. Pediatric Infect. Dis. Soc.*, 2014, vol. 3, no. 4, pp. 347–349. doi: 10.1093/jpids/piu004
11. Qin X. Resurgence of whooping cough and the role of laboratory diagnosis. *Clin. Microbiol. News Lett.*, 2015, vol. 37, no. 9, pp. 69–76.

12. Qin X., Galanakis E., Martin E.T., Englund J.A. Multitarget PCR for diagnosis of pertussis and its clinical implications. *J. Clin. Microbiol.*, 2007, vol. 45, no. 2, pp. 506–511.
13. Rodgers L., Martin S.W., Cohn A., Budd J., Marcon M., Terranella A., Mandal S., Salamon D., Leber A., Tondella M.L., Tatti K., Spicer K., Emanuel A., Koch E., McGlone L., Pawloski L., Lemaile-Williams M., Tucker N., Iyer R., Clark T.A., Diorio M. 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, vol. 56, no. 3, pp. 322–331. doi:10.1093/cid/cis888
14. Van Amersfoort S.C., Schouls L.M., Van der Heide H.G., Advani A., Hallander H.O., Bondeson K., Von König C.H., Riffelmann M., Vahrenholz C., Guiso N., Caro V., Njamkepo E., He Q., Mertsola J., Mooi F.R. Analysis of *Bordetella pertussis* populations in European countries with different vaccination policies. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, vol. 43, no. 6, pp. 2837–2843.
15. World Health Organization. WHO-recommended surveillance standard of pertussis. URL: www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/surveillance_type/passive/pertussis_standards/en (07.10.2016)

Авторы:

Пименова А.С., младший научный сотрудник лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Борисова О.Ю., д.м.н., доцент, руководитель лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия; профессор кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва, Россия;

Цвиркун О.В., д.м.н., главный научный сотрудник лаборатории профилактики коклюша и кори ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Басов А.А., младший научный сотрудник лаборатории профилактики коклюша и кори ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Алешкин В.А., д.б.н., профессор, директор ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия

Афанасьев С.С., д.м.н., профессор, зам. директора по биотехнологии ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Донских Е.Е., к.б.н., доцент, доцент кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва, Россия;

Пикина А.П., ассистент кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва, Россия;

Кафарская Л.И., д.м.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва, Россия;

Афанасьев М.С., д.м.н., профессор кафедры клинической аллергологии и иммунологии ФГБОУ ВО Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия;

Караулов А.В., академик РАН, профессор, д.м.н., зав. кафедрой клинической аллергологии и иммунологии, ФГБОУ ВО Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия.

Authors:

Pimenova A.S., Junior Researcher, Laboratory of Diagnostics of Diphtheria and Pertussis Infections, G.N. Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Borisova O.Yu., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head of Laboratory of Diagnostics of Diphtheria and Pertussis Infections, G.N. Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation; Professor of Department of Microbiology and Virology of Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russian Federation;

Tsvircun O.V., PhD, MD (Medicine), Head Researcher of Laboratory of Whooping Cough and Measles, G.N. Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Basov A.A., Junior Researcher, Laboratory of Whooping Cough and Measles, G.N. Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Aleshkin V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Director of G.N. Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Afanasyev S.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Director for Biotechnology Department, G.N. Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Donskikh E.E., PhD (Biology), Associate Professor, Associate Professor of Department of Microbiology and Virology, Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russian Federation;

Pikina A.P., Assistant Professor, Department of Microbiology and Virology, Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russian Federation;

Kafarskaya L.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Microbiology and Virology, Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russian Federation;

Afanasyev M.S., PhD, MD (Medicine), Professor of the Department of Clinical Allergology and Immunology, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

Karaulov A.V., RAS Full Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Clinical Allergology and Immunology, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation.