

СОДЕРЖАНИЕ ДНК *BORDETELLA PERTUSSIS* В НОСОГЛОТОЧНЫХ МАЗКАХ ДЕТЕЙ И ВЗРОСЛЫХ, ПОЗИТИВНЫХ В ПЦР РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии
и микробиологии»

Проведен сравнительный анализ содержания ДНК *B. pertussis* в 351 носоглоточном мазке лиц разного возраста, позитивных в ПЦР реального времени. Относительное количество ДНК оценивали по значению C_T в TaqMan ПЦР реального времени с праймерами к IS481. Достоверно более высокое содержание ДНК отмечалось в носоглоточных мазках детей в возрасте младше 11 месяцев ($p < 0.05$). Среднее значение C_T в этой группе лиц составляло 32,4 против значений 35,6; 35,0; 37,7; 37,1 в возрастных группах 1–4, 5–9, 10–14, 15–80 лет, соответственно. Среднее значение C_T в позитивных образцах, взятых в период ≥ 15 дней от начала кашля, были достоверно выше в сравнении с образцами, взятыми в острый период заболевания (≤ 14 дней) во всех возрастных группах, исключая детей первого года жизни. Полученные данные свидетельствуют о положительной связи содержания ДНК *B. pertussis* в носоглоточных мазках с возрастом пациента и о более быстрой элиминации ДНК из носоглотки у детей старших возрастных групп, подростков и взрослых в отличие от детей первого года жизни.

Ключевые слова: коклюш, *Bordetella pertussis*, носоглоточный мазок, TaqMan ПЦР реального времени, содержание ДНК.

V. L. Kolodkina, V. S. Martynov

CONTENT OF *BORDETELLA PERTUSSIS* DNA IN NASOPHARYNGEAL SWAB FROM CHILDREN AND ADULTS POSITIVE IN REAL-TIME PCR

A comparative analysis of *B. pertussis* DNA content in 351 nasopharyngeal swabs from persons of different age positive in real-time PCR was conducted. The DNA content was measured by quantitative IS481 TaqMan real-time PCR. The content of *B. pertussis* was significantly higher in infant less than 11 months old ($p < 0.05$). The mean C_t value in this age group was 32.4 against mean C_t value the values 35.6; 35.0; 37.7; 37.1 in the age groups 1–4, 5–9, 10–14, 15–80 years respectively. The mean C_t value in the PCR positive nasopharyngeal swabs taken in the range of ≥ 15 days of onset of cough were significantly higher compared with swabs taken during the acute phase of the disease (≤ 14 days) in all age groups except infants. The findings suggest that *B. pertussis* DNA content in nasopharyngeal swabs is correlated with patient age and that DNA elimination

from the nasopharynx of children older age groups, teenagers and adults is more rapid than children of the first year.

Key words: pertussis, *Bordetella pertussis*, nasopharyngeal swab, TaqMan real-time PCR, DNA content.

Коклюш – это респираторная инфекция, которая вызывается бактерией *Bordetella pertussis*, и является не только болезнью детей, но и инфекцией, вызывающей длительный кашель во всех возрастных группах от новорожденных до пожилых людей. В последние годы в ряде стран отмечается возрождение коклюшной инфекции, несмотря на высокий охват иммунизацией детей. Проведение лабораторной диагностики коклюшной инфекции позволяет получить информацию об эпидемиологической ситуации, истинном бремени и динамике инфекции [8]. Лабораторная диагностика инфекции основывается на исследовании клинического материала тремя методами: бактериологическим, молекулярно-генетическим и серологическим. Бактериологический метод является золотым стандартом. Однако, даже с идеально взятыми образцами и условиями культивирования, чувствительность бактериологического метода колеблется от 20 до 40 %, и получение ответа достигается не ранее 5–7-го дня от начала высева носоглоточных мазков. Низкая чувствительность и длительность получения ответа делают этот метод недостаточным для эффективного надзора за коклюшной инфекцией. Более того, бактериологический метод является менее чувствительным у взрослых, чем у детей [5].

Революцию в диагностике коклюшной инфекции произвели методы амплификации нуклеиновой кислоты возбудителя коклюша, разработанные в последние десять лет. Разные методы, включая ПЦР реального времени и метод петлевой изотермической амплификации (LAMP), были разработаны для выявления разных участков генома *B. pertussis* [7]. Наиболее часто используемыми в ПЦР генами-мишенями являются повторяющаяся инсерционная последовательность IS481 и промоторная область гена токсигенности для *B. pertussis* и повторяющаяся инсерционная последовательность IS1001 для *B. paraptussis*. В ПЦР реального времени с праймерами к IS481 могут выявляться и другие представители рода *Bordetella* такие как *B. holmesii*, *B. bronchiseptica*, однако эта мишень широко используется для диагностики *B. pertussis* [3]. Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, направленная на выявление инсерционного элемента IS481, является не только

наиболее быстрым и чувствительным диагностическим методом выявления *B. pertussis*, но также позволяет количественно оценить содержание ДНК возбудителя коклюша в клиническом материале [2].

Цель исследования – провести сравнительный анализ содержания ДНК *B. pertussis* в носоглоточных мазках, позитивных в ПЦР реального времени, у лиц разного возраста в Республике Беларусь.

Материалы и методы. Сравнительный анализ содержания ДНК возбудителя коклюша в носоглоточных мазках лиц разного возраста проведен для ПЦР-позитивных образцов, выявленных в 2015 году. Всего 1022 носоглоточных мазка от пациентов с подозрением на коклюш и контактных лиц, кашляющих две и более недели, было исследовано в ПЦР реального времени в 2015 году. Носоглоточные мазки были получены от 888 лиц (733 пациента и 155 контактных лиц). Возраст лиц, обследованных в ПЦР, составил: до года – 139 человек; от 1 до 4 лет – 251 человек; от 5 до 9 лет – 290 человек; от 10 до 14 лет – 113 человек; от 15 до 80 лет – 95 человек.

Мультиплексную TaqMan ПЦР в реальном времени, предназначенную для выявления и дифференциации ДНК возбудителя коклюша и паракклюша проводили параллельно в двух пробирках. Две мишени (IS481, BP0026) предназначались для выявления ДНК *B. pertussis* и одна мишень (IS1001) – для выявления ДНК *B. paraptussis*. В одной пробирке проходила реакция с праймерами к мишеням IS481 и IS1001, во второй пробирке – к тиолазному гену BP0026 и гену человека GAPDH. Состав амплификационной смеси и праймеры к мишеням использовали такие же, как описано ранее [4]. Реакцию проводили с использованием амплификатора CFX96 Real-Time System (BioRad) в объеме 25 мкл в 96 луночной плашке или пробирках. Условия амплификации были следующие: преденатурация 5 мин при 95 °C с последующими 40 циклами, включающими 95 °C в течение 10 с, 60 °C в течение 1 мин.

Содержание ДНК *B. pertussis* в носоглоточных мазках оценивали по значению СТ в TaqMan ПЦР реального времени с праймерами к IS481. Соответствие значений СТ и количества ДНК *B. pertussis* оценивалось по стандартной кривой,

Оригинальные научные публикации

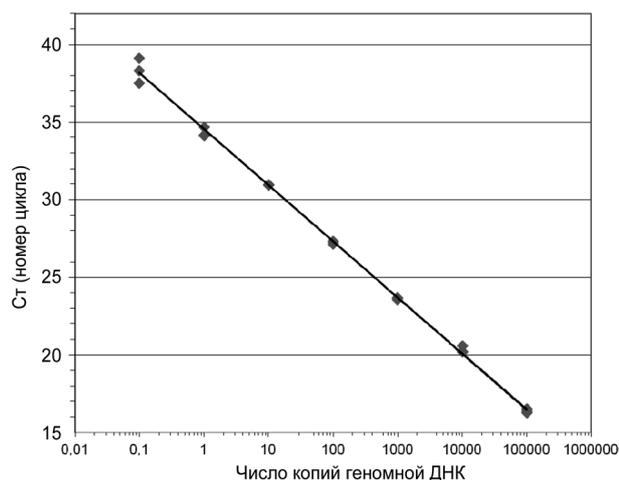


Рисунок 1. Стандартная кривая ПЦР реального времени с праймерами к IS481, с использованием ДНК *B. Pertussis* (n – число обследованных в ПЦР реального времени на наличие ДНК *B. Pertussis*)

которую строили путем анализа серии десятикратных разведений ДНК *B. pertussis* Tohama1 с концентрацией от 10^6 до 10^{-1} геном эквивалентов (рисунок 1).

Результаты и обсуждение. Из 1022 носоглоточных мазков положительными в ПЦР на наличие ДНК возбудителя коклюша были 351 (34,3 %). При этом 314 положительных мазков были от 252 пациентов с подозрением на коклюш, а 37 мазков – от 35 контактных лиц. Три мазка от трех пациентов были положительными на наличие ДНК возбудителя паракоклюша.

Наибольшая доля лиц, положительных в ПЦР к возбудителю коклюша, выявлена среди детей в возрасте от 1 до 11 месяцев в сравнении с другими возрастными группами: 74,1 % против 34,7 %, 17,6, 19,5, 25,3 % и у лиц 1–4, 5–9, 10–14, 15–80 лет, соответственно (рисунок 2).

Содержание ДНК в носоглоточных мазках достоверно различалось среди лиц разных возрастных групп. Положительные образцы ДНК 103 детей в возрасте от 1 до 11 месяцев имели значение C_T в интервале 21,5–39,5 (среднее

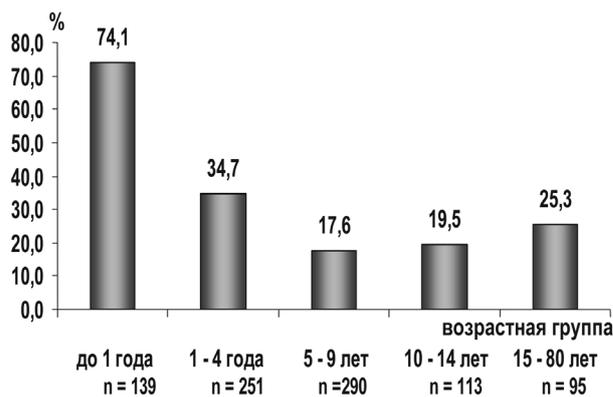


Рисунок 2. Процент лиц, положительных в ПЦР реального времени на *B. pertussis* в разных возрастных группах, выявленных в 2015 году

значение 32,4 что соответствует 6×10^3 копий геномной ДНК на миллилитр). В других возрастных группах детей, подростков и взрослых содержание ДНК было достоверно ниже ($p < 0,05$). В группе 87 детей в возрасте 1–4 года образцы имели значение C_T в интервале 20,9–39,9 (среднее значение 35,6). У 51 ребенка 5–9 лет образцы имели значение C_T в интервале 24,6–39,8 (среднее значение 35,0). Значительно выше показатели C_T и с меньшим интервалом значений были в образцах детей 10–14 лет, подростков и взрослых. Положительные образцы 22 детей 10–14 лет имели значение C_T в интервале 31,9–39,6 (среднее значение 37,7), а образцы 24 лиц в возрасте 15–80 лет имели значение C_T в интервале 30,1–39,7 (среднее значение 37,1).

В отличие от детей первого года жизни элиминация ДНК из носоглотки достоверно быстрее отмечалась у детей старших возрастных групп, а также у подростков и взрослых ($p < 0,05$). Как видно из таблицы, значения C_T в выявленных положительных в ПЦР носоглоточных мазках, взятых в интервале ≥ 15 дней от начала кашля, были достоверно выше в сравнении с мазками, взятыми в острый период заболевания (≤ 14 дней)

Таблица. Значения C_T в соответствии с возрастом и периодом обследования лиц с подозрением на коклюш

Возрастная группа (лет)	Общее число положительных в ПЦР	Пациенты, обследованные в интервале ≤ 14 дней		Пациенты, обследованные в интервале ≥ 15 дней		p
		число положительных в ПЦР	среднее значение C_T	число положительных в ПЦР	среднее значение C_T	
До 1 года	103	64	32,2	39	33,4	$> 0,05$
1–4 года	87	42	33,6	45	36,3	$< 0,05$
5–9 лет	51	29	33,8	22	36,8	$< 0,05$
10–14 лет	22	5	35,2	17	37,7	$< 0,05$
15–80 лет	24	12	34,3	12	38,4	$< 0,05$

во всех возрастных группах, исключая детей первого года жизни.

Согласно литературным данным, на основе исследований носоглоточных мазков методом ПЦР, выявлена зависимость содержания ДНК *B. pertussis* в клиническом материале от возраста пациента. Показано, что в носоглоточных мазках взрослых содержание ДНК *B. pertussis*, как на ранней, так и на поздней стадии заболевания, очень низкое, что вероятно обуславливает неярко выраженные у них симптомы заболевания и негативные результаты бактериологического метода. [1,6]

Наши исследования подтверждают более высокое содержание ДНК *B. pertussis* в носоглоточных мазках у детей до одного года в сравнении с детьми старших возрастов, подростками и взрослыми. Так же нами было отмечено, что у детей до одного года не отмечается существенной элиминации ДНК возбудителя коклюша из носоглотки в течение первых недель заболевания. В то время как у остальных возрастных групп содержание ДНК существенно снижается в материале, взятом на поздних сроках заболевания. Этим может обуславливаться более низкий процент позитивных ПЦР мазков от общего числа исследованных (рисунок 2).

Среди 733 пациентов с подозрением на коклюш, обследованных в 2015 году, 478 были негативными в ПЦР. В том числе 34 пациента были в возрасте до 1 года, 138 – в возрасте 1–4 года, 183 – в возрасте 5–9 лет, 77 – в возрасте 10–14 лет и 46 – в возрасте 15–80 лет. Нами были получены 88 сывороток крови от пациентов с негативным результатом в ПЦР, материал от которых был взят на 21 и более дни от начала заболевания. Это позволило использовать данные сыворотки для диагностики коклюшной инфекции на основании анализа титра IgG к коклюшному токсину в одной сыворотке, а не в парных по нарастанию титра антител. В целом, диагностический титр (100 и более МЕ/мл), свидетельствующий об инфекции коклюша, выявлен в 53 из 88 (60,2 %) сывороток крови. Доля положительных сывороток в возрастных группах составила: 37 % в группе пациентов 1–4 года; 58 % – в группе 5–9 лет; 81,3 % – в группе 10–14 лет; 81,8 % – в группе 15–80 лет. Что говорит о снижении эффективности ПЦР на поздних стадиях заболевания, особенно у подростков и взрослых. У таких пациентов более целесообразно проводить серологические исследования для подтверждения коклюшной инфекции.

Таким образом, использование ПЦР метода для выявления ДНК *B. pertussis* в носоглоточных мазках позволяет существенно повысить чувствительность и эффективность диагностики коклюшной инфекции, а также уменьшить длительность проведения исследований в сравнении с бактериологическим методом. В то же время, выявленные отличия в содержании ДНК в носоглоточных мазках у детей старших возрастных групп, подростков и взрослых, от детей первого года жизни, свидетельствует о необходимости наряду с методом ПЦР использование серологического метода для лабораторного подтверждения диагноза коклюша в этих возрастных группах, особенно при их обследовании на поздней стадии заболевания.

Литература

1. Curran, T., Coyle P. V. Understanding the true burden and infection dynamics of *Bordetella pertussis* using molecular diagnostics // *J. Infect.* – 2016. – Vol. 01. – P. 1–3.
2. 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. – P. 749–754.
3. Fry, N. K., Duncan J., Wanger K. et al. Role PCR in the diagnosis of pertussis infection in infants: 5 years' experience of provision of a same-day real-time PCR service in England and Wales from 2002 to 2007 / *J. Med. Microbiol.* – 2009. – Vol. 58. – P. 1023–1029.
4. Kolodkina, V., Martynov V., Babenko A. Multiplex real-time PCR assay for detection and differentiation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* // *Iran J. Microbiol.* – 2014. – № 3, vol. 6. – P. 140–148.
5. Marcon, M. J., Hamoudi A. C., Cannon H. J., Hribar M. M. Comparison of Throat and Nasopharyngeal Swab Specimens for Culture Diagnosis of *Bordetella pertussis* Infection // *J. Clin. Microbiol.* – 1987. – Vol. 25. – P. 1109–1110.
6. Nakamura, Y., Kamachi K., Toyozumi-Ajisaka H., Otsuka N., Saito R., Tsuruoka J., Katsuta T., Nakajima K., Okada K., Kato T., Arakawa Y. Marked difference between adult and children in *Bordetella pertussis* DNA load in nasopharyngeal swabs // *Infect. Clin. Microbiol.* – 2011. – Vol. 173. – P. 365–370.
7. Riffelmann, M., von Konig C. H., Caro V., Guiso N. Nucleic acid amplification tests for diagnosis of *Bordetella* infections // *J. Clin. Microbiol.* – 2005. – Vol. 43. – P. 4925–4929.
8. Wood, N., McIntyre P. Pertussis: review of epidemiology, diagnosis, management and prevention // *Pediatrics Respiratory Reviews.* – 2008. – Vol. 9. – P. 201–212.

Поступила 6.12.2016 г.