

## Особенности лабораторных подходов в комплексной диагностике бруцеллёза у людей

Ю.К. Кулаков<sup>1</sup>, А.А. Далгатова<sup>2</sup>, О.А. Бургасова<sup>1,3</sup>, В.В. Бакалин<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> Чародинская центральная районная больница, с. Цуриб, Республика Дагестан, Российская Федерация

<sup>3</sup> Российский университет дружбы народов, Москва, Российская Федерация

### АННОТАЦИЯ

Бруцеллёз — инфекционное особо-опасное зоонозное заболевание, вызываемое бактериями рода *Brucella*, среди которых патогенный потенциал имеют *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, обуславливая тяжёлое и часто хроническое течение болезни.

Лабораторная диагностика имеет решающее значение для выявления случаев заболевания человека, поскольку клинические симптомы бруцеллёза человека изменчивы и неспецифичны. Лабораторный диагноз бруцеллёза основана на трёх различных подходах: прямой бактериологический метод, непрямой метод с помощью серологических и аллергических тестов и прямой экспресс-метод в разных форматах молекулярной полимеразной цепной реакции.

Несмотря на накопленный опыт использования серологических тестов и высокочувствительного метода полимеразной цепной реакции, выделение культуры бруцелл считается золотым стандартом в лабораторной диагностике бруцеллёза благодаря его клинико-эпидемиологической актуальности. Доступные в настоящее время автоматизированные системы бактериологического метода повысили его чувствительность и сократили время обнаружения видов бруцелл.

Основными ограничениями серологических тестов являются отсутствие общих критериев интерпретации, невысокая специфичность из-за перекрёстных реакций с другими бактериями и низкая чувствительность на ранней стадии заболевания. При этом в России серологические тесты составляют более 99% всех лабораторных исследований и остаются основным диагностическим инструментом, что связано с их недорогим и удобным использованием по месту оказания медицинской помощи в эндемичных районах и высокой отрицательной прогностической ценностью.

Метод полимеразной цепной реакции в разных форматах экспресс-тестов диагностирует ДНК возбудителя за несколько часов при высокой чувствительности и специфичности, тем не менее положительный результат требует внимательной интерпретации и не всегда указывает на активную инфекцию.

Для удобства использования в практической медицине диагностических подходов к бруцеллёзу и определения активности инфекционного процесса требуется усовершенствование диагностики и разработка экспресс-методов.

В обзоре представлены как наиболее рутинные, так и современные лабораторные методы, доступные в настоящее время для диагностики бруцеллёза.

Ключевые слова: бруцеллёз; лабораторная диагностика; бактериологический метод; MALDI-TOF; серологический тест; аллергический тест; ПЦР.

#### Как цитировать

Кулаков Ю.К., Далгатова А.А., Бургасова О.А., Бакалин В.В. Особенности лабораторных подходов в комплексной диагностике бруцеллёза у людей // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2021. Т. 26, № 4. С. 00–00. DOI: <https://doi.org/10.17816/EID108212>

Рукопись получена: 25.05.2022 Рукопись одобрена: 00.00.2022 Опубликована: 30.06.2022

## Particular qualities of laboratory approaches in complex diagnosis of human brucellosis

Yuri K. Kulakov<sup>1</sup>, Asiyat A. Dalgatova<sup>2</sup>, Olga A. Burgasova<sup>1,3</sup>, Valeria V. Bakalin<sup>3</sup>

<sup>1</sup> N.F. Gamaleya Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Charodinskaya Central District Hospital, Tsurib village, Republic of Dagestan, Russian Federation

<sup>3</sup> Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

### ABSTRACT

Brucellosis is an infectious particularly dangerous zoonotic disease caused by bacteria of the genus *Brucella*, among which *B. melitensis*, *B. abortus*, and *B. suis* have pathogenic potential, causing a severe and often chronic course of the disease.

Laboratory diagnostics is crucial for the detection of human cases, since the clinical symptoms of human brucellosis are variable and nonspecific. Laboratory diagnosis of brucellosis is based on three different approaches: direct bacteriological method, indirect method using serological and allergic tests and direct express method in different formats of molecular polymerase chain reaction.

Despite the accumulated experience of using serological tests and the highly sensitive polymerase chain reaction method, the isolation of *Brucella* culture is considered the gold standard in the laboratory diagnosis of brucellosis due to its clinical and epidemiological relevance. The currently available automated systems of the bacteriological method have increased its sensitivity and shortened the detection time of *Brucella* species.

The main limitations of serological tests are the lack of general interpretation criteria, low specificity due to cross-reactions with other bacteria and low sensitivity at an early stage of the disease. At the same time, in Russia, serological tests account for more than 99% of all laboratory tests and remain the main diagnostic tool. This is due to their inexpensive and convenient use at the place of medical care in endemic areas and high negative prognostic value.

Polymerase chain reaction in various formats of rapid tests diagnoses the DNA of the pathogen in a few hours with high sensitivity and specificity. Nevertheless, a positive polymerase chain reaction result requires careful interpretation and does not necessarily indicate an active infection.

For the convenience of using diagnostic approaches to brucellosis in practical medicine and determining the activity of the infectious process, it is necessary to improve diagnostics and develop express methods.

The review shows both the most routine and modern laboratory methods currently available for laboratory diagnosis of brucellosis.

**Keywords:** brucellosis; laboratory diagnostics; bacteriological method; MALDI-TOF; serological test; allergy test; PCR.

#### To cite this article

Kulakov YuK, Dalgatova AA, Burgasova OA, Bakalin VV. Particular qualities of laboratory approaches in complex diagnosis of human brucellosis. *Epidemiology and infectious diseases*. 2021;26(4):000–000. DOI: <https://doi.org/10.17816/EID108212>

Received: 25.05.2022

Accepted: 20.06.2022

Published: 30.06.2022

## ВВЕДЕНИЕ

Бруцеллёз — особо опасное зоонозное заболевание сельскохозяйственных и диких животных, от которых инфекция передаётся человеку. Заболевание имеет склонность к хроническому течению с развитием осложнений и инвалидизацией. [1, 2].

*Brucella spp.* — грамотрицательные медленно растущие факультативные внутриклеточные бактерии, вызывающие бруцеллёз. Патогенность видов *Brucella* определяется их способностью выживать и размножаться в иммунных клетках хозяина с развитием острой или хронической инфекции [2, 3].

