

## Опыт разработки и использования новой тест-системы для скрининга и диагностики инфекций, вызывающих острые респираторные заболевания

Т. В. Припутневич, А. Б. Гордеев\*, О. Д. Гончарук, В. В. Чубаров,  
Д. Ю. Трофимов, А. А. Быстрицкий, А. Е. Донников

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова» Минздрава России, Москва

### Резюме

**Актуальность.** Острые респираторные заболевания (ОРЗ) являются серьезной проблемой здравоохранения не только из-за высокой частоты их возникновения, но и вследствие наносимого ими экономического ущерба как в виде прямых затрат (стоимость диагностики и лечения), так и не прямых расходов (нетрудоспособность, снижение производительности труда и т.п.). Беременные женщины и дети до 5 лет входят в группу риска по развитию серьезных осложнений после перенесенного ОРЗ. Для учреждений родовспоможения является актуальной задачей оперативное выявление возбудителя инфекции, чтобы выбрать адекватную терапию. В последние годы отмечается острая необходимость в создании отечественной комплексной диагностической тест-системы, основанной на молекулярно-генетических методах, для детекции возбудителей инфекций, вызывающих ОРЗ. **Цель.** Провести анализ этиологической структуры ОРЗ, включая грипп, у пациентов с клиническими симптомами респираторной инфекции а также разработать и внедрить новую тест-систему для быстрого скрининга и диагностики возбудителей, вызывающих ОРЗ. **Материалы и методы.** При исследовании этиологической структуры ОРЗ, включая грипп, проводились культуральные исследования отделяемого слизистой носа и зева с последующей идентификацией микроорганизмов с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии и молекулярно-генетическое исследование (ПЦР в режиме реального времени) с помощью экспериментальной тест-панели, содержащей праймеры, позволяющие детектировать: вирусы гриппа А, В, вирусы парагриппа 1-го, 2-го, 3-го и 4-го типов, коронавирусы OC43, HKU1, NL63, E229, респираторно-синцитиальный вирус, метапневмовирус, риновирус и аденовирус, а также бактериальные возбудители: *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*. Разработка тест-системы осуществлялась с использованием следующих методов: ПЦР в режиме реального времени, комбинации реакции обратной транскрипции и ПЦР в режиме реального времени (ОТ-ПЦР) и метода высокопроизводительного секвенирования (NGS). **Результаты и обсуждение.** Проведен анализ этиологической структуры ОРЗ и гриппа у пациентов с клиническими проявлениями (кашель, першение/боль в горле/гиперемия слизистой оболочки неба и задней стенки глотки, одышка/затрудненное дыхание, острый насморк/заложенность носа). Выявлен видовой спектр бактериальных и вирусных патогенов. Создана новая тест-система на основе ПЦР, ОТ-ПЦР в режиме реального времени и NGS для комплексной диагностики как вирусных, так и бактериальных возбудителей ОРЗ, состоящая из трех отдельных компонентов: основной тест-системы «ОРЗ», осуществляющей детекцию основных вирусных и бактериальных патогенов – возбудителей ОРЗ, и двух дополнительных наборов реагентов: «Осельтамивир устойчивость» и «Осельтамивир/Занамивир устойчивость». **Заключение.** Новую тест-систему можно использовать для выявления и дифференциации нуклеиновых кислот возбудителей ОРЗ человека. В результате анализа этиологической структуры ОРЗ, включая грипп, обращает на себя внимание существенно меньшее разнообразие выявленных возбудителей в 2020 г. и значительно более выраженное доминирование риновирусной инфекции по сравнению с ранее проведенным нами исследованием в 2019 г.

**Ключевые слова:** острое респираторное заболевание, острая респираторная вирусная инфекция, грипп, диагностика, тест-система, этиологическая структура

Конфликт интересов не заявлен.

Работа выполнялась в рамках Государственного контракта с Минздравом России от 22.10.2018 № К-27-НИР/98-3 на выполнение научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ по теме: «Разработка средств и технологий для скрининга и диагностики инфекций, вызывающих острые респираторные заболевания, с целью профилактики осложнений, выбора оптимальной схемы лечения и рационального использования противовирусных и антибактериальных препаратов (2018–2020 годы)» (шифр: «ОРЗ»).

\* Для переписки: Гордеев Алексей Борисович, к. б. н., заведующий лабораторией биоинформационного анализа института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии, ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России, 117997, Москва, ул. Академика Опари-на, д. 4. +7 (916) 226-86-67, [gordeew@vega.protres.ru](mailto:gordeew@vega.protres.ru). ©Припутневич Т. В. и др.

