

VAK 616.921.8-07:578.2/5

УСКОРЕННЫЙ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ КОКЛЮША

О.Ю. Борисова, Н.Т. Гадуа, М.С. Петрова, О.П. Попова, С.Ю. Комбарова,
И.К. Мазурова, В.А. Алешкин, ФГУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии
и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Лаборатория диагностики дифтерийной инфекции, г. Москва

Борисова Ольга Юрьевна – 125212 г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10. Раб. тел.: (495) 459-21-46, e-mail olgaborisova@mail.ru

Разработан прямой ускоренный и эффективный метод лабораторной диагностики коклюша, основанный на изотермальной амплификационной технологии, обладающий высокой специфичностью (100%), высокой чувствительностью (102 м. кл.) и позволяющий выявлять возбудителя заболевания в течение 9–10 часов от начала исследования непосредственно в клиническом материале от больного без этапа выделения «чистой» культуры. Клинические испытания метода проведены на базе ИКБ № 1 (г. Москва). Обследовано 86 больных, из них 53 больных с клиническим диагнозом «коклюш» и 33 больных с другими заболеваниями дыхательных путей. Основную группу обследованных больных (67,9%) составили дети в возрасте до 1 года. Проведенные клинические испытания разработанного метода показали его высокую специфичность (100%), высокую диагностическую эффективность (84,9±4,9% (p<0,001) по сравнению с бактериологическим методом, эффективность которого составила 22,7±5,7% (p<0,001).

Ключевые слова: коклюш, диагностика, молекулярно-генетические методы, амплификационные технологии.

Direct accelerated and effective method for lab diagnostics of pertussis has been developed. It is based on isothermal amplification technology; this method has high specificity (100%), high sensitivity (102 m.) and allows to detect causative agent during 9-10 hours from the beginning of study directly in clinical material of a patient without separating pure culture. Clinical trial of the method was carried out on the base of Infectious Diseases Hospital № 1 (Moscow). 86 patients were examined, among them there were 53 patients with clinical diagnosis "pertussis" and the rest 33 with other diseases of breathing passages. The main group of the examined patients consisted of children under 1 year old. Conducted clinical trials of the developed method showed its high specificity (100%) and high diagnostic efficiency (84,9±4,9% (p<0,001) in comparison with bacteriologic method which efficiency was 22,7±5,7% (p<0,001).

Key words: pertussis, diagnostics, molecular-genetic method, amplification technologies.

Введение

Существующая лабораторная диагностика коклюша в России основана на микробиологических и серологических методах исследования [1]. Однако эти методы являются недостаточно чувствительными и эффективными.

Бактериологическая диагностика коклюша от начала исследования до выдачи ответа занимает от 5 до 7 дней [1]. Результат выделения возбудителя у больных коклюшем в клинической практике, как правило, не превышает 10,0% [2, 3]. Низкая высеваемость микроорганизмов рода *Bordetella* обусловлена их сниженной выживаемостью во внешней среде, поздним обследованием больных, низким качеством питательных сред, применением антибиотиков до начала бактериологического обследования, медленным ростом, контаминацией исследуемого материала другими микроорганизмами, недостаточной кратностью обследования, неправильным взятием исследуемого материала. Большие трудности имеют и серологические методы диагностики, которые эффективны к 4-ой неделе заболевания и используются для ретроспективного анализа [2, 3, 4].

Разработка и применение молекулярно-генетических методов диагностики являются перспективным направлением в лабораторной диагностике коклюша. За рубежом

используют множество технологий полимеразной цепной реакции (ПЦР) [5, 6, 7, 8, 9, 10], позволяющих выявлять различные мишени в геноме *Bordetella pertussis*. Однако все используемые в настоящее время амплификационные технологии не обладают высокой специфичностью и дают ложноположительные результаты, что связано с большой гомологией геномов представителей рода *Bordetella*.

Исследования японских ученых [10] по разработке новой молекулярно-генетической амплификационной технологии – loop-mediated isothermal amplification (LAMP) – показали высокую чувствительность и специфичность, многократно превышающие технологии ПЦР, а также высокую амплификационную эффективность, которая достигается при изотермальных условиях реакции. Такая технология явилась основой модифицированных методов LAMP и успешно применяется для диагностики значительного количества микроорганизмов, в том числе для межштаммовой дифференциации представителей рода *Bordetella* – штаммов *B. pertussis* от штаммов *Bordetella parapertussis* и *Bordetella bronchiseptica* [8]. Вместе с тем, наиболее важным является выявление возбудителя непосредственно в клиническом материале от больного.



Поэтому **целью исследования** явилась разработка прямого ускоренного метода выявления возбудителя заболевания в клиническом материале от больных коклюшем.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы: изучено 50 штаммов *B. pertussis*, выделенных от больных коклюшем в г. Москве в 2000-2005 гг. В исследование включено 20 штаммов *B. parapertussis*, 8 штаммов *B. bronchiseptica*, 2 штамма *Corynebacterium glutamicum*, 10 штаммов *Corynebacterium ulcerans*, 8 штаммов *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, 20 штаммов *Corynebacterium diphtheriae* и 2 штамма *Staphylococcus aureus* (из коллекции ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского). Выращивание штаммов и изучение морфологических, культуральных и биохимических свойств осуществляли согласно Инструкции Минздрава СССР (1984 г.) [1] и методикам И.К. Мазурова с соавт. [11]. Обследованы 83 пациента, госпитализированные в Инфекционную клиническую больницу № 1 (г. Москва). Из них 50 больных с клиническим диагнозом «коклюш» и 33 пациента с другими заболеваниями дыхательных путей. Диагноз коклюша устанавливался на основании характерной клинической картины заболевания и оценки эпидемиологической ситуации в окружении больного.

Результаты и обсуждение

Первым этапом разработки нового метода было воспроизведение LAMP-технологии. Учитывая отсутствие реагентов, используемых японскими коллегами, трудности их приобретения и их высокую стоимость, были проведены предварительные эксперименты по оптимизации условий реакции – подобраны реагенты, отработаны концентрации и условия постановки реакции. В результате большого числа предварительных экспериментов вместо предложенной реакционной смеси был разработан состав реакционного буфера (10x буфер ПЦР, 25 mM MgCl₂, 2 mM dNTP, Bst полимеразы и три пары праймеров – BP-F3, BP-B3, BP-FIP, BP-BIP, BP-LF, BP-LB). Амплификацию выполняли в изотермальном режиме: 65°C – 60 мин. и 80°C – 2 мин. Визуализацию полученных ампликонов проводили после электрофореза в 2% агарозном геле при 160V.

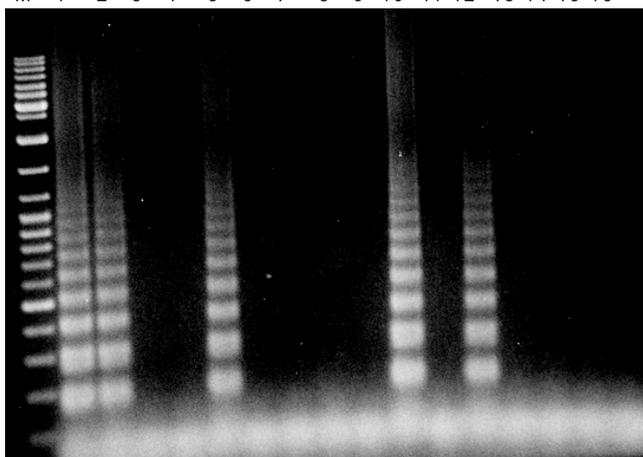
Показана высокая специфичность метода при изучении 120 штаммов микроорганизмов – представителей различных родов (*Bordetella*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*) (рис.). Обнаружено, что для всех образцов, содержащих ДНК штаммов *B. pertussis*, характерными были специфические светящиеся Ladder-подобные профили. Во всех остальных образцах, содержащих ДНК других микроорганизмов, регистрировали отрицательный результат.

Однако, необходимы дальнейшие исследования, повышающие чувствительность нового метода, для выявления возбудителя заболевания непосредственно в клиническом материале с тампона от больных коклюшем без этапа выделения «чистой» культуры. Разработка прямого метода включала несколько этапов экспериментальных исследований.

Изучены методы предварительной подготовки образца (смыв клинического материала с тампона от больного, первичная обработка, разрушение клеточной стенки возбудителя коклюша в клиническом образце различными детергентами) и выделения ДНК (с использованием сорбентов, детергентов, магнитных частиц, а также метода кипячения). В результате многочисленных экспериментов разработан прямой ускоренный молекулярно-генетический метод лабораторной диагностики коклюша, основанный на LAMP-технологии, обладающий высокой чувствительностью, выявляющий 100 м. к. возбудителя коклюша непосредственно в клиническом материале в течение 9–10 часов с момента начала обследования. Все этапы разработки нового метода (LAMP-вариант) описаны в заявке на изобретение

Дорожки:

М 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



№ 2007147797/13 (052390) от 25.12.2007 г. и получено положительное решение о выдаче патента.

РИС.

Профили LAMP-ампликонов штаммов *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*, *C. glutamicum*, *C. ulcerans*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. diphtheriae* и *S. aureus*.

Дорожки: 1, 2, 5, 10, 12 – ДНК штаммов *B. pertussis* (50 штаммов); 3, 4 – ДНК штаммов *B. parapertussis* (20 штаммов); 6, 7 – ДНК штаммов *B. bronchiseptica* (8 штаммов); 8 – ДНК штамма *C. glutamicum* (2 штамма); 11 – ДНК штамма *C. ulcerans* (10 штаммов); 14 – ДНК штамма *C. pseudodiphtheriticum* (8 штаммов); 15, 16 – ДНК штаммов *C. diphtheriae* (20 штаммов); 9, 13 – ДНК штаммов *S. aureus* (2 штамма).

Клинические испытания разработанного метода ускоренной лабораторной диагностики коклюша проводили на базе Инфекционной клинической больницы № 1 (г. Москва) и совместно с врачами-бактериологами филиала ФГУЗ ЦГиЭ в Северо-Западном административном округе (г. Москва) В.Г. Скачковой и В.С. Савинковой. Обследованы 86 больных, из них 53 больных с клиническим диагнозом «коклюш» и 33 больных с другими заболеваниями. Возраст больных колебался от 1 месяца до 14 лет, основную группу больных коклюшем (67,9%) составляли дети в возрасте до 1 года. Клинический материал от 86 больных коклюшем и из контрольной группы изучали одновременно в разработанном молекулярно-генетическом методе – LAMP-варианте и в классическом бактериологическом методе (таблица).

Из таблицы видно, что из 53 больных с диагнозом «коклюш» у 35 больных (в 66,0% случаев) клинический диагноз подтвержден только в LAMP-варианте; у 10 больных (в 18,9% случаев) диагноз подтвержден в LAMP-варианте и в бактериологическом методе; у 2 больных (в 3,8% случаев) диагноз подтвержден только в бактериологическом методе и у 6 больных (в 11,3% случаев) клинический диагноз не был подтвержден ни в одном из используемых методов. При сопоставлении эффективности LAMP-варианта и бактериологического метода показано, что из 53 больных коклюшем у 45 больных клинический диагноз «коклюш» был подтвержден в LAMP-варианте, т. е. процент совпадений клинического диагноза и результатов разработанного метода составил $84,9 \pm 4,9\%$ ($p < 0,001$). В то время, как бактериологическое подтверждение клинического диагноза «коклюш» было лишь в 12 случаях, что составило $22,7 \pm 5,7\%$ ($p < 0,001$).

Группы пациентов	Методы обследования больных	Результаты обследования больных	
		Абс.	% ± m
Больные коклюшем	Клиника +	35	$66,0\% \pm 6,5\%$
	LAMP-вариант +		
	Бактериология -		
	Клиника +	10	$18,9\% \pm 5,4\%$
	LAMP-вариант +		
	Бактериология +		
	Клиника +	2	$3,8\% \pm 2,6\%$
	LAMP-вариант -		
	Бактериология +		
	Клиника +	6	$11,3\% \pm 4,3\%$
LAMP-вариант -			
Бактериология -			
Всего	53	100%	
Больные ОРВИ и др.	Клиника -	33	100%
	LAMP-вариант -		
	Бактериология -		

ТАБЛИЦА. Результаты апробации нового метода диагностики коклюша – LAMP-варианта

С целью определения специфичности разработанного метода взята контрольная группа больных – 33 человека с диагнозами «ОРВИ», «лакунарная ангина», «респираторный микоплазмоз» и др. Исследование клинических образцов, полученных от этих больных, в разработанном LAMP-варианте показало, что у всех 33 больных, т. е. в 100% случаев, были отрицательные результаты, также как и при бактериологическом обследовании, что свидетель-

ствует о специфичности разработанного метода диагностики.

Заключение

Разработан прямой ускоренный и эффективный метод лабораторной диагностики коклюша, основанный на изотермальной амплификационной технологии, обладающий высокой специфичностью (100%), высокой чувствительностью (10^2 м. кл.) и позволяющий выявлять возбудителя заболевания в течение 9-10 часов от начала исследования непосредственно в клиническом материале от больного без этапа выделения «чистой» культуры. Проведенные клинические испытания разработанного метода LAMP-варианта подтвердили его высокую специфичность (100%), высокую диагностическую эффективность ($84,9 \pm 4,9\%$ ($p < 0,001$)) по сравнению с бактериологическим методом.



ЛИТЕРАТУРА

1. Министерство здравоохранения СССР. Инструкция по бактериологическому и серологическому исследованиям при коклюше и паракоклюше. М., 1984. 20 С.
2. Петрова М.С., Попова О.П., Москалева Т.Н. Коклюш и паракоклюш (профилактика, клиника, лечение). Методические рекомендации. М., 2000. 25 С.
3. Селезнева Т.С. Серологический мониторинг за инфекциями, управляемыми средствами вакцинопрофилактики. Эпидемиология и вакцинопрофилактика, 2004. № 5 (18). С. 14-16.
4. Ценева Г.Я., Курова Н.Н. Микробиологическая характеристика возбудителя коклюша и лабораторная диагностика коклюша. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2003. № 4 (5). С. 329-341.
5. Farrell D., Daggard G., Mukkur T.K.S. Nested duplex PCR to detect *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* and its application in diagnosis of pertussis in nonmetropolitan southeast Queensland, Australia. J. Clin. Microbiol., 1999. Vol. 37. P. 606-610.
6. Fry N., Tzivra O., Li Y.T., McNiff A., Doshi N., Maple C., Crocroft N., Miller E., George R., Harrison T. Laboratory diagnosis of pertussis infection: the role of PCR and serology. J. Medical Microbiol., 2004. № 53. P. 519-525.
7. Grimprel E., Begue P., Anjak I., Betsou F., Guiso N. Comparison of polymerase chain reaction, culture and western immunoblot serology for diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. J. Clin. Microbiol., 2004. Vol. 1. P. 2745-2750.
8. Kamachi K., Toyozumi-Ajisaka H., Toda K., Soeung S., 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. Vol. 44. № 5. P. 1899-1902.
9. Lind-Brandberg L., Welinder-Olsson C., Lagergard T., Tarager J., Trollfors B., Zackrisson G. Evaluation of PCR for diagnosis of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* infections. J. Clin. Microbiol., 1998. Vol. 36. P. 679-683.
10. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucl. Acids Research, 2000. Vol. 28. № 12. P. 63.
11. Мазурова И.К., Мельников В.Г., Комбарова С.Ю., Борисова О.Ю., Жилина Н.Я. Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции. Методические указания. МУ 4.2.698-98. М.: Интэрсэн, 1998. 47 С.