В России основными патогенными видами для людей являются *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis* и *Babesia canis*. *B. melitensis* (мелкий рогатый скот) вызывает у людей наиболее тяжёлые формы эпидемической заболеваемости, часто с хроническим течением, *B. abortus* (крупный рогатый скот) и *B. suis* (свиньи, олени) ассоциированы со спорадической заболеваемостью, *B. canis* (собаки) имеет доказанную патогенность для человека [2, 3]. За последние 20 лет средний показатель заболеваемости населения Российской Федерации впервые выявленным бруцеллёзом составил 0,27% на 100 тыс. (~350 человек в год) [1, 2], при этом ежегодная заболеваемость людей в мире достигает ~500 тыс. [4]. Бруцеллёз продолжает оставаться серьёзной проблемой практического здравоохранения в эндемических регионах Северо-Кавказского, Южного и Сибирского федеральных округов России, для населения которых характерным видом деятельности является разведение и содержание крупного и мелкого рогатого скота [1, 2, 5].

Особенностями клинического течения острого бруцеллёза в настоящее время, затрудняющими постановку диагноза [1, 2, 6], являются снижение тяжести течения и преобладание хронических форм инфекции [2, 6], порой в латентной форме. Современная диагностика бруцеллёза у людей сталкивается с полиморфизмом его клинических проявлений, многообразием механизмов, включённых в патологический процесс, и склонностью заболевания к хроническому течению, связанному с внутриклеточной персистенцией возбудителя [2, 3, 6, 7]. Для заболевания характерны рецидивы и риск развития серьёзных осложнений при локализации возбудителя в жизненно важных органах. В этой ситуации быстро и правильно поставленный диагноз, своевременное и в полном объёме проведённое лечение значительно сокращают частоту хронизации бруцеллёзной инфекции и играют решающую роль в благоприятном исходе заболевания [2, 6, 7].

В обзоре рассматриваются особенности современных бактериологических, серологических, аллергических и молекулярных методов диагностики бруцеллёза у

людей, при этом именно лабораторные методы остаются главным звеном в неразрывном единстве с эпидемиологическим анамнезом и клинической симптоматикой.

## ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ: КОМПЛЕКСНАЯ ДИАГНОСТИКА БРУЦЕЛЛЁЗА

### Прямой бактериологический метод

Бактериологический метод у людей предусматривает сбор клинического материала с посевом на питательные среды, выделением чистой культуры, её видовой и штаммовой идентификацией, которую проводят только в специализированных лабораториях при соблюдении противоэпидемического режима работы с возбудителями II группы патогенности [8]. Объектом обследования при бруцеллёзе в зависимости от клинической формы являются кровь, костный мозг, спинномозговая жидкость, пунктат из лимфатических узлов, суставов и в редких случаях абсцессов [8]. Культуры бруцелл выделяют в остром периоде заболевания, в единичных случаях — при хронической стадии болезни [2].

Чувствительность бактериологического метода составляет около 50–70% в случае острого бруцеллёза, вызванного *B. melitensis*; в случае заболевания, вызванного *B. abortus*, чувствительность метода составляет 5–15%, что связано с кратковременностью бактериемии. [2, 8]. Более чувствительным способом бактериологического анализа является посев костного мозга и получение миелокультуры, при котором эффективность достигает 92% [2, 9]. Этот способ рекомендуют использовать у пациентов с лихорадками неясного генеза, при острой и хронической формах бруцеллёза [9].

Выделение *Brucella spp.* — длительный и трудоёмкий метод, связанный с характером патогенеза, когда бактериемия наблюдается в фазе гематогенного заноса или первичной генерализации с выраженными клиническими проявлениями. На фоне бактериемии происходит диссеминация бруцелл в различные органы с формированием метастатических очагов [2, 6–8].

Главным недостатком бактериологического метода является его продолжительность, связанная с медленным (более недели) ростом колоний бруцелл на питательных средах [2, 6–8]. При этом способ лизис-концентрации посредством добавления к исследуемой крови дистиллированной воды для лизиса форменных элементов с последующим центрифугированием и высевом осадка показал более высокую чувствительность по сравнению с традиционным методом Кастанеда и сократил время выделения возбудителя до 2–6 сут.

В последние десятилетия благодаря использованию автоматизированных приборов технологии посева крови быстро развивались, постепенно вытесняя малочувствительный рутинный и стандартный способы. Современный диагностический подход основан на определении метаболических активностей микроорганизмов путём выявления возрастающей концентрации углекислого газа (CO<sub>2</sub>) или снижения содержания кислорода во флаконах над жидкостью с гемокультурой.

Величина бактериемии при бруцеллёзе составляет в среднем от 1 до 5 КОЕ (колониеобразующих единиц) на 1 миллилитр крови. Большие образцы крови увеличивают чувствительность метода, поэтому рекомендуется получать от 20 до 30 мл крови у взрослых, от 2 до 4 мл у детей младше 3 лет и 10 мл у детей старшего возраста [10].

Представители рода *Brucella* также имеют относительно длительное время удвоения (от 2,5 до 3,5 ч) по сравнению с другими патогенами человека, и их выброс CO<sub>2</sub>

также ограничен в связи с тем, что они метаболизируют углеводы исключительно по пентозофосфатному пути [10]. Обнаружено, что *B. melitensis* вырабатывает CO<sub>2</sub> медленнее, чем другие бактерии, и достигает более низких пиковых концентраций, что объясняет длительное время их обнаружения многими автоматизированными системами посева крови.

Опыт выделения *Brucella spp.* с поколениями автоматизированных систем гемокультур накапливается медленными темпами. Бруцеллёз эндемичен во многих странах, однако высокая цена автоматизированных приборов делает передовые лабораторные технологии недоступными для развивающихся регионов. В промышленно развитых странах, где автоматизированные инструменты для посева крови доступны уже более трёх десятилетий, зоонозный бруцеллёз находится под контролем, и регистрируются редкие случаи заболевания человека. Так, автоматизированные системы непрерывного мониторинга гемокультуры для изоляции бруцелл используются в Израиле, Турции и Саудовской Аравии [11–14] — эндемичных странах, где медицинские учреждения расположены в непосредственной близости с животноводческими территориями и проживающим на них контингентом риска по бруцеллёзу.

Современные автоматизированные системы выявляют острый бруцеллёз как у детей, так и у взрослых в течение недельного инкубационного периода и позволяют избежать необходимости субкультивирования флаконов при условии, что образцы крови получены в начальных фазах инфекции [12]. В случаях с более длительной или очаговой инфекцией некоторым пациентам по-прежнему могут потребоваться длительная инкубация культуральных флаконов и выполнение культуральных пересевов для максимальной эффективности выделения возбудителя. Использование автоматизированных систем позволяет обрабатывать большое количество флаконов с культурами крови, практически исключает загрязнение среды и обеспечивает безопасное обращение с особо опасными бактериями [10–14].

Повышенная чувствительность и сокращение времени обнаружения бруцелл в крови с использованием автоматизированных систем культивирования поставили под сомнение актуальность традиционных рекомендаций по длительной инкубации и периодическому субкультивированию для оптимизации обнаружения медленно растущих бруцелл.

После выделения бруцелл используют традиционные методы фенотипической видовой идентификации их видов, включающие анализ потребности в CO<sub>2</sub>, выработки сероводорода (H<sub>2</sub>S), устойчивости к фуксину и тионину, способности агглютинироваться монорецепторными сыворотками, чувствительности к фагу T6 [2, 8]. Эти методы имеют существенные недостатки, такие как длительность, трудоёмкость и сравнительная близость фенотипа штаммов бруцелл, и потому не пользуются популярностью в лабораторной практике [2, 15].

В настоящее время изоляты бруцелл изучают в референс-лабораториях на молекулярно-генетическом уровне (до видов и штаммов), позволяющем не только подтвердить их циркуляцию на отдельной территории, но и произвести геномную паспортизацию для использования в системе мониторинга за возбудителем бруцеллёза. Это приобретает важное значение в эпидемиологических расследованиях вспышек бруцеллёза и программах ветеринарного контроля на условно благополучных территориях [1, 2, 7, 8, 15].

Среди молекулярно-генетических методов, используемых для идентификации бруцелл, широкое применение получила полимеразная цепная реакция (ПЦР) для дифференциации бруцелл до вида, а в некоторых случаях — до биовара [2, 6–8, 15–17]. Наиболее эффективными подходами считаются методы мультилокусного типирования последовательностей (multi locus sequence typing, MLST) и однонуклеотидного полиморфизма (single nucleotide polymorphism, SNP) [2, 8, 18, 19]. Анализ тандемных

повторов с переменным числом множественных локусов (multiple locus variable number tandem repeats analysis, MLVA) представлен схемами, содержащими 12–16 локусов с консервативными и варьируемыми размерами повторов [2, 20–22]. Информативным методом молекулярно-генетического типирования изолятов бруцелл является выявление полиморфизма INDEL-генов, представляющих собой вставки-делеции (insertions/deletions) нескольких нуклеотидов [23].

Внедрение MALDI-TOF (матрично-ассоциированной с лазерной десорбцией/ионизацией времяпролётной) масс-спектрометрии в клиническую лабораторную диагностику коренным образом изменила способ идентификации микроорганизмов. MALDI-TOF является общепризнанным методом быстрой и достоверной идентификации микроорганизмов до уровня вида или подвида, заменившей утомительные фенотипические идентификации [24]. Метод применяют непосредственно к бактериальным колониям, растущим на плотных средах, а также в бульоне для гемокультур с целью избежать риска работы с живыми бруцеллами (на начальном этапе их инактивацию проводят абсолютным этанолом, который добавляют перед экстракцией белков муравьиной кислотой и ацетонитрилом) [25–27].

Первые работы по оценке эффективности технологии MALDI-TOF в идентификации бруцелл были малоубедительными. Метод позволял идентифицировать изоляты штаммов *Brucella* до видового уровня и даже проводить дифференциацию между биоварами *B. suis* [25–27]. Однако в других исследованиях сообщалось, что MALDI-TOF, основанная на технологии Vitek MS (bioMérieux, Франция) с использованием доступных баз данных, ошибочно идентифицировала *B. melitensis* как *Ochrobactrum anthropic* [28]. В недавней успешной работе эталонная база данных Vitek MS была построена на основе 590 протеомных спектров из 84 различных штаммов бруцелл, принадлежащих ко всем видам рода *Brucella*, включая редкие и атипичные бактериальные изоляты [29]. Модифицированная база данных позволила проводить дифференциацию бруцелл от представителей рода *Ochrobactrum*, а также идентификацию на видовом уровне трёх основных зоонозных видов: *B. melitensis*, *B. abortus* и *B. suis* [29].

Метод MALDI-TOF позволяет проводить идентификацию культур бруцелл высокой — от 90 до 99,9% — специфичности [27]. Повышение эффективности метода MALDI-TOF для идентификации *Brucella spp.* достигают благодаря выявлению основных эволюционно консервативных рибосомных белков малой массы (2–20 кДа), позволяющих дифференцировать бруцелл на межвидовом/внутривидовом уровнях [29].

Использование MALDI-TOF для выявления возбудителя бруцеллёза в клиническом материале включает этап выделения культуры, однако продолжительность и сложность работ по изоляции бруцелл из исследуемого материала затрудняют применение этой технологии на практике [24]. Прямую идентификацию бруцелл в клинических образцах методом MALDI-TOF затрудняет вариабельность состава белков хозяйских клеток. Группа российских учёных [30], усовершенствовав метод пробоподготовки и биоинформационные алгоритмы, в модельных опытах с гемокультурами бруцелл без выделения чистой культуры или дополнительного культивирования возбудителя доказала возможности технологии MALDI-TOF в индикации видов *Brucella*.

Таким образом, полученные данные о возможностях MALDI-TOF-технологии в идентификации бруцелл уже выглядят многообещающими, тем не менее нуждаются в дальнейшем изучении, стандартизации и умении интерпретировать полученные результаты. MALDI-TOF масс-спектрометрия в расчёте на идентификацию одного образца имеет низкую стоимость, однако в связи с дороговизной оборудования метод недоступен в большинстве стран и регионов, эндемичных по бруцеллёзу.

## Непрямой метод с помощью серологических тестов

Серологическая диагностика бруцеллёза не даёт прямых доказательств наличия бруцелл в организме хозяина и опирается на непрямую стратегию зондирования иммунной системы пациента в поисках антител, свидетельствующих о предшествующем контакте с патогеном. Учитывая тот факт, что гуморальный иммунный ответ у людей индивидуально варьирует, когда имеют значение история прошлых заболеваний и контактов с инфекцией, распознавание чужеродных антигенов, их иммунологический процессинг и другие факторы, вместо объективного, прямого и неопровержимого диагностического доказательства результаты серологических тестов на бруцеллёз требуют интерпретации, что часто бывает сделать затруднительно [2, 5–7, 31].

Серологическая диагностика бруцеллёза базируется в основном на согласованных критериях, таких как заданный титр в реакции агглютинации и отсечение значений (cutoff) в иммуноферментном анализе (ИФА). Достоверность этих критериев часто подвергается сомнению, а пороговые значения варьируют в зависимости от клинических и эпидемиологических соображений, таких как продолжительность болезни, бруцеллёз в анамнезе и профессиональные факторы риска, связанные с животноводством в эндемичных регионах [2, 5–7, 31].

Бессимптомное течение болезни и случаи самоизлечения от бруцеллёза — не редкость в эндемичных регионах [32], где иммуноглобулины G (IgG) у людей могут сохраняться в течение многих лет после завершения курсов антибиотикотерапии. Это объясняет высокую серопревалентность антибруцеллёзных антител, которая обнаруживается в эндемичных районах среди лиц, неоднократно подвергавшихся инфицированию.

Серологические тесты не могут различать виды возбудителя бруцеллёза, поэтому невозможно идентифицировать, какой патогенности для человека вид возбудителя индуцирует антительный ответ хозяина. Только выделение *Brucella spp.* или специфическое обнаружение видовой ДНК с помощью ПЦР позволяет идентифицировать вид возбудителя [2, 5–7, 31]. Серологические тесты не являются высокочувствительными и специфичными, проявляя ложноположительные результаты с другими возбудителями инфекций, особенно с *Yersinia enterocolitica* (серотипы O:3 и O:9) [2, 5–7]. Не следует забывать, что у некоторых больных бруцеллёзом сыворотки крови не способны к агглютинации, что не исключает бруцеллёзную инфекцию [2].

В настоящее время в России наиболее распространёнными серологическими тестами являются реакции агглютинации пластинчатая Хеддльсона и пробирочная Райта, реакция Кумбса, реакция непрямой гемагглютинации (РНГА), ИФА [2].

Реакция агглютинации Райта в пробирках положительна с первых дней лихорадочного острого бруцеллёза, поэтому остаётся одним из основных серологических тестов при бруцеллёзе людей [2]. Высокие титры реакции ( $>1:100$ ) отмечаются обычно через 2 нед от начала заболевания — в острой фазе инфекции, а в фазе очаговых поражений и при резидуальном бруцеллёзе титры, как правило, снижаются в 2–3 раза и могут сохраняться десятилетиями [2, 6]. В хронической стадии положительный результат реакции в титре  $\geq 1:100$  подтверждает диагноз бруцеллёза и косвенно свидетельствует об активности процесса. Реакция агглютинации Райта недостаточно чувствительна при эпидемиологическом обследовании групп риска по бруцеллёзу и не позволяет выявлять всех инфицированных в очаге инфекции [2, 5, 6, 8].

Пластинчатая реакция агглютинации Хеддльсона является методом ускоренной серологической диагностики бруцеллёза, проводится на стекле с использованием неразведённой сыворотки крови больного и инактивированного бруцеллёзного антигена. Преимущества этой реакции заключаются в простоте, скорости и доступности использования не только в лабораториях, но и в полевых условиях экспедиции, а также в

качестве скрининговых тестов при массовых эпидемиологических исследованиях [2, 5, 6, 8]. Реакция Хеддльсона не позволяет определять титры, а только качественное наличие положительной агглютинации у больных бруцеллёзом с последующим подтверждением реакциями Райта, Кумбса и ИФА [2, 8].

Выявление неполных антител с помощью реакции Кумбса имеет большое диагностическое значение при бруцеллёзе. Эти антитела появляются рано и остаются в сыворотке значительно дольше, чем агглютинирующие антитела [3].

Реакция Кумбса особенно показана при хронических формах бруцеллёза с целью комплексной диагностики бруцеллёза у людей, раскрытия контактов с антигеном и изучения иммунологической структуры населения в очагах бруцеллёза [2].

Для серологической диагностики бруцеллёза используют РНГА [2], при которой гемагглютинины выявляются в сыворотке крови больных, когда остальные серологические реакции показывают сомнительный или отрицательный результат. Значительная чувствительность метода РНГА в сравнении с реакцией Райта при хроническом и субклиническом течении бруцеллёза обоснована многими работами отечественных и зарубежных авторов [2]. РНГА позволяет выявлять антитела более чем в 50% случаев в очагах бруцеллёза при отрицательных или сомнительных результатах реакции Райта.

ИФА среди представленных серологических тестов является наиболее чувствительным и специфичным методом [2, 5–8]. Присутствие IgM и IgG антител в ИФА почти на 90% совпадает с разными титрами в реакции Райта [2, 5], при этом IgM характерны для острого бруцеллёза, тогда как IgG преобладают при подостром и хроническом бруцеллёзе [2, 5, 33, 34].

Применение технологии автоматизированного количественного агглютинационного теста было предложено в работе М.В. Коноплевой [35] для агглютинационных тест-систем, включая РНГА, с целью определения антигенов возбудителя бруцеллёза для иммунодетекции в биологических материалах. Технология позволяет создавать простые, быстрые, удобные в постановке диагностические тест-системы с новым потенциалом для количественного и объективного учёта результатов реакции.

Таким образом, серологические тесты продолжают сохранять массовость и актуальность для диагностики всех форм бруцеллёза, их чувствительность варьирует в широком диапазоне — от 65 до 95%, при невысокой специфичности, особенно в эндемичных регионах [2, 5–8]. Положительный серологический тест обязательно следует рассматривать в связи с клинической симптоматикой и эпидемиологическим анамнезом.

## Аллергические тесты

Аллергические реакции организма человека в патогенезе бруцеллёза оказывают влияние на клинические проявления заболевания [2, 7]. Повышенная чувствительность замедленного типа играет основную роль в развитии симптомов при бруцеллёзе. Кожно-аллергическая проба с Бруцеллином (проба Бюрне) имеет более чем 70-летнюю историю практического применения и до настоящего времени используется в лабораторной диагностике бруцеллёза, а также для оценки поствакцинального иммунитета перед ревакцинацией [2, 6, 8]. Реакция Бюрне у людей существенно связана с индивидуальной чувствительностью, переходящей в болезненные симптомы, и подвержена значительным вариациям [2, 6, 8]. Величина показателя реакция Бюрне не всегда проявляет закономерность со степенью сенсибилизации организма и тяжестью клинических проявлений, поэтому пробу Бюрне рекомендуют применять для диагностики в исключительных случаях [2, 6, 8].

Замене реакции Бюрне способствовал поиск *in vitro* тестов аллергической

чувствительности организма (радиоаллергосорбентный метод; определение концентрации освобождённого гистамина — метод Шелли; реакция лейкоцитоллиза), которые обладали существенными недостатками в связи с их трудоёмкостью, низкой специфичностью и чувствительностью [2, 36].

С использованием метода проточной цитометрии A.L. De Weck и соавт. [36] впервые предложили определять дегрануляцию базофилов под влиянием аллергена при наличии сенсибилизации макроорганизма. Вследствие каскада ферментных реакций происходит дегрануляция эффекторных базофилов с экспрессией маркера клеточной перестройки CD63 (gp53). Повышенная чувствительность организма к антигенам бруцелл на основе использования цитометрического метода *in vitro* была успешно реализована в лабораторной аллергодиагностике бруцеллёза [37]. Метод проточной цитометрии при постановке аллергического теста исключает негативное воздействие антигена на организм и позволяет регистрировать реакцию в течение 1 ч, при этом позволяет оценить специфическую иммунореактивность лиц перед повторной иммунизацией против бруцеллёза и определить показания к вакцинации.

Аллергический тест показал преимущества в дифференциации вакцинного и инфекционного процессов при бруцеллёзе за счёт количественного учёта степени сенсибилизации к бруцеллёзному антигену [38, 39] и, таким образом, имеет перспективы к широкомасштабному внедрению в практику.

## Прямой экспресс-метод в разных форматах полимеразной цепной реакции

Поиск новых безопасных быстрых и эффективных тестов для диагностики бруцеллёза у людей, как и при других бактериальных инфекциях, связан с областью молекулярной генетики. Бруцеллы демонстрируют высокую степень ДНК-гомологии, среди которой показаны вставки, делеции и рекомбинации, характерные для видов и штаммов *Brucella* [2, 16, 17, 40]. Установление генетической связи между разными видами *Brucella* важно для понимания их эволюции, взаимоотношений с хозяином, патогенности, и в практическом аспекте для разработки методов их видового и штаммового типирования [2, 16, 17, 40].

Методы секвенирования в настоящее время становятся менее дорогими и более доступными и открывают новые подходы, основанные на полногеномных MLST, SNP, MLVA, INDEL [1, 2, 7, 18–23], позволяющих проводить филогеографическую реконструкцию популяций бруцелл и определять с большей точностью происхождение и глобальное распространение различных видов и штаммов, а также положение новых видов бруцелл.

Сыворотка крови традиционно считается наиболее приемлемым и удобным клиническим образцом для диагностики инфекционных заболеваний на основе ПЦР. В случае диагностики бруцеллёза у людей к сыворотке изначально относились с большой осторожностью, но было показано, что диагностический выход положительных ПЦР-анализов при использовании сывороток крови пациентов лучше, чем из образцов цельной крови [41]. В процессе постоянного совершенствования методов выделения ДНК и технологий, используемых для процесса амплификации, подтверждено, что сыворотка является предпочтительным образцом для молекулярной диагностики бруцеллёза человека [42].

В настоящее время любые клинические лаборатории могут проводить соответствующие серодиагностические тесты, когда имеется подозрение на заболевание, и хранить аликвоту образца для завершения исследования методом ПЦР посредством отправки образца в референс-лабораторию.

В ПЦР для обнаружения ДНК бруцелл используются различные мишени и праймеры. В многочисленных работах по молекулярной диагностике бруцеллёза общее

количество геномных мишеней остаётся относительно небольшим [2, 7]. Первоначально в ПЦР использовали мишени генов, кодирующих белки наружной мембраны *Omp2* и *Omp31* [42, 43], а интерес к ним снизился, когда были обнаружены делеции гена *omp31* у некоторых штаммов *B. abortus*. Совсем недавно диагностическая эффективность гена *omp28*, также называемого *bp26*, значительно возросла по сравнению с генами *omp2* и *bcs31*, не показывая каких-либо преимуществ по чувствительности [44].

Использование 16S рРНК в качестве мишени для амплификации очень распространено в молекулярной диагностике многих бактериальных инфекций. Наличие нескольких копий гена в геноме бруцелл, родо- и видоспецифичные, переменные области делают его использование особенно привлекательным [45]. Однако перекрёстные реакции с другими альфапротеобактериями и более высокая чувствительность к другим, более специфичным мишеням ограничивают применение этой мишени в диагностике бруцеллёза [46].

Амплификация в ПЦР инсерционного элемента IS711, который присутствует с переменным числом копий у видов бруцелл [47], очень часто используется в молекулярной диагностике заболевания. При сравнении диагностических характеристик различных геномных мишеней в ПЦР было показано, что мишень IS711 проявляет большую чувствительность [48], однако изменение числа копий в инсерционном элементе IS711 между видами бруцелл и даже их отсутствие у некоторых штаммов поставило под вопрос использование этой мишени.

В настоящее время наиболее часто во всех форматах ПЦР при клинической картине бруцеллёзной инфекции используется родовая мишень гена *bcs31* [49]. Кроме того, конкретные мишени в ПЦР для вакцинных штаммов *B. melitensis* Rev-1, *B. abortus* 19 и *B. abortus* RB51 были предложены с информацией по диагностическим характеристикам этих мишеней [50].

От 25 до 35% больных бруцеллёзом (особенно при инфекции *B. melitensis*) имеют очаговое осложнение в течение болезни [51, 52]. Очаговые осложнения бруцеллёза могут поражать любые органы, в том числе костно-суставной, мочеполовой, сердечно-сосудистой и центральной нервной системы. У пациентов с локализованными формами заболевания частота выявляемых бактериемий значительно ниже, чем у больных острым неосложнённым бруцеллёзом. По этой причине часто приходится прибегать к клиническим образцам, отличным от сыворотки крови, для постановки правильного диагноза. Выход культур из образцов, отличных от крови, имеет тенденцию к снижению (обычно в диапазоне от 10 до 20%), особенно в разбавленных жидкостях, таких как моча или спинномозговая жидкость [53–55]. В этих ситуациях ПЦР становится привлекательной альтернативой для диагностики бруцеллёза у пациентов с очаговыми осложнениями. Учитывая неоднородность соответствующих клинических образцов (спинномозговая или синовиальная жидкость, моча, и т.д.), протоколы выделения ДНК должны быть адаптированы и подтверждены для различных образцов.

Использование технологии ПЦР в реальном времени для амплификации и обнаружения ДНК имеет высокую эффективность теста в сравнении с обычной ПЦР или ПЦР-ИФА, поскольку после экстракции этапы амплификации и детекции могут быть завершены в течение 2 ч, что является важным преимуществом для клинических лабораторий и позволяет проводить одновременный анализ десятков образцов [2, 8, 56–60]. С постепенным упрощением технологии ПЦР в реальном времени и прогрессивным снижением стоимости реагентов и приборов для термоциклирования этот мощный инструмент в настоящее время становится более доступным в большинстве клинических лабораторий [2, 7, 56–60].

Широкий спектр клинических симптомов и неспецифическая картина бруцеллёза человека означают, что заболевание следует учитывать при дифференциальной диагностике многих клинических проявлений, таких как внебольничный фебрильный

синдром без явных признаков очаговости, лимфоцитарный менингит, гранулематозный гепатит, эпидидимоорхит, септический артрит и остеомиелит позвоночника. Использование моно-ПЦР для выявления различных этиологических агентов, которые могут быть вовлечены в конкретный синдром, является медленным и дорогостоящим процессом [7].

Мультиплексная ПЦР в реальном времени — метод молекулярной диагностики, который находит всё более широкое применение при различных инфекционных заболеваниях [2, 7], позволяя одновременно амплифицировать многие видоспецифические последовательности в одной реакции. Это направление имеет большое медицинское значение, особенно при таких инфекциях, как менингит или остеомиелит позвоночника, при которых задержка диагностики может привести к неблагоприятному прогнозу. Полезность мультиплексной ПЦР в реальном времени была оценена для быстрой дифференциации бруцеллёза от внелёгочных осложнений туберкулёза и идентификации бруцелл на видовом уровне [55].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Продолжающиеся более столетия исследования в диагностике бруцеллёза демонстрируют отсутствие универсального теста, который должен быть высокочувствительным, 100% специфичным, быстрым, уметь отличать больных людей от положительно реагирующих, идентифицировать вид возбудителя, включая *B. canis*, который не содержит иммунодоминантного O-антигена бруцелл. Кроме того, этот тест должен различать латентные, ранние, длительные случаи инфекции, а также системные и локализованные заболевания бруцеллёзом. На сегодняшний день нет теста или даже комбинации тестов, которые отвечают этим взаимосвязанным целям.

Выделение бруцелл из обычно стерильных жидкостей и тканей человека является окончательным доказательством инфекции и имеет диагностическую специфичность 100%, при этом чувствительность выделения культур снижается по мере прогрессирования инфекции и заметно снижается у больных с затяжным течением или очаговыми осложнениями.

В последние десятилетия используются автоматизированные системы для выделения гемокультур, в которых размножение бактерий обнаруживается путём мониторинга производства CO<sub>2</sub>, что увеличило чувствительность метода и сократило время обнаружения бруцелл, требовательных к питательным средам. В настоящее время более 95% всех культур крови, полученных от пациентов с острым течением, обнаруживает возбудитель бруцеллёза в течение недели инкубации без необходимости субкультивирования. У пациентов с длительным течением инфекции и/или очаговых осложнений требуются длительная инкубация и проведение слепых субкультур.

Внедрение технологии MALDI-TOF и ПЦР-тестов на специфические ДНК-мишени позволяет быстро, правильно и безопасно идентифицировать виды выделенных изолятов бруцелл. Чувствительность и специфичность любого теста для выявления больных бруцеллёзом зависит не только от свойств лабораторного метода, но и от популяционной характеристики изучаемого населения, а в случае бруцеллёза — это местные эпидемиологические условия. Использование здоровых людей в качестве отрицательного контроля может привести к завышению специфичности теста, и наоборот, включение пациентов, изначально подозреваемых в инфицировании *Brucella*, может существенно снизить специфичность анализа.

Диагностическую эффективность любого теста следует оценивать, сравнивая его результаты с данными, полученными другими методами, включая золотой стандарт выделения культуры. Однако оценка серологических тестов на бруцеллёз затруднена тем фактом, что не существует универсального эталонного теста для определения

заболевания, который позволяет сравнивать с другими лабораторными тестами. Серологические тесты на бруцеллёз часто оценивают путём сравнения результатов, полученных с помощью других серологических тестов, используемых отдельно или в комбинации. Эффективность различных серологических тестов измерялась в разнородных популяциях с использованием широкого диапазона пороговых значений, что часто приводило к противоречивым результатам. В этих обстоятельствах нельзя прийти к окончательному мнению о выполнении отдельных серологических анализов.

В целом, несмотря на многочисленные недостатки, серологические тесты остаются массовым и незаменимым инструментом диагностики бруцеллёза человека в эндемичных странах. Серологические методы сохранили свою клиническую значимость и популярность для диагностики бруцеллёзной инфекции, поскольку являются недорогими и относительно простыми с технической точки зрения в отличие от бактериологического метода и ПЦР. Это важные факторы для стран с эндемичными сельскими регионами и высоким уровнем заболеваемости людей и животных в связи с недоступностью современного лабораторного оборудования.

ПЦР в любом формате — более чувствительный метод в сравнении с автоматизированным бактериологическим методом и более специфичный, чем серологические тесты, доступные в настоящее время для диагностики бруцеллёза и его очаговых осложнений. Положительные характеристики ПЦР, включая их непревзойдённую чувствительность, техническую простоту, скорость и безопасность, не сделали их настоящей альтернативой традиционным культуральным и серологическим методам. Учитывая исключительную чувствительность ПЦР в реальном времени, положительный тест не всегда подразумевает активную инфекцию, а может указывать лишь на незначительное количество ДНК в нежизнеспособных бактериях, которое регистрируется у инфицированных возбудителем бруцеллёза, или остатки ДНК, присутствующие в циркулирующих мононуклеарных клетках после успешного курса лечения. Соответственно, интерпретацию результатов, полученных с помощью ПЦР, следует проводить осторожно, принимая во внимание клинико-эпидемиологические данные. Мультиплексирование в ПЦР реального времени — полезный метод для идентификации и дифференциации видов бруцелл в качестве замены традиционных, трудоёмких и небезопасных фенотипических методов.

В настоящее время количество коммерческих тест-систем ПЦР, доступных для диагностики бруцеллёза человека, всё ещё ограничено. Кроме того, большинство из этих тестов были оценены с участием небольшого числа пациентов, обычно с использованием образцов сыворотки крови, в том числе отсутствуют широкомасштабные сравнительные исследования коммерческих наборов с другими методами диагностики. Для достижения согласованных и воспроизводимых результатов между лабораториями потребуются стандартизация и автоматизация лабораторных методов в комплексной диагностике бруцеллёза людей. Лабораторная диагностика бруцеллёза человека базируется на объединённом комплексе методов, включающих выделение бруцелл из клинических образцов с последующей идентификацией, обнаружением антибруцеллёзных антител с помощью серологических тестов и использованием разновидностей ПЦР для детекции ДНК бруцелл.

В неэндемичных регионах России диагноз бруцеллёза должен основываться на клинической симптоматике, эпидемиологическом анамнезе, включающем сведения о пребывании в эндемичном регионе или употреблении продуктов животноводства, и соответствующих лабораторных данных. В эндемичных регионах диагностика бруцеллёза строится на клинических проявлениях и лабораторных методах.

Таким образом, только комплексный подход, включающий данные клинической картины, эпидемиологического анамнеза и главенствующие показатели лабораторных тестов, позволяет проводить диагностику бруцеллёза у людей.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНО

**Источник финансирования.** Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования и подготовке публикации.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с проведенным исследованием и публикацией настоящей статьи.

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией). Наибольший вклад распределён следующим образом: Ю.К. Кулаков — анализ зарубежной и российской литературы, написание текста и редактирование статьи; А.А. Далгатова, В.В. Бакалин — анализ литературных источников; О.А. Бургасова — сбор и анализ литературных источников, подготовка и написание текста, редактирование статьи.

## ADDITIONAL INFORMATION

**Funding source.** This study was not supported by any external sources of funding.

**Competing interests.** The authors declare that they have no competing interests.

**Authors' contribution.** Y.K. Kulakov — analysis of foreign and Russian literature, writing and editing of the article; A.A. Dalgatova, V.V. Bacalin — analysis of literary sources; O.A. Bargasova — collection and analysis of literary sources, preparation and writing of the text, editing of the article. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хачатурова А.А., Пономаренко Д.Г., Ковалев Д.А., и др. Анализ заболеваемости людей бруцеллёзом и молекулярно-биологическая характеристика изолятов *Brucella melitensis* на длительно неблагополучных по бруцеллёзу территориях Юга Европейской части России // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2022. Т. 99, № 1. С. 63–74. doi: 10.36233/0372-9311-185
2. Малецкая О.В., Пономаренко Д.Г., Манин Е.А., и др. Бруцеллёз. Современное состояние проблемы научное издание / Под ред. Г.Г. Онищенко, А.Н. Куличенко. Ставрополь: Губерния, 2019. 345 с.
3. Кулаков Ю.К. Молекулярные аспекты персистенции бруцелл // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2016. № 1. С. 3–8.
4. Pappas G., Papadimitriou P., Akritidis N., et al. The new global map of human brucellosis // Lancet Infect Dis. 2006. Vol. 6, N 2. P. 91–99. doi: 10.1016/S1473-3099(06)70382-6
5. Желудков М.М. Бруцеллёз в России: современная эпидемиология и лабораторная диагностика: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. Москва, 2009. 50 с.
6. Санникова И.В., Попов П.Н., Павлова О.М., и др. Бруцеллёз (клиника, диагностика, лечение, организация медицинской помощи): методическое пособие для врачей-инфекционистов и врачей общей практики. Ставрополь, 2015. 84 с.
7. Di Bonaventura G., Angeletti S., Ianni A., et al. Microbiological laboratory diagnosis of human brucellosis: an overview // Pathogens. 2021. Vol. 10, N 12. P. 1623. doi: 10.3390/pathogens10121623

8. МУК 3.1.7.3402-16. Эпидемиологический надзор и лабораторная диагностика бруцеллеза: методические указания. Москва: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2017. 60 с.
9. Малов В.А. Терапевтические маски бруцеллёза // Фарматека. 2011. № 4. С. 22–28.
10. Baron E.J., Weinstein M.P., Dunne W.M., et al. Cumitech 1C. Blood cultures IV. Coordinating ed., Baron E.J. ASM Press, Washington: DC, 2005.
11. Yagupsky P. Use of the BACTEC MYCO/FLYTIC medium for detection of *Brucella melitensis* bacteremia // *J Clin Microbiol.* 2004. Vol. 42, N 5. P. 2207–2208. doi: 10.1128/jcm.42.5.2207-2208.2004
12. Sagi M., Neshet L., Yagupsky P. The Bactec FX blood culture system detects *Brucella melitensis* bacteremia in adult patients within the routine 1-week incubation period // *J Clin Microbiol.* 2017. Vol. 55, N 3. P. 942–946. doi: 10.1128/JCM.02320-16
13. Ayaslioglu E., Kilic D., Kaygusuz S., et al. The detection of *Brucella* spp. by BACTEC 9050 blood culture system. (In Turkish) // *Mikrobiyol Bul.* 2004. Vol. 38, N 4. P. 415–419.
14. Al-Attas R.A., Al-Khalifa M., Al-Qurashi A.R., et al. Evaluation of PCR, culture and serology for the diagnosis of acute human brucellosis // *Ann Saudi Med.* 2000. Vol. 20, N 3-4. P. 224–228. doi: 10.5144/0256-4947.2000.224
15. Kazemi S., Borzoueisileh S., Ebrahimpour S. Evaluation of brucellosis in patients and diagnostic tests // *Online J Anim Feed Res.* 2015. Vol. 4, N 3. P. 60–66. doi: 10.5829/idosi.ajeaes.2015.15.3.92127
16. Ratushna V.G., Stugrill D.M., Ramamoorthy S., et al. Molecular targets for rapid identification of *Brucella* spp // *Bio Med Central Microbiology.* 2006. Vol. 6. P. 13. doi: 10.1186/1471-2180-6-13
17. Кулаков Ю.К., Желудков М.М., Голмачева Т.А., Цирельсон Л.Е. Метод ПЦР в лабораторной диагностике бруцеллеза // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2010. № 2. С. 29–33.
18. Whatmore A.M., Koylass M.S., Muchowski J., et al. Extended multilocus sequence analysis to describe the global population structure of the genus *Brucella*: phylogeography and relationship to biovars // *Front Microbiol.* 2016. Vol. 7. P. 2049. doi: 10.3389/fmicb.2016.02049
19. Gopaul K.K., Koylass M.S., Smith C.J., et al. Rapid identification of *Brucella* isolates to the species level by real time PCR based single nucleotide polymorphism (SNP) analysis // *BMC Microbiology.* 2008. N 8. P. 86. doi: 10.1186/1471-2180-8-86
20. Al Dahouk S., Le Fleche P., Nockler K., et al. Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human brucellosis // *J Microbiol Methods.* 2007. Vol. 69, N 1. P. 137–145. doi: 10.1016/j.mimet.2006.12.015
21. Кулаков Ю.К., Ковалев Д.А., Мисетова Е.Н., и др. Использование Multiple Locus Variable Tandem Repeats Analysis в систематике возбудителя бруцеллеза // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2012. Т. 30, № 2. С. 30–34.
22. Vergnaud G., Hauck Y., Christiany D., et al. Genotypic expansion within the population structure of classical *Brucella* species revealed by MLVA16 typing of 1404 *Brucella* isolates from different animal and geographic origins, 1974–2006 // *Front Microbiol.* 2018. Vol. 9, N 8. P. 1253–1262. doi: 10.3389/fmicb.2018.01545
23. Ковалев Д.А., Кузнецова И.В., Жиров А.М., и др. Генетическое типирование штаммов *Brucella melitensis* на основе анализа варибельности INDEL-локусов // *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы.* 2022. № 1. С. 81–86. doi: 10.18565/epidem.2022.12.1.81-6
24. Patel R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases // *Clin Chem.* 2015. Vol. 61, N 1. P. 100–111. doi: 10.1373/clinchem.2014.221770

25. Lista F., Reubsat F.A., De Santis R., et al. Reliable identification at the species level of *Brucella* isolated with MALDI-TOF // *BMC Microbiol.* 2011. Vol. 11. P. 267. doi: 10.1186/1471-2180-11-267
26. Karger A., Melzer F., Timke M., et al. Inter laboratory comparison of intact-cell matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry results for identification and differentiation of *Brucella* spp. // *J Clin Microbiol.* 2013. Vol. 51, N 9. P. 3123–3126. doi: 10.1128/JCM.01720-13
27. Sali M., De Maio F., Tarantino M., et al. Rapid and safe one-step extraction method for the identification of *Brucella* strains at genus and species level by MALDI-TOF mass spectrometry // *PLoS One.* 2018. Vol. 13, N 6. P. e0197864. doi: 10.1371/journal.pone.0197864
28. Poonawala H., Marrs Conner T., Peaper D.R. The brief case: misidentification of *Brucella melitensis* as *Ochrobactrum anthropi* by matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) // *J Clin Microbiol.* 2018. Vol. 56, N 6. P. e00914-17. doi: 10.1128/JCM.00914-17
29. Mesureur J., Arend S., Cellière B., et al. A MALDI-TOF MS database with broad genus coverage for species-level identification of *Brucella* // *PLoS Negl Trop Dis.* 2018. Vol. 12, N 10. P. e0006874. doi: 10.1371/journal.pntd.0006874
30. Ульшина Д.В., Ковалев О.В., Бобрышева, Д.Г., и др. Применение времяпролетной масс-спектрометрии для диагностики бруцеллеза и межвидовой дифференциации штаммов *Brucella* spp. // *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение.* 2018. Т. 7, № 4. С. 15–24.
31. Al Dahouk S., Nöckler K. Implications of laboratory diagnosis on brucellosis therapy // *Expert Rev Anti-Infect Ther.* 2011. Vol. 9, N 7. P. 833–845. doi: 10.1586/eri.11.55
32. Ruiz-Mesa J.D., Sánchez-Gonzalez J., Reguera J.M., et al. Rose Bengal test: diagnostic yield and use for the rapid diagnosis of human brucellosis in emergency departments in endemic areas // *Clin Microbiol Infect.* 2005. Vol. 11, N 3. P. 221–225. doi: 10.1111/j.1469-0691.2004.01063.x
33. Mantur B., Parande A., Amarnath S., et al. ELISA versus conventional methods of diagnosing endemic brucellosis // *Am J Trop Med Hyg.* 2010. Vol. 83, N 2. P. 314–318. doi: 10.4269/ajtmh.2010.09-0790
34. Osoba A.O., Balkhy H., Memish Z., et al. Diagnostic value of *Brucella* ELISA IgG and IgM in bacteremic and non-bacteremic patients with brucellosis // *J Chem.* 2001. Vol. 13, Suppl. 1. P. 54–59. doi: 10.1080/1120009x.2001.11782330
35. Коноплева М.В. Разработка автоматизированного количественного агглютинационного теста (АКАТ) и его применение для иммунодетекции возбудителей и диагностики инфекций: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Москва, 2007. 42 с.
36. De Weck A.L., Sanz M.L., Gamboa P.M., et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drug hypersensitivity syndrome: a multicenter study. II. Basophil activation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs and its impact on pathogenesis // *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2010. Vol. 20, N 1. P. 39–57.
37. Пономаренко Д.Г., Логвиненко О.В., Саркисян Н.С., и др. Новый подход к аллергодиагностике бруцеллёза // *Инфекция и иммунитет.* 2013. Т. 3, № 1. С. 89–92.
38. Саркисян Н.С., Пономаренