

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ ПРИ ОБСЛЕДОВАНИИ БОЛЬНЫХ КОКЛЮШЕМ

А.С. Пименова¹, О.Ю. Борисова^{1,2}, М.С. Петрова¹, И.С. Воронина¹, А.Б. Борисова²,
О.В. Шамшева², С.С. Афанасьев¹, Е.В. Власов³, В.А. Алешкин¹

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

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

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

Резюме. Цель исследования: оценка эффективности применения оптимизированного нами способа генодиагностики на основе изотермической амплификации (LAMP) при обследовании больных с подозрением на коклюш в клинических условиях. *Материалы и методы.* Проведено обследование 262 пациентов в возрасте от 0 месяцев до 30 лет, госпитализированных в ГБУЗ Инфекционная клиническая больница № 1 ДЗМ. Взятие патологического материала проводили согласно МР 3.1.2.0072-13 с задней стенки ротоглотки. 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-РВ с помощью набора «АмплиСенс® Bordetella multi-FL» (метод сравнения) и методом LAMP с помощью электрофореза и интеркалирующего красителя. *Результаты.* При использовании оптимизированного нами способа, ДНК *B. pertussis* обнаружена у 252 (96,2%) больных. Метод был эффективен при любых формах клинического течения коклюша — ДНК *B. pertussis* обнаружена у всех пациентов с тяжелой формой, в 95,8% случаев — у пациентов со среднетяжелой и в 95,3% случаев — у пациентов с легкой формой. ДНК *B. pertussis* обнаружена в пробах клинического материала, полученных от больных на разных сроках от начала заболевания — от 92,3% на 1-й неделе до 96% случаев — на 5-й и более неделях заболевания. ДНК *B. pertussis* обнаружена в высоком проценте случаев (96,7–95,9%) и не зависела от приема антибактериальных препаратов. Дети до 1 года являются основной возрастной группой, подлежащей госпитализации при подозрении на коклюш, так как имеют наиболее высокий риск развития осложнений и тяжелых форм клинического течения. При обследовании 169 детей от 0 до 12 месяцев с помощью оптимизированного метода LAMP, ДНК *B. pertussis* обнаружена в 98,6% случаев у детей, больных коклюшем, в возрасте от 0–3 месяцев, в 98,4% случаев — у детей 4–7 месяцев и в 94,6% случаев — у детей 8–12 месяцев. Эффективность обнаружения ДНК возбудителя у больных коклюшем детей в возрасте до 1 года с помощью оптимизированного метода LAMP составила 97,6%.

Ключевые слова: коклюш, изотермальная амплификация, пациенты, возраст, период болезни.

Адрес для переписки:

Борисова Ольга Юрьевна
125212, Россия, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10,
Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии
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 Research 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., Петрова М.С., Воронина И.С.,
Борисова А.Б., Шамшева О.В., Афанасьев С.С., Власов Е.В.,
Алешкин В.А. Эффективность применения изотермической
амплификации при обследовании больных коклюшем // Инфекция
и иммунитет. 2018. Т. 8, № 3. С. 361–368. doi: 10.15789/2220-7619-2018-
3-361-368

Citation:

Pimenova A.S., Borisova O.Yu., Petrova M.S., Voronina I.S., Borisova A.B.,
Shamsheva O.V., Afanasiev S.S., Vlasov E.V., Aleshkin V.A. Efficiency
of application of isothermal amplification at inspection of patients with
whooping cough // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya
i immunitet, 2018, vol. 8, no. 3, pp. 361–368. doi: 10.15789/2220-7619-2018-
3-361-368

EFFICIENCY OF APPLICATION OF ISOTHERMAL AMPLIFICATION AT INSPECTION OF PATIENTS WITH WHOOPING COUGH

Pimenova A.S.^a, Borisova O.Yu.^{a,b}, Petrova M.S.^a, Voronina I.S.^a, Borisova A.B.^b, Shamsheva O.V.^b, Afanasiev S.S.^a, Vlasov E.V.^c, Aleshkin V.A.^a

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

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

^c Infectious Diseases Clinical Hospital No. 1 of the Moscow Department of Healthcare, Moscow, Russian Federation

Abstract. Purpose: efficiency isothermal amplification (LAMP) at inspection of patients with whooping cough in clinical conditions. *Materials and methods.* Examination of 262 patients aged from 0 months up to 30 years hospitalized in Infectious diseases clinical hospital No. 1 of the Moscow Department of Healthcare is conducted. Clinical specimens (pharyngeal swabs) were collected according to MR 3.1.2.0072-13. Extraction DNA of *B. pertussis* was carried out by means of the AmplyPrime[®] DNA-sorb-AM. Identification of specific fragments of a genome of *B. pertussis* was performed by PCR-real time by means of the AmplySens[®] Bordetella Multi-FL set (a comparison method) and by the LAMP with a phoresis and intercalating dye. *Results.* When using of the optimized method LAMP the DNA of *B. pertussis* is found at 252 (96.2%) patients. The method was effective at any forms of whooping cough — DNA of *B. pertussis* is found in all patients with a severe form, in 95.8% of cases — in patients with medium-weight and in 95.3% of cases — in patients with an easy form. The DNA of *B. pertussis* is found in clinical specimens received from patients on different terms from the beginning of a disease — from 92.3% on the 1st week up to 96% of cases — on the 5th and more weeks of a disease. The DNA of *B. pertussis* is found in high percent of cases (96.7–95.9%) and did not depend on acceptance of antibacterial therapy. Children till 1 year are the main age group which is subject to hospitalization at suspicion of whooping cough and in which the highest risk of development of complications and severe forms of a clinical disease. At inspection of 169 children from 0 to 12 months by means of the optimized method LAMP, DNA of *B. pertussis* it is found in 98.6% of cases in children of patients with whooping cough aged from 0–3 months, in 98.4% of cases — children of 4–7 months and in 94.6% of cases — at children have 8–12 months. The efficiency of detection of DNA of *B. pertussis* at patients with whooping cough of children aged till 1 year by means of the optimized LAMP method was 97.6%.

Key words: whooping cough, isothermal amplification, patients, age, period of disease.

Введение

За последние 5 лет на территории Российской Федерации, эпидемический процесс коклюша характеризуется стабилизацией заболеваемости с колебанием показателей в пределах 3,2 (2015 г.) — 5,6 (2016 г.) — 3,7 (2017 г.) на 100 тыс. населения (<http://www.rosпотреbnadzor.ru>). В 2017 г. зарегистрировано 5415 случаев заболевания коклюшем, в том числе у детей до 17 лет — 5198 случаев. Спорадический уровень заболеваемости 3–5 на 100 тыс. населения стал возможным благодаря многолетнему высокому охвату профилактическими прививками декретированного детского населения (более 95%). Сопоставление экстенсивных и интенсивных показателей заболеваемости по нашей стране за последние годы свидетельствует о преобладании в структуре заболевших школьников 7–14 лет — 41,4% (показатель колеблется от 37 до 60% по территориям), что объясняется многочисленностью группы школьников по сравнению с другими возрастными группами детского населения (<http://www.rosпотреbnadzor.ru>). Однако по интенсивности, практически повсеместно, преобладает группа детей до 1 года, показатель заболеваемости которой превышает в 3–4 раза уровень заболеваемости школьников, что позволяет отнести ее к группе высокого риска заболеваемости.

С 2014 г. согласно санитарно-эпидемиологическим правилам (СП 3.1.2.3162-14) «Профилактика коклюша», при обследовании больных

с подозрением на коклюш регламентировано применение молекулярно-генетического метода, который является наиболее эффективным по сравнению с бактериологической и серологической диагностикой. На территории РФ зарегистрирован один набор реагентов для выявления и дифференциации ДНК возбудителей коклюша, паракоклюша и бронхисептикоза методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) «АмплиСенс[®] Bordetella multi-FL» [4]. Вместе с тем применение тест-систем в формате ПЦР-РВ сопряжено с рядом недостатков: высокая стоимость исследования и квалификация персонала, необходимость в приобретении дорогостоящего оборудования и иногда возникающие сложности при интерпретации полученных результатов, что требует проведения повторного исследования. Поэтому разработка альтернативных, более простых и надежных методов и тест-систем, направленных на выявление ДНК *Bordetella pertussis*, остается перспективным направлением по улучшению диагностики коклюша, в том числе и в направлении снижения стоимости самого исследования, что экономически целесообразно для региональных лабораторий с разными системами финансирования.

В 2000 г. японскими учеными предложена технология амплификации нуклеиновых кислот — петлеобразующая изотермическая амплификация (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) [26], которая позже была реализована при разработке диагностических тест-систем

для лабораторной диагностики большого числа возбудителей инфекционных заболеваний [25]. Она обладает высокой чувствительностью, специфичностью и амплификационной эффективностью за счет использования нескольких пар праймеров на один фрагмент генома и биологических особенностей ДНК-полимеразы, и не требует использования дорогостоящего оборудования. Нами был оптимизирован метод ускоренной генодиагностики коклюша на основе этой технологии с оценкой аналитической чувствительности, специфичности, надежности и валидности теста. Целью настоящей работы явилась оценка эффективности применения оптимизированного нами способа генодиагностики на основе изотермической амплификации (LAMP) при обследовании больных с подозрением на коклюш в клинических условиях.

Материалы и методы

Исследовано 524 пробы клинического материала, полученные при обследовании больных с подозрением на коклюш и контактных с ними лиц, госпитализированных в ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница № 1 Департамента здравоохранения города Москвы» (ГБУЗ «ИКБ № 1 ДЗМ»).

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 физиологическим раствором; доставку и подготовку биологического материала к исследованию осуществляли в соответствии с методическими рекомендациями 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).

Специфические фрагменты генома возбудителя коклюша выявляли оптимизированным нами методом изотермической амплификации (LAMP). Приготовление реакционной смеси проводили путем смешивания двух смесей. Состав смеси № 1: 10x реакционный буфер, 2 mM смесь нуклеотидов (dNTP), 25 mM MgCl₂, раствор Betaine. В реакции использовали три пары праймеров, последовательности которых были ранее опубликованы [16]. Состав смеси № 2: рабочее разведение (1:9) Bst ДНК-полимеразы в буферном растворе. В смесь № 1 вносили пробы ДНК и минеральное масло. Затем прогревали в течение 5 мин и охлаждали в течение 1 мин. После чего в каждую пробу вносили смесь № 2, перемешивали на вортексе. В качестве положительного контроля амплификации использовали ДНК штамма *B. pertussis* № 143 (ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора,

Оболенск). Амплификацию выполняли в изотермических условиях: 65°C — 60 мин; 80°C — 2 мин. Детекцию продуктов амплификации осуществляли методом горизонтального электрофореза в агарозном геле (Lonza, США) в 50x TAE-буфере (Thermo Fisher Scientific, Литва) в камере SUB-CELL® GT (Bio-Rad Laboratories, США) с применением источника питания Power Supply Model 2002/2.0 (Bio-Rad Laboratories, США). Продукты амплификации смешивали с 6x DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, Литва) и 10 000x SYBR Green I (Lumiprobe GmbH, Германия), после чего образцы помещали в лунки 1,5% агарозного геля. Электрофорез проводили в режиме 160 В 60 мин. Продукты амплификации визуализировали с помощью геледокументирующей системы Quantum-ST4-1100/26M (Vilber Lourmat, Франция). Также детекцию продуктов амплификации проводили с помощью интеркалирующего красителя. Для этого в каждую пробу вносили по 10 мкл 10 000x SYBR Green I. Результаты амплификации оценивали визуально по изменению цвета содержимого пробирки.

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 к прибору для проведения ПЦР в режиме «реального времени» Rotor-Gene Q5 plex HRM («Qiagen GmbH», Германия).

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью пакета программ SPSS 19.0. Для признаков, имеющих распределение, отличное от нормального, данные представлены в виде медианы. Статистическая значимость различий качественных признаков в независимых сравниваемых группах оценивалась при помощи критерия χ^2 Пирсона [1, 3].

Результаты

Оптимизированный нами метод генодиагностики коклюша позволяет выявлять ДНК *B. pertussis* в клиническом материале с детекцией методом электрофореза и с помощью интеркалирующего красителя. Идентификацию ДНК *B. pertussis* проводили путем сравнения электрофоретической подвижности полученных фрагментов ДНК с подвижностью контрольного образца ДНК штамма *B. pertussis*. Если у исследуемого ДНК-образца имелись специфические светящиеся профили, аналогичные профилю контрольного штамма *B. pertussis* № 143, то данные образцы регистрировались как содержащие ДНК штамма *B. pertussis* (рис., А, III обложка).

При использовании интеркалирующего красителя результаты амплификации оценивали визуально по изменению цвета содержимого пробирки. Положительными считали те пробы, в которых регистрировали светло-зеленое окрашивание, отрицательные образцы имели светло-оранжевое окрашивание (рис., Б, III обложка).

С целью подтверждения диагноза «Коклюш» с помощью оптимизированного способа проведено обследование 262 пациентов в возрасте от 0 месяцев до 30 лет, госпитализированных в ГБУЗ «ИКБ № 1 ДЗМ». Клинический диагноз устанавливался врачами-инфекционистами в соответствии с принятыми протоколами ведения больных. Обследование пациентов проведено с использованием двух методов: метода сравнения и метода LAMP. В качестве метода сравнения использовали коммерческий диагностический тест по выявлению специфических фрагментов генома *B. pertussis* методом ПЦР-РВ. Возраст пациентов распределился следующим образом: от 0 до 12 месяцев — 169 (64,5%) человек, от 1 года до 7 лет — 74 (28,2%) человек, от 7 до 18 лет — 12 (4,6%) человека, 18 лет и старше — 7 (2,7%) человек, то есть основную группу составили дети в возрасте от 0 до 12 месяцев (медиана 4 месяца). При использовании оптимизированного нами способа ДНК *B. pertussis* обнаружена у 252 (96,2%) больных.

Обследованные пациенты были с различными формами клинического течения коклюша — от стертой до тяжелой (табл. 1). У 43 (16,4%) больного коклюш протекал в легкой, у 194 (74%) — в среднетяжелой, у 24 (9,2%) — в тяжелой, у 1 (0,4%) — в стертой формах. Проведение исследования с помощью изотермической амплификации показало (табл. 1), что метод был эффективен при любых формах клинического течения коклюша. Так, ДНК *B. pertussis* обнаружена у всех пациентов с тяжелой формой коклюша (в 24 случаях из 24), в 95,8% случаев — у пациентов со среднетяжелой формой (у 186 из 194 больных) и в 95,3% случаев — у пациентов с легкой формой (у 41 из 43 больных) заболевания.

ДНК *B. pertussis* обнаружена в пробах клинического материала, полученных от больных на разных сроках от начала заболевания — на 1, 2, 3, 4, 5 и более неделях болезни: 13 (5,0%) человек — на 1-й, 73 (27,9%) — на 2-й, 98 (37,4%) — на 3-й, 53 (20,2%) — на 4-й, 25 (9,5%) — на 5-й и более неделях болезни (табл. 2). Из таблицы 2 видно, что ДНК возбудителя коклюша была выявлена в 92,3% случаев у пациентов на 1-й неделе (у 12 из 13 больных), в 98,6% случаев — на 2-й неделе (у 72 из 73 больных), в 97,9% случаев — на 3-й неделе (у 96 из 98 больных), в 90,6% случаев — на 4-й неделе (у 48 из 53 больных) и в 96% случаев — на 5-й и более неделях (у 24 из 25 больных) заболевания.

При изучении вакцинального статуса обследуемых было выявлено, что 221 (87,7%) больной

коклюшем не привит, 23 (9,1%) — привиты, а у 8 (3,2%) отсутствовали данные о вакцинации. У всех больных с помощью оптимизированного метода обнаружена ДНК *B. pertussis*.

Проведена оценка зависимости частоты выделения ДНК *B. pertussis* из клинического материала больных на фоне антибиотикотерапии (табл. 3). Обследуемые были разделены на 2 группы. I группу составили 172 (65,6%) пациента, которые в течение 30 дней до взятия материала не принимали антибактериальные препараты. Во II группу включено 90 (34,4%) больных, прошедших в течение 15 дней до или проходивших на момент взятия материала курс антибактериальной терапии. Из таблицы 3 видно, что у больных коклюшем как I, так и II группы ДНК *B. pertussis* обнаружена в высоком проценте случаев (96,7 и 95,9% соответственно). По результатам выполненного статистического анализа установлено, что выделение ДНК *B. pertussis* из клинического материала пациентов не зависит от приема антибактериальных препаратов (критерий χ^2 Пирсона, $p > 0,05$).

Так как дети до 1 года являются основной возрастной группой, подлежащей госпитализации при подозрении на коклюш и у них наиболее высок риск развития осложнений и тяжелых форм клинического течения, приводящих к смерти, то было важно оценить эффективность применения метода LAMP при обследовании этого контингента (табл. 4). В исследование включено 169 детей в возрасте от 0 до 12 месяцев, из которых 42% были дети от 0 до 3 месяцев, 36,1% — от 4 до 7 месяцев и 21,9% — от 8 до 12 месяцев. ДНК *B. pertussis* обнаружена в 98,6% случаев у детей больных коклюшем в возрасте от 0–3 месяцев (70 из 71 больного), в 98,4% случаев — у детей в возрасте 4–7 месяцев (у 60 из 61 больного) и в 94,6% случаев — у детей в возрасте 8–12 месяцев (у 35 из 37 больных). В целом эффективность обнаружения ДНК возбудителя у больных коклюшем с помощью оптимизированного метода LAMP составила 97,6%.

Обсуждение

За последние 40 лет достигнуты значительные успехи в совершенствовании методов идентификации патогенных микроорганизмов. На смену серологическим методам диагностики коклюша, позволяющим выявлять специфические антитела или поверхностные антигены, пришли методы определения генетических детерминант возбудителя [4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34]. Разработка молекулярно-генетических технологий открыла новые перспективы и возможности ускоренной идентификации возбудителя, что будет способствовать быстрому выявлению больных и бактерионосителей, назначению своевременной терапии.

Таблица 1. Эффективность изотермической амплификации при обследовании больных с различной тяжестью клинического течения коклюша

Table 1. Efficiency of isothermal amplification at inspection of patients with different of a clinical forms of whooping cough

Тяжесть течения заболевания Weight of a current of whooping cough	Количество пациентов Number of patients		Результат выявления ДНК <i>B. pertussis</i> методом изотермической амплификации (LAMP) Identification of DNA <i>B. pertussis</i> by LAMP			
			Положительный Positive		Отрицательный Negative	
	абс./abs.	%	абс./abs.	%	абс./abs.	%
Стертая форма/Erased form	1	0,4	1	0,4	–	–
Легкая форма/Easy form	43	16,4	41	15,6	2	0,8
Среднетяжелая форма/Medium form	194	74,0	186	71,0	8	3,0
Тяжелая форма/Severe form	24	9,2	24	9,2	–	–
Итого/Total	262	100	252	96,2	10	3,8

В настоящее время предложены разные ПЦР-технологии (nested-ПЦР, ПЦР-РВ), с помощью которых возможно проводить идентификацию различных участков генома *B. pertussis*: гена коклюшного токсина [6, 12, 14, 23, 30, 31], порина [19, 20], аденилатциклазного токсина [8], повторяющихся последовательностей хромосомы [2, 5, 11, 13, 33, 34]. Опыт применения ПЦР для идентификации возбудителей бордетеллез показал, что наиболее точные результаты получают при использовании праймеров, расположенных в промоторной зоне коклюшного токсина (Ptx), повторяющихся последовательностях IS481 и IS1001 или гене *суаА* [2, 18, 22, 27]. В США и Евросоюзе идентификация ДНК *B. pertussis* осуществляется в основном с помощью ПЦР или ПЦР в режиме реального времени, где мишенью является IS481 [8, 24]. Однако IS481 идентифицируется и в геномах других видов бордетелл, что может приводить к ложноположительным результатам [10]. Поэтому, учитывая разнообразие предложенных вариантов тест-систем, до сих пор нет международной унифицированной молекулярно-генетической тест-системы, существуют различия в выборе генов-мишеней для их детекции, трудности достоверной диф-

ференциации нескольких видов бордетелл, обусловленной высокой гомологией геномов, что в итоге препятствует стандартизации и созданию единой концепции диагностики коклюша с помощью амплификационных технологий.

Одной из перспективных технологий, развивающихся в направлении создания лабораторной диагностики «у постели больного» является петлеобразующая изотермическая амплификация (LAMP) [25, 26]. Данная технология впервые в 2006 году была предложена для выявления ДНК *B. pertussis* [16]. С 2015 г. в Японии выпускается коммерческая тест-система (Loopamp Bordetella pertussis detection kit), которая была использована для идентификации ДНК *B. pertussis* в клинических условиях [10]. Другими учеными [7] данная технология была оптимизирована в направлении флуоресцентной детекции с оценкой валидности на 213 клинических образцах по сравнению с ПЦР. Исследование показало, что диагностические чувствительность и специфичность LAMP составили 92,59 и 98,39%, что превышало результаты ранее проведенных исследований [16, 17]. При исключении отрицательных образцов, эти показатели увеличились до 96,55 и 99,46% соответственно [7]. В недавней работе японских ученых

Таблица 2. Эффективность изотермической амплификации при обследовании больных на различных сроках обследования

Table 2. Efficiency of isothermal amplification at inspection of patients on different period of disease

Период обследования Period of disease	Количество пациентов Number of patients		Результат выявления ДНК <i>B. pertussis</i> методом изотермической амплификации (LAMP) Identification of DNA <i>B. pertussis</i> by LAMP			
			Положительный Positive		Отрицательный Negative	
	абс./abs.	%	абс./abs.	%	абс./abs.	%
1-я неделя/1 week	13	5,0	12	4,6	1	0,4
2-я неделя/2 week	73	27,9	72	27,5	1	0,4
3-я неделя/3 week	98	37,4	96	36,6	2	0,8
4-я неделя/4 week	53	20,2	48	18,4	5	1,8
5-я неделя/5 week	25	9,5	24	9,1	1	0,4
Итого/Total	262	100	252	96,2	10	3,8

Таблица 3. Частота выявления ДНК *B. pertussis* у пациентов на фоне антибактериальной терапииTable 3. Frequency of identification of DNA *B. pertussis* at patients with antibacterial therapy

Группы пациентов Patients	Результат выявления ДНК <i>B. pertussis</i> методом изотермической амплификации (LAMP) Identification of DNA <i>B. pertussis</i> by LAMP		Итого Total
	Положительный Positive	Отрицательный Negative	
I группа/I group	87	3	90
II группа/II group	165	8	172
Итого/Total	252	11	262

проведено сравнение эффективности выявления ДНК *B. pertussis* в LAMP, в которой праймеры фланкировали две разные мишени — области IS481 и Ptx промотор коклюшного токсина [15]. Исследования показали, что чувствительность составила 87,5 и 76,2%, и специфичность — 92,9 и 94,1% соответственно при индикации IS481 и Ptx. Кроме того, оптимизированный вариант LAMP, основанный на выявлении Ptx, позволяет идентифицировать *B. pertussis* с rtxP1, rtxP3 и rtxP8 аллелями промотора гена коклюшного токсина с высокой степенью аналитической чувствительности. Однако авторы констатируют необходимость совершенствования в направлении выявления *B. pertussis* с менее распространенными аллелями промотора, которые в представленном варианте будут идентифицироваться как ложноотрицательные [15].

Оценка диагностической эффективности оптимизированного нами способа ускоренной генодиагностики коклюша на основе этой технологии показала, что ДНК *B. pertussis* удалось обнаружить у 96,2% больных с любой формой клинического течения коклюша: у всех пациентов с тяжелой, в 95,8% случаев — со средне-тяжелой и в 95,3% случаев — с легкой формами заболевания. ДНК возбудителя коклюша обнаружена в 92,3–98,6% случаях в пробах, полученных от больных на разных сроках от начала заболевания — на 1, 2, 3, 4, 5-й неделях болезни, а также в высоком проценте случаев (96,7–95,9%) независимо от антибиотикотерапии и вакцинального статуса пациента.

Дети до 1 года являются основной возрастной группой, подлежащей госпитализации при подозрении на коклюш, у них наиболее высок риск развития осложнений и тяжелых форм клинического течения, приводящих к смерти. Кроме того, взятие клинического материала у детей раннего возраста представляет определенные трудности в связи с хаотичным вскармливанием (практически отсутствует интервал в 3–4 ч между кормлениями) и техникой забора, что приводит к потере биоматериала и снижению эффективности исследования. Поэтому представлялось важным оценить эффективность применения оптимизированного метода LAMP при обследовании этого контингента. Анализ показал, что эффективность обнаружения ДНК *B. pertussis* у этой категории больных составила 97,6%, причем у самой младшей возрастной категории (0–3 месяцев) удалось достичь 98,6% эффективности.

Полученные нами, также как и зарубежными коллегами [7, 10, 15, 16], результаты свидетельствуют о том, что применение LAMP технологии позволяет в короткие сроки выявить ДНК возбудителя коклюша и, тем самым, получить раннее лабораторное подтверждение диагноза «Коклюш» для назначения адекватной терапии. Кроме того, учитывая возможности использования интеркалирующей или флуоресцентной детекции, время проведения изотермической амплификации сокращается до 1 ч, по сравнению с ПЦР и ПЦР-РВ, а также не требует использования дорогостоящего и специализированного оборудования.

Таблица 4. Эффективность изотермической амплификации при обследовании детей в возрасте до 1 года, больных коклюшем

Table 4. Efficiency of isothermal amplification at inspection of children with whooping cough

Возрастная категория Age	Количество пациентов Number of patients		Результат выявления ДНК <i>B. pertussis</i> методом изотермической амплификации (LAMP) Identification of DNA <i>B. pertussis</i> by LAMP			
			Положительный Positive		Отрицательный Negative	
	абс. abs.	%	абс. abs.	%	абс. abs.	%
0–3 месяцев/0–3 months	71	42,0	70	41,4	1	0,6
4–7 месяцев/4–7 months	61	36,1	60	35,5	1	0,6
8–12 месяцев/8–12 months	37	21,9	35	20,7	2	1,2
Итого/Total	169	100	165	97,6	4	2,4

Заключение

Оптимизированный диагностический тест по выявлению ДНК *B. pertussis* методом ЛАМР обладает 96,2% диагностической эффективностью

при обследовании больных с различной тяжестью клинического течения, на разных сроках от начала заболевания, независимо от вакцинального статуса, на фоне антибиотикотерапии, а также при обследовании детей в возрасте до 1 года.

Список литературы/References

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1998. 459 с. [Glantz S. Mediko-biologicheskaya statistika [Primer of biostatistics]. Moscow: Practica, 1998. 459 p.]
2. Медкова А.Ю., Синяшина Л.Н., Румянцева Ю.П., Воронина О.Л., Кунда М.С., Каратаев Г.И. Накопление авирулентных инсерционных Bvg мутантов *Bordetella pertussis* при экспериментальной инфекции лабораторных мышей // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2013. № 4. С. 22–26. [Medkova A.Yu., Sinyashina L.N., Romyantseva Yu.P., Voronina O.L., Kunda M.S., Karataev G.I. Accumulation of avirulent *Bordetella pertussis* Bvg mutants in the course of experimental whooping cough in mice. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya = Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 2013, no. 4, pp. 22–26. (In Russ.)]
3. Петри А., Сэбин К. Наглядная медицинская статистика. Москва: «ГЭОТАР-Медиа», 2015. 216 с. [Petrie A., Sabin C. Naglyadnaya meditsinskaya statistika [Medical Statistics at a Glance]. Moscow: GEOTAR-Media, 2015. 216 p.]
4. Прадел 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., Yatsyschyna 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.)]
5. Backman A., Johansson B., Olcen P. Nested PCR optimized for detection of *Bordetella pertussis* in clinical nasopharyngeal samples. *J. Clin. Microbiol.*, 1994, vol. 32, no. 10, pp. 2544–2548.
6. Birkebaek N.H., Heron I., Skjodt K. *Bordetella pertussis* diagnosed by polymerase chain reaction. *APMIS*, 1994, vol. 102, no. 4, pp. 291–294. doi: 10.1111/j.1699-0463.1994.tb04878.x
7. Brotons P., de Paz H.D., Esteva C., Latorre I., Muñoz-Almagro C. Validation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid diagnosis of pertussis infection in nasopharyngeal samples. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 2016, vol. 16, no. 1, pp. 125–130. doi: 0.1586/14737159.2016.1112741
8. Douglas E., Coote J.G., Parton R., McPheat W. Identification of *Bordetella pertussis* in nasopharyngeal swabs by PCR amplification of a region of the adenylate cyclase gene. *J. Med. Microbiol.*, 1993, vol. 38, no. 2, pp. 140–144. doi: 10.1099/00222615-38-2-140
9. Dragsted D.M., Dohn B., Madsen J., Jensen J.S. Comparison of culture and PCR for detection of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* under routine laboratory conditions. *J. Med. Microbiol.*, 2004, vol. 53, no. 8, pp. 749–754. doi: 10.1099/jmm.0.45585-0
10. Fujino M., Suzuki E., Watanabe M., Nakayama T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) aids the clinical diagnosis of pertussis. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 2015, vol. 68, no. 6, pp. 532–533. doi: 10.7883/yoken.JJID.2015.125
11. Glare E.M., Paton J.P., Premier R.R., Lawrence A.J., Nisbet I.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, vol. 28, no. 9, pp. 1982–1987.
12. Grimprel E.P., Begue P., Anjak I., Betsou F., Guiso N. Comparison of polymerase chain reaction, culture and Western immunoblot serology for diagnosis of *Bordetella pertussis* infections. *J. Clin. Microbiol.*, 1993, vol. 31, no. 10, pp. 2745–2750.
13. He Q., Mertsola J., Soini H., Skurnik M., Ruuskanen O., Viljanen M.K. Comparison of polymerase chain reaction with culture and enzyme immunoassay for diagnosis of pertussis. *J. Clin. Microbiol.*, 1993, vol. 31, no. 3, pp. 642–645.
14. Houard S., Hackel C., Herzog A., Bollen A. Specific identification of *Bordetella pertussis* by the polymerase chain reaction. *Res. Microbiol.*, 1989, vol. 140, no. 7, pp. 477–487.
15. Kamachi K., Moriuchi T., Hiramatsu Y., Otsuka N., Shibayama K. Evaluation of a commercial loop-mediated isothermal amplification assay for diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. *J. Microbiol. Methods*, 2017, vol. 133, pp. 20–22. doi: 10.1016/j.mimet.2016.12.009
16. Kamachi K., Toyozumi-Ajisaka H., Toda K., Soeung S.Ch., Sarath S., Nareth Y., Horiuchi Y., Kojima K., Takahashi M., Arakawa Y. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, vol. 44, no. 5, pp. 1899–1902. doi: 10.1128/JCM.44.5.1899-1902.2006
17. Kamachi K., Yoshino S., Katsukawa C., Otsuka N., Hiramatsu Y., Shibayama K. Laboratory-based surveillance of pertussis using multitarget real-time PCR in Japan: evidence for *Bordetella pertussis* infection in preteens and teens. *New Microbes New Infect.*, 2015, vol. 8, pp. 70–74. doi: 10.1016/j.nmni.2015.10.001
18. Lanotte Ph., Plouzeau C., Burucoa C., Grélaud C., Guillot S., Guiso N., Garnier F. Evaluation of four commercial real-time PCR assays for detection of *Bordetella* spp. in nasopharyngeal aspirates. *J. Clin. Microbiol.*, 2011, vol. 49, no. 11, pp. 3943–3946. doi: 10.1128/JCM.00335-11
19. Li Z.M., Hannah J.H., Stibitz S., Nguyen N.Y., Manclark C.R., Brennan M.J. Cloning and sequencing of the structural gene for the porin protein of *Bordetella pertussis*. *Mol. Microbiol.*, 1991, vol. 5, no. 7, pp. 1649–1656.
20. Li Z.M., Jansen D.L., Finn T.M., Halperin S.A., Kasina A., O'Connor S.P., Aoyama T., Manclark C.R., Brennan M.J. Identification of *Bordetella pertussis* infection by shared-primer PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 1994, vol. 32, no. 3, pp. 783–789.
21. 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
22. Loeffelholz M. Towards improved accuracy of *Bordetella pertussis* nucleic acid amplification tests. *J. Clin. Microbiol.*, 2012, vol. 50, no. 7, pp. 2186–2190. doi: 10.1128/JCM.00612-12

23. Mastrantonio P., Stefanelli P., Giuliano M. Polymerase chain reaction for the detection of *Bordetella pertussis* in clinical nasopharyngeal aspirates. *J. Med. Microbiol.*, 1996, vol. 44, no. 4, pp. 261–266. doi: 10.1099/00222615-44-4-261
24. Mattoo S., Cherry J.D. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2005, vol. 18, no. 2, pp. 326–382. doi: 10.1128/CMR.18.2.326-382.2005
25. Notomi T., Mori Y., Tomita N., Kanda H. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *J. Microbiol.*, 2015, vol. 53, no. 1, pp. 1–5. doi: 10.1007/s12275-015-4656-9
26. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.*, 2000, vol. 28, no. 12, pp. e63.
27. Qin X. Resurgence of pertussis and its laboratory diagnosis. *Clin. Microbiol. Newsl.*, 2015, vol. 37, no. 9, pp. 69–76. doi: 10.1016/j.clinmicnews.2015.04.001
28. 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. doi: 10.1128/JCM.02042-06
29. 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
30. Schlapfer G., Cherry J.D., Heininger U., Ueberal M., Schmitt-Grohe S., Laussucq S., Just M., Stehr K. Polymerase chain reaction identification of *Bordetella pertussis* infections in vaccinees and family members in a pertussis vaccine efficacy trial in Germany. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 1995, vol. 14, no. 3, pp. 209–214.
31. Schlapfer G., Senn H.P., Berger R., Just M. Use of the polymerase chain reaction to detect *Bordetella pertussis* in patients with mild or atypical symptoms of infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 1993, vol. 12, no. 6, pp. 459–463.
32. 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
33. Van der Zee A., Agterberg C., Peeters M., Mooi F., Schellekens J. A clinical validation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* polymerase chain reaction: comparison with culture and serology using samples from patients with suspected whooping cough from a highly immunized population. *J. Infect. Dis.*, 1996, vol. 174, no. 1, pp. 89–96.
34. Van der Zee A., Agterberg C., Peeters M., Schellekens J., Mooi F.R. Polymerase chain reaction assay for pertussis: simultaneous detection and discrimination of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*. *J. Clin. Microbiol.*, 1993, vol. 31, no. 8, pp. 2134–2140.

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;
Петрова М.С., старший научный сотрудник клинического отдела ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;
Воронина И.С., младший научный сотрудник клинического отдела ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;
Борисова А.Б., младший научный сотрудник клинического отдела ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;
Шамшева О.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой инфекционных болезней у детей ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва, Россия;
Афанасьев С.С., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;
Власов Е.В., зам. главного врача по медицинской части (детство) ГБУЗ Инфекционная клиническая больница № 1 Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия;
Алешкин В.А., д.б.н., профессор, директор ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия.

Authors:

Pimenova A.S., Junior Researcher, Laboratory of Diagnostic of Diphtheria and Pertussis Infections, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;
Borisova O.Yu., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head of the Laboratory of Diagnostic of Diphtheria and Pertussis Infections, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;
Petrova M.S., PhD (Medicine), Senior Researcher, Clinical Department, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;
Voronina I.S., Junior Researcher, Clinical Department, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;
Borisova A.B., Junior Researcher, Clinical Department, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;
Shamsheva O.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Department of Infectious Diseases of Children, Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russian Federation;
Afanasyev S.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Head Researcher, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;
Vlasov E.V., Deputy Chief Physician For A Medical Part (Childhood) Infectious Diseases Clinical Hospital No. 1 of the Moscow Department of Healthcare, Moscow, Russian Federation;
Aleshkin V.A., PhD, MD (Biology), Professor, Director of the G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 06.02.2018
 Отправлена на доработку 18.04.2018
 Принята к печати 16.07.2018

Received 06.02.2018
 Revision received 18.04.2018
 Accepted 16.07.2018