**Для цитирования:** Припутневич Т. В., Гордеев А. Б., Гончарук О. Д. и др. Опыт разработки и использования новой тест-системы для скрининга и диагностики инфекций, вызывающих острые респираторные заболевания. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2022;21(3):72–79. <https://doi:10.31631/2073-3046-2022-21-3-72-79>

### Experience in the Development and Use of a New Test System for Screening and Diagnosis of Acute Respiratory Infections

TV Priputnevich, AB Gordeev\*\*, OD Goncharuk, VV Chubarov, DYu Trofimov, AA Bystritsky, AE Donnikov

National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov, Moscow, Russia

#### Abstract

**Relevance.** Acute respiratory infections (ARI) are a serious health problem not only because of the high frequency of their occurrence, but also because of the economic damage they cause both in the form of direct costs (the cost of diagnosis and treatment) and indirect costs (disability, reduced labor productivity, etc.). Pregnant women and children under 5 years of age are included in the group of patients with risk factors for complications of influenza and other ARI, therefore, an analysis of the etiological structure of ARI and influenza in obstetric hospitals is an urgent task. In recent years, there has been an urgent need to create a national complex diagnostic test system based on molecular genetic methods for detecting infectious agents that cause ARI.

**Aims.** The aim of the study is to analyze the etiological structure of ARI and influenza in patients with clinical symptoms and to develop and implement a new test system for rapid screening and diagnosis of infections that cause ARI. **Materials & methods.** When studying the etiological structure of ARI and influenza, cultural studies of the nasal and pharyngeal mucosa were carried out, followed by identification of microorganisms using MALDI-TOF mass spectrometry and molecular genetic study (real-time PCR) using an experimental test panel containing primers that allow detecting the following viruses: influenza A, B viruses, parainfluenza viruses of the 1st, 2nd, 3rd and 4th types, coronaviruses OS43, HKU1, NL63, E229, respiratory syncytial virus, metapneumovirus, rhinovirus and adenovirus, as well as bacterial pathogens of ARI: *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*. The test system was developed using the following methods: real-time PCR, a combination of reverse transcription and real-time PCR (RT-PCR) and the next generation sequencing (NGS) method. **Results.** The etiological structure of ARI and influenza was analyzed in patients with clinical manifestations (cough, tickling/sore throat/hyperemia of the mucous membrane of the palate and the back wall of the pharynx, shortness of breath/difficulty breathing, acute runny nose/nasal congestion). The species spectrum of bacterial and viral pathogens was revealed. A new test system based on PCR, real-time RT-PCR and NGS has been created for complex diagnostics of both viral and bacterial pathogens of ARI, consisting of three separate components: the main test system «ARI», which detects the main viral and bacterial pathogens of ARI, and two additional sets of reagents: «Oseltamivir resistance» and «Oseltamivir/Zanamivir resistance». **Conclusions.** The new test system can be used to detect and differentiate nucleic acids of pathogens of ARI of humans. The test system seems to us promising for further use. As a result of the analysis of the etiological structure of acute respiratory infections and influenza, attention is drawn to a significantly smaller variety of identified pathogens in 2020 and a much more pronounced dominance of rhinovirus infection compared to our previous study in 2019.

**Keywords:** acute respiratory infection, acute respiratory viral infection, influenza, diagnosis, test system, etiological structure  
No conflict of interest to declare.

The work was carried out under the State contract with the Ministry of Health of Russia dated October 22, 2018 No. K-27-NIR / 98-3 for the implementation of research and development work on the topic: «Development of tools and technologies for screening and diagnosing infections that cause acute respiratory diseases, in order to prevent complications, select the optimal treatment regimen and rational use of antiviral and antibacterial drugs (2018-2020)» (code: «ARI»).

**For citation:** Priputnevich TV, Gordeev AB, Goncharuk OD, et al. Experience in developing a new test system for screening and diagnosis of infections that cause acute respiratory diseases, and its use. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2022;21(3):72–79 (In Russ.). <https://doi:10.31631/2073-3046-2022-21-3-72-79>

## Введение

Острые респираторные заболевания (ОРЗ) – это большая группа острых инфекционных заболеваний, возбудителями которых являются вирусы, бактерии, хламидии, микоплазмы. Инфекции верхних дыхательных путей являются серьезной проблемой здравоохранения не только из-за высокой частоты их возникновения, но и вследствие наносимого ими экономического ущерба как в виде прямых затрат (стоимость диагностики и лечения), так и не прямых

расходов (нетрудоспособность, снижение производительности труда и т.п.). Каждый год в мире регистрируется более 1 млрд человек с ОРЗ, что превосходит такие заболевания, как рак, ВИЧ-инфекция, ишемическая болезнь сердца или малярия [1–3].

Особое место среди ОРЗ занимает грипп, продолжающий оставаться одной из серьезных вирусных инфекций. Ежегодно во время эпидемических подъемов заболевает 5–10% взрослого населения и 20–30% детей [4].

\* For correspondence: Gordeev Alexey B., Cand. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of bioinformatic analysis, institute of microbiology, antimicrobial therapy and epidemiology, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov of Ministry of Healthcare of Russian Federation, 4, Ac. Oparina street, Moscow, 117997, Russia. +7 (916) 226-86-67, [gordeew@vega.protres.ru](mailto:gordeew@vega.protres.ru). ©Priputnevich TV, et al.

Являясь важной группой заболеваний в принципе, ОРЗ в последний год стали находиться в зоне пристального внимания из-за появления и широкого распространения коронавируса нового типа SARS-CoV-2 [5–7].

Беременные женщины и дети до 5 лет входят в группу риска развития осложнений при гриппе и других ОРЗ [8,9], поэтому проведение анализа этиологической структуры ОРЗ, включая грипп, в учреждениях родовспоможения является актуальной задачей. Нами в 2019 г. был проведен анализ этиологической структуры возбудителей ОРЗ [10]. В 2020 г. исследования по изучению структуры ОРЗ были продолжены. В настоящее время разработаны и широко используются молекулярно-генетические тест-системы для диагностики вирусных возбудителей ОРЗ. В России это такие тесты, как «АмплиСенс Influenza virus A/B-FL», «АмплиСенс Influenza virus A-тип-FL», «АмплиСенс ОРВИ-скрин-FL» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора), «ОРЗ ВирусКомплекс» и «ГриппКомплекс» («ДНК-Технология»). Однако перспективным представляется использование комплексных тест-систем, позволяющих идентифицировать как вирусные, так и бактериальные патогены одновременно [11].

Несмотря на то, что подобные тест-системы уже разработаны и достаточно широко используются (например, зарегистрированная в России панель BIOFIRE Respiratory 2.1 plus Panel (P3H 2020/11588 от 07.08.2020, bioMérieux, Франция), стоимость одного исследования составляет примерно 10 000 рублей, отечественных разработок в этом направлении нет. Поэтому в последние годы отмечается острая необходимость в создании отечественной комплексной диагностической молекулярно-генетической тест-системы для детекции возбудителей инфекций, вызывающих ОРЗ [2].

**Цель исследования** – провести анализ этиологической структуры ОРЗ, включая грипп, у пациентов с клиническими проявлениями; разработать и внедрить новую тест-систему для скрининга и диагностики ОРЗ.

**Материалы и методы**

Работа выполнена в ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России (далее – Центр) в 2020 году.

В исследование было включено 246 человек: 130 женщин, из них 22 беременных, 94 ребенка, 22 мужчины. Средний возраст пациентов в группе женщин составил 35,8 лет, в группе мужчин – 42,0 лет. Пациентов, составивших группу «дети», можно условно разделить на две подгруппы: новорожденные и в возрасте старше 1 месяца. Средний возраст детей старше одного месяца составил 5,9 лет. Новорожденных детей было 21, детей возрастом старше одного месяца – 71.

Распределение пациентов, включенных в исследование, по группам приведено в таблице (табл. 1).

Все пациентам или их представителям Центр предоставил объективную достоверную информацию об исследовании, после чего ими было подписано информированное согласие.

Включенные в исследование пациенты прошли в Центре осмотр врачом-терапевтом, сотрудницы – профпатологом, а также были проведены стандартные и специальные клинико-лабораторного обследования.

Суммарно собрано 492 образца биологического материала пациентов, прошедших обследование, в том числе: образцы отделяемого ротоглотки – 246 образцов, образцы отделяемого носоглотки – 246 образцов.

Исследование этиологической структуры ОРЗ, включая грипп, проводилось с января по ноябрь

**Таблица 1. Количество образцов биоматериала у разных групп обследованных пациентов**  
**Table 1. The number of biomaterial samples from different groups of examined patients**

Группа пациентов A group of patients	Количество образцов биоматериала The number of biomaterial samples
Женщины Women	130
в том числе беременные including pregnant women	22
небеременные non-pregnant	108
Дети Children	94
в том числе новорожденные including newborns	23
Мужчины Men	22
Итого Total	246

2020 г. с участием пациентов и сотрудников Центра с клиническими проявлениями ОРЗ. Выявление вируса SARS-CoV-2 являлось критерием исключения из исследования, так как исследование новой коронавирусной инфекции входило в задачи отдельного исследования, проводимого в Центре.

Проводилось микробиологическое исследование отделяемого слизистой носа и зева культуральным и молекулярно-генетическим (ПЦР в режиме реального времени) методами с использованием экспериментальной тест-панели.

Материал для культурального исследования брали стерильным ватным тампоном, который помещали в транспортную среду Эймса (COPAN, Испания). Посев проводили на селективные и неселективные питательные среды: кровяной агар, шоколадный агар, хромогенную среду «Уриселект», желточно-солевой агар с манитолом (OXOID, Великобритания). На поверхность шоколадного агара аппликацировали диски с бацитрацином и оптохином (OXOID, Великобритания) и инкубировали в атмосфере углекислого газа (CO<sub>2</sub>) при 37 °С. Остальные посе-вы инкубировали при температуре 37 °С, без CO<sub>2</sub>, и в течение 24–48 часов проводили оценку выросших культур, при этом особое внимание уделяли выделению следующих условно-патогенных бактерий: *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* как основных бактериальных патогенов, вызывающих ОРЗ и их осложнения, по нашим данным и данным литературы [2,10,12].

Идентификацию проводили с помощью матрично-активированной лазерной десорбционной/ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) на масс-спектрометре Autoflex III с программным обеспечением Maldi BioTyper 3.0 (Bruker Daltonics, Германия).

После идентификации выделенных микроорганизмов вышеперечисленным бактериям проводилось выделение чистой культуры с криоконсервацией и хранением в низкотемпературном холодильнике при минус 80 °С.

Разработка тест-системы для скрининга и диагностики возбудителей, вызывающих ОРЗ и грипп, осуществлялась с использованием следующих методов: полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени, комбинации реакции обратной транскрипции и ПЦР в режиме реального времени (ОТ-ПЦР) и метода высокопроизводительного секвенирования (NGS).

Разработанная тест-система включила в себя три отдельных компонента: основную тест-систему «ОРЗ», осуществляющую детекцию основных вирусных и бактериальных патогенов – возбудителей ОРЗ, и два дополнительных набора реагентов: «Осельтамивир устойчивость», «Осельтамивир/Занамивир устойчивость».

Показания к использованию основной тест-системы ОРЗ для работы с биоматериалом

от участников исследования: наличие у участника исследования симптомов или контакта с больными ОРЗ; пребывание в очагах инфекции (с целью раннего выявления возможного инфицирования и предотвращения дальнейшего распространения); дифференциальная диагностика ОРЗ. Потенциальные пользователи: квалифицированный медицинский персонал, осуществляющий взятие и предобработку клинического материала, а также специалисты, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке.

Дополнительный набор реагентов «Осельтамивир устойчивость» предназначен для определения мутации H275Y в гене нейраминидазы, связанной с устойчивостью к осельтамивиру, в препаратах РНК вируса гриппа A(H1N1)pdm09, полученных из биологического материала человека, а также из культур вируса гриппа A(H1N1)pdm09, методом обратной транскрипции и ПЦР в режиме реального времени.

Показания к проведению исследования с использованием дополнительного набора «Осельтамивир устойчивость» следующие: длительное лечение гриппа осельтамивиrom без положительной динамики; назначение терапии осельтамивиrom при подозрении на лекарственную устойчивость гриппа A(H1N1)pdm09.

Дополнительный набор «Осельтамивир/Занамивир устойчивость» предназначен для подготовки библиотек фрагментов кДНК генов нейраминидазы и гемагглютинина вирусов гриппа A(H1N1)pdm09, A(H3N2) и В для генотипирования метода высокопроизводительного секвенирования (NGS) на платформе Illumina (США) в биологическом материале человека и культурах вирусов.

Показания к проведению исследования с использованием дополнительного набора «Осельтамивир/Занамивир устойчивость» следующие: длительное лечение гриппа осельтамивиrom или занамивиrom без положительной динамики; назначение терапии при подозрении на лекарственную устойчивость вирусов гриппа.

С помощью разработанной тест-системы проводилась детекция: вируса гриппа А, вируса гриппа В; вирусов парагриппа типов 1, 2, 3 и 4; коронавирусов OC43, HKU1, NL63 и E2294; респираторно-синцитиального вируса; метапневмовируса; риновируса и аденовируса, а также бактериальных возбудителей ОРЗ: *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*.

### Результаты и их обсуждение

Создана тест-система для комплексной диагностики как вирусных, так и бактериальных возбудителей ОРЗ. Основное практическое назначение разработанной тест-системы: своевременная

## Practical Aspects of Epidemiology and Vaccine Prevention

точная диагностика возбудителей ОРЗ и гриппа и их ключевых клинически значимых биологических свойств (в том числе устойчивости к антибактериальным и противовирусным препаратам) в целях оптимизации терапии ОРЗ и гриппа и санитарно-эпидемиологического режима в медицинских учреждениях.

При разработке тест-системы «ОРЗ» принято обоснованное решение разделить тест-систему «ОРЗ» на три отдельных компонента: основную тест-систему «ОРЗ», осуществляющую детекцию основных вирусных и бактериальных патогенов – возбудителей ОРЗ, и два дополнительных набора реагентов: «Осельтамивир устойчивость», «Осельтамивир/Занамивир устойчивость». Решение было мотивировано следующими факторами:

1. Целесообразность проведения базового тестирования с помощью основной тест-системы «ОРЗ», выполняемого на основе ОТ-ПЦР-анализа (критерии: стоимость, длительность анализа). В случае выявления вируса гриппа А – проведение дополнительного тестирования с использованием двух дополнительных наборов реагентов, которые не являются одним, цельным набором, а разделены на два набора, так как при их использовании задействована различная приборная база: набор реагентов «Осельтамивир устойчивость» основан на методе ПЦР в режиме реального времени, набор реагентов «Осельтамивир/Занамивир устойчивость» – на методе высокопроизводительного секвенирования (NGS).
2. Возможность выбора тестов в зависимости от конкретной ситуации. Выбор тестов определяется сочетанием стоимости, длительности и глубины анализа (выявления наиболее частой мутации сравнительно быстрым и дешёвым методом ПЦР и выявление полного спектра мутаций более длительным и дорогим методом высокопроизводительного секвенирования (NGS)).
3. Соответствие «Методическим рекомендациям по порядку проведения экспертизы качества, эффективности и безопасности медицинских изделий для государственной регистрации» (п. 2.4.3.4) [13].

Основная тест-система «ОРЗ» может использоваться для выявления и дифференциации нуклеиновых кислот возбудителей острых респираторных заболеваний человека (вирусы гриппа А и В, респираторно-синцитиальный вирус, вирусы парагриппа 1–4 типов, риновирус, аденовирус, метапневмовирус, коронавирусы SARS-CoV-2, HCoV-229E, NL63, OC43, 229E; бактерии: *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*) в биологическом материале человека (мазок из носоглотки, ротоглотки, бронхоальвеолярный лаваж,

эндотрахеальный, назофарингеальный аспират, мокрота) методом обратной транскрипции и ПЦР в режиме реального времени.

В связи с пандемией новой коронавирусной инфекции принято решение использовать обе мишени ее возбудителя SARS-CoV-2 – фрагменты генов E и N – в одной пробирке разрабатываемой тест-системы «ОРЗ» без разделения по каналам детекции.

В связи с редким выделением вирусов гриппа изучение устойчивости вирусов гриппа к осельтамивиру и занамивиру с использованием дополнительных наборов реагентов «Осельтамивир устойчивость» и «Осельтамивир/Занамивир устойчивость» в рамках данной работы не проводилось, но планируется в дальнейшем.

Изготовлены макеты тест-системы «ОРЗ» и проведены валидационные испытания изготовленных макетов.

Проведены микробиологические исследования образцов биоматериалов, выделены и охарактеризованы чистые культуры микроорганизмов (см. раздел «Материалы и методы»).

Суммарно из образцов выделено 167 штаммов микроорганизмов, относящихся к семи видам изучаемых условно-патогенных бактерий: *Staphylococcus aureus*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*. Распределение выделенных чистых культур микроорганизмов по локусам и видам представлено в таблице (табл. 2).

Сравнивая распределение чистых культур, выделенных из ротоглоточных (образцы отделяемого ротоглотки) и носоглоточных (образцы отделяемого носоглотки) смывов, можно прийти к следующим выводам: *Staphylococcus aureus* выделялся больше из отделяемого ротоглотки – 76 чистых культур, из отделяемого носоглотки – 58. Из отделяемого ротоглотки и носоглотки чистые культуры *Haemophilus influenzae* выделялись в равном количестве (по  $n = 2$ ), *Streptococcus pneumoniae* выделялись чаще из носоглотки ( $n = 3$ ) чем из ротоглотки ( $n = 1$ ), *Klebsiella pneumoniae* присутствовала практически в равном количестве как в отделяемом ротоглотки ( $n = 6$ ), так и в отделяемом носоглотки ( $n = 5$ ), такая же ситуация складывалась в посевах *Pseudomonas aeruginosa* – соответственно 2 и 1, но это статистически недостоверно из-за малого количества выделенных чистых культур. Чистые культуры *Moraxella catarrhalis* выявлялись только в отделяемом носоглотки ( $n = 8$ ).

Таким образом, можно сделать вывод о том, что из-за неравномерного распределения выделенных чистых культур микроорганизмов в ротоглоточных и носоглоточных смывах, сбор биологического материала двух типов (ротоглоточные и носоглоточные смывы) одновременно у пациентов более информативен, чем только ротоглоточные или только носоглоточные смывы.

**Таблица 2. Распределение выделенных чистых культур по локусам и видам**  
**Table 2. Distribution of isolated pure cultures by loci and species**

Наименование возбудителя Type of the pathogen	Тип отделяемого Type of the discharge		Всего Total
	Отделяемое ротоглотки Oral discharge	Отделяемое носоглотки Nasal discharge	
<i>Staphylococcus aureus</i>	76	58	134
<i>Moraxella catarrhalis</i>	0	8	8
<i>Haemophilus influenzae</i>	2	2	4
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	3	4
<i>Streptococcus pyogenes</i>	3	0	3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	5	11
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	1	3
ИТОГО TOTAL	90	77	167

Распределение выделенных чистых культур микроорганизмов по группам пациентов приведено в таблице (табл. 3). При составлении таблицы в случаях, когда у одного и того же пациента выделены культуры микроорганизмов, относящиеся к одному и тому же виду, в биологическом материале двух типов, считали, что у пациента выделена одна чистая культура микроорганизмов с целью предотвращения дублирования. Таким образом, было выделено 137 уникальных чистых культур микроорганизмов.

Наибольшее количество чистых культур микроорганизмов выделено у детей (71 изолят), что составило 51,8% от общего количества выделенных чистых культур. При этом чаще всего у детей высевался *Staphylococcus aureus* – 74,6% (53/71). Практически только у детей выделялись *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*

и *Streptococcus pneumoniae*. У женщин количество выделенных чистых культур микроорганизмов было меньше и составило 57, относящихся к видам: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa*. У беременных женщин – 10 изолятов и только *Staphylococcus aureus*. У мужчин выделено 9 чистых культур микроорганизмов, среди которых преобладает *Staphylococcus aureus* – 66,6 % (6/9).

В результате молекулярно-генетического анализа образцов биологических материалов пациентов выявлено инфицирование ряда пациентов респираторными вирусами.

В 2019 г. нами проводился анализ этиологической структуры ОРЗ и гриппа у пациентов и сотрудников Центра [10]. Культуральным методом исследовано 316 образцов биологического

**Таблица 3. Распределение выделенных чистых культур по группам пациентов**  
**Table 3. Distribution of isolated pure cultures by groups of patients**

Наименование возбудителя Type of the pathogen	Женщины (n = 130) Women (n = 130)	В том числе беременные (n = 22) Including pregnant women (n = 22)	Небеременные (n = 108) Non-pregnant (n = 108)	Дети (n = 94) Children (n = 94)	Мужчины (n = 22) Men (n = 22)	Всего (n=246) TOTAL (n = 246)
<i>Staphylococcus aureus</i>	46	10	36	53	6	105
<i>Moraxella catarrhalis</i>	1	0	1	7	0	8
<i>Haemophilus influenzae</i>	0	0	0	4	0	4
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	0	1	3	0	4
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0	0	0	3	0	3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	0	6	1	3	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	0	3	0	0	3
Итого Total	57	10	47	71	9	137

**Таблица 4. Сравнительная встречаемость возбудителей ОРЗ вирусной природы (в %)**  
**Table 4. Comparative occurrence of ARI pathogens of viral nature (in %)**

Вирус Virus	2020 г., N=159 2020 y., N=159	2019 г., N=138 2019 y., N=138
Коронавирус OC43 Coronavirus OC43	0,7	-
Коронавирус E229 Coronavirus E229	-	3,6
Риновирус Rhinovirus	20,7	7,9
Метапневмовирус Metapneumovirus	1,3	0,7
Грипп А (H1N1), Грипп А (H3N2) Influenza A (H1N1), Influenza A (H3N2)	-	2,2
Парагрипп 1-го типа Type 1 parainfluenza	-	0,7
Парагрипп 3 типа Type 3-го parainfluenza	-	0,7
РСВ Respiratory syncytial virus	-	1,4
Коинфицирование Coinfection	-	1,4

материала, полученного от 89 пациентов. В ходе исследования выделено 65 штаммов условно-патогенных микроорганизмов (УПМ), относящихся к 7 видам: *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa*.

Методом ПЦР у 12 пациентов выявлен риновирус, вирус гриппа В обнаружен у 5 пациентов, коронавирус E229 также обнаружен у 5 пациентов, вирус гриппа А – у 4 пациентов, реже выявлялись респираторно-синцитиальный вирус, аденовирус и метапневмовирус (по 2 пациента), вирусы парагриппа 1-го и 3-го типа (по 1 пациенту). Вирусы парагриппа 2-го и 4-го типа, а также эпидемически значимые коронавирусы OC43, HKU1, NL63 не выявлены. Сделаны выводы о том, что среди обследованных взрослых пациентов с признаками ОРЗ колонизация слизистых оболочек бактериальными условно-патогенными микроорганизмами (УПМ) встречается реже, чем вирусными. Основными видами УПМ, встречающимися при ОРЗ, были *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*. Среди вирусных патогенов риновирусы были наиболее частой причиной возникновения ОРЗ.

Сравнение данных о встречаемости различных возбудителей ОРЗ вирусной природы в 2020 и 2019 гг. приведено в таблице (табл. 4). Обращает на себя внимание существенно меньшее

разнообразие выявленных возбудителей и значительно более выраженное доминирование риновирусной инфекции в 2020 г., чем в 2019 г. [10]. Первый вывод, возможно, объясняется эффективностью противоэпидемических мер, введенных в связи с пандемией COVID-2019. Снижение уровня заболеваемости «минорными» ОРВИ, по видимому, является причиной отсутствия случаев коинфицирования.

### Заключение

С помощью культуральных методов и экспериментальной тест-панели проведен анализ этиологической структуры ОРЗ и гриппа у пациентов и сотрудников ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России. Обращает на себя внимание существенно меньшее разнообразие выявленных возбудителей в 2020 г., и выявлено значительно более выраженное доминирование риновирусной инфекции, чем в 2019 г.

Разработана новая тест-система для комплексной диагностики как вирусных, так и бактериальных возбудителей ОРЗ, состоящая из трех отдельных компонентов: основной тест-системы «ОРЗ», осуществляющей детекцию основных вирусных и бактериальных патогенов – возбудителей ОРЗ, и двух дополнительных наборов: «Осельтамивир устойчивость», «Осельтамивир/Занамивир устойчивость». Дополнительные наборы предназначены для определения мутации H275Y в гене нейраминидазы, связанной с устойчивостью к осельтамивиру,

в препаратах РНК вируса гриппа A(H1N1)pdm09, полученных из биологического материала человека, а также из культур вируса гриппа A(H1N1)pdm09, методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, а также для подготовки библиотек

фрагментов кДНК генов нейраминидазы и гемагглютинаина вирусов гриппа A(H1N1)pdm09, A(H3N2) и B для генотипирования метода высокопроизводительного секвенирования (NGS) на платформе Illumina (США) в биологическом материале человека и культурах вирусов.

## Литература

- Rudan I, O'Brien K.L., Nair H., et al. Epidemiology and etiology of childhood pneumonia in 2010: estimates of incidence, severe morbidity, mortality, underlying risk factors and causative pathogens for 192 countries. *J Glob Health*. 2013. Vol. 3, N 1. P. 10401.
- Припутневич Т. В., Ачкасова Е. Н., Чубаров В. В., Гордеев А. Б. Острые респираторные заболевания и грипп в современном акушерстве: эпидемиологические особенности и проблемы диагностики: обзор литературы. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. 2019;18(3): 89–95.
- Seto D.S., Heller R.M. Acute respiratory infections // *Pediatr Clin North Am*. 1974. Vol. 21, N 3. P. 683–709.
- Брико Н. И., Салтыкова Т. С., Герасимов А. Н. и др. Клинико-эпидемиологическая характеристика гриппа в 2015–2016 и 2016–2017 гг. // *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2017. Т. 16, № 4. С. 4–13.
- Cheng Z.J., Shan J. 2019 Novel coronavirus: where we are and what we know // *Infection*. 2020. Vol. 48, N2. P. 155–163.
- Sun P., Lu X., Xu C., et al. Understanding of COVID-19 based on current evidence // *J Med Virol*. 2020. Vol. 92, N 6. P. 548–551.
- Припутневич Т. В., Гордеев А. Б., Любасовская Л. А., Шабанова Н. Е. Новый коронавирус SARS-CoV-2 и беременность: обзор литературы. *Акушерство и гинекология*. 2020. № 5. С. 6–12.
- Профилактика инфекционных болезней. Неспецифическая профилактика гриппа и других острых респираторных инфекций. Методические рекомендации (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 10.12.2018).
- Kister G.S. Morphology and mechanisms of prenatal and perinatal viral infections. *EURO Rep Stud*. 1985. Vol. 93. P. 3–16.
- Чубаров В. В., Гончарук О. Д., Гордеев А. Б. и др. Этиологическая структура острых респираторных заболеваний в отдельном родовспомогательном учреждении III уровня // *Акушерство и гинекология. Новости. Мнения. Обучение*. 2020. Т. 8, № 1. С. 16–21.
- Merckx J., Wali R., Schiller I., et al. Diagnostic accuracy of novel and traditional rapid tests for influenza infection compared with reverse transcriptase polymerase chain reaction: A systematic review and meta-analysis // *Ann Intern Med*. 2017. Vol. 167, N6. P. 394–409.
- Michelow I.C., Olsen K., Lozano J., et al. Epidemiology and clinical characteristics of community-acquired pneumonia in hospitalized children // *Pediatrics*. 2004. Vol. 113, N4. P. 701–707.
- Методические рекомендации по порядку проведения экспертизы качества, эффективности и безопасности медицинских изделий для государственной регистрации (2018).

## References

- Rudan I, O'Brien K.L., Nair H., et al. Epidemiology and etiology of childhood pneumonia in 2010: estimates of incidence, severe morbidity, mortality, underlying risk factors and causative pathogens for 192 countries. *J Glob Health*. 2013;3(1):10401.
- Pripitnevich TV, Achkasova EN, Chubarov VV, Gordeev AB. Acute respiratory diseases and influenza in modern obstetrics: epidemiological features and diagnostic problems: literature review. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2019;18(3): 89–97. (In Russ).
- Seto DS, Heller RM. Acute respiratory infections. *Pediatr Clin North Am*. 1974;21(3):683–709.
- Briko NI, Saltykova TS, Gerasimov AN, et al. Clinical and epidemiological characteristics of influenza in 2015–2016 and 2016–2017. *Èpidemiologià i infekcionnye bolezni. Aktual'nye voprosy (Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items)*. 2017;16(4):4–13. (In Russ).
- Cheng ZJ, Shan J. 2019 Novel coronavirus: where we are and what we know. *Infection*. 2020;48(2):155–163.
- Sun P, Lu X, Xu C, et al. Understanding of COVID-19 based on current evidence. *J Med Virol*. 2020;92(6):548–551.
- Pripitnevich TV, Gordeev AB, Lyubasovskaya LA, Shabanova NE. The novel coronavirus SARS-CoV-2 and pregnancy: literature review. *Akusherstvo i Ginekologiya/Obstetrics and Gynecology*. 2020;56–12. (In Russ).
- Профилактика инфекционных болезней. Неспецифическая профилактика гриппа и других острых респираторных инфекций. Методические рекомендации (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 10.12.2018). Moscow, 2018. (In Russ).
- Kister GS. Morphology and mechanisms of prenatal and perinatal viral infections. *EURO Rep Stud*. 1985;93:3–16.
- Chubarov VV, Goncharuk OD, Gordeev AB, et al. Etiologicheskaya struktura ostrykh respiratornykh zabolevaniy v otdel'nom rodovospomogatel'nom uchrezhdenii III urovnya. *Akusherstvo i ginekologiya. Novosti. Mneniya. Obucheniye*. 2020;8(1):16–21. (In Russ).
- Merckx J, Wali R, Schiller I, et al. Diagnostic accuracy of novel and traditional rapid tests for influenza infection compared with reverse transcriptase polymerase chain reaction: A systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med*. 2017;167(6):394–409.
- Michelow IC, Olsen K, Lozano J, et al. Epidemiology and clinical characteristics of community-acquired pneumonia in hospitalized children. *Pediatrics*. 2004;113(4):701–707.
- Методические рекомендации по порядку проведения экспертизы качества, эффективности и безопасности медицинских изделий для государственной регистрации. Moscow, 2018. (In Russ).

## Об авторах

- Татьяна Валерьевна Припутневич** – д. м. н., директор института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова» Минздрава России. +7 (495) 438-25-10, pripu1@gmail.com. ORCID 0000-0002-4126-9730.
- Алексей Борисович Гордеев** – к. б. н., заведующий лабораторией биоинформационного анализа института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова» Минздрава России. +7 (916) 226-86-67, gordeew@vega.protres.ru. ORCID 0000-0002-9171-5276.
- Ольга Дмитриевна Гончарук** – заведующая лабораторией медицинской микробиологии института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова» Минздрава России. +7 (903) 172-43-98, o\_goncharuk@oparina4.ru.
- Валерий Викторович Чубаров** – заведующий отделением эпидемиологического надзора института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова» Минздрава России. +7 (926) 600-98-68, v\_chubarov@oparina4.ru. ORCID 0000-0003-1061-8958.
- Дмитрий Юрьевич Трофимов** – д. б. н., профессор РАН, директор института репродуктивной генетики, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова» Минздрава России. +7 (916) 614-92-26, d\_trofimov@oparina4.ru. ORCID 0000-0002-1569-8486.
- Андрей Александрович Быстрицкий** – к. б. н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических методов института репродуктивной генетики, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова» Минздрава России. +7 (903) 722-10-34, a\_bystritskiy@oparina4.ru. ORCID 0000-0002-0340-3011.
- Андрей Евгеньевич Донников** – к. м. н., заведующий лабораторией молекулярно-генетических методов института репродуктивной генетики, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова» Минздрава России. +7 (903) 684-52-47, a\_donnikov@oparina4.ru. ORCID 0000-0003-3504-2406.

Поступила: 10.11.2021. Принята к печати: 05.04.2022.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

## About the Authors

- Tatiana V. Pripitnevich** – Dr. Sci. (Med.), Director of the institute of microbiology, antimicrobial therapy and epidemiology, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov of Ministry of Healthcare of Russian Federation. +7 (495) 438-25-10, pripu1@gmail.com. ORCID 0000-0002-4126-9730.
- Alexey B. Gordeev** – Cand. Sci. (Biol.), Head of the bioinformatics analysis laboratory of the institute of microbiology, antimicrobial therapy and epidemiology, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov of Ministry of Healthcare of Russian Federation. +7 (916) 226-86-67, gordeew@vega.protres.ru. ORCID 0000-0002-9171-5276.
- Olga D. Goncharuk** – Head of the laboratory of medical microbiology of the institute of microbiology, antimicrobial therapy and epidemiology, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov of Ministry of Healthcare of Russian Federation. +7 (903) 172-43-98, o\_goncharuk@oparina4.ru.
- Valery V. Chubarov** – Head of the clinical epidemiology unit, Department of microbiology, clinical pharmacology and epidemiology, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov of Ministry of Healthcare of Russian Federation. +7 (926) 600-98-68, v\_chubarov@oparina4.ru. ORCID 0000-0003-1061-8958.
- Dmitry Yu. Trofimov** – Dr. Sci. (Biol.), Professor of the Russian Academy of Sciences, Director of the institute of reproductive genetics, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov of Ministry of Healthcare of Russian Federation. +7 (916) 614-92-26, d\_trofimov@oparina4.ru. ORCID 0000-0002-1569-8486.
- Andrey A. Bystritskiy** – Cand. Sci. (Biol.), Leading researcher of the laboratory of molecular genetic methods of the institute of reproductive genetics, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov of Ministry of Healthcare of Russian Federation. +7 (903) 722-10-34, a\_bystritskiy@oparina4.ru. ORCID 0000-0002-1569-8486.
- Andrey E. Donnikov** – Cand. Sci. (Med.), Head of the laboratory of molecular genetic methods of the institute of reproductive genetics, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov of Ministry of Healthcare of Russian Federation. +7 (903) 684-52-47, a\_donnikov@oparina4.ru. ORCID 0000-0003-3504-2406.

Received: 10.11.2021. Accepted: 05.04.2022.

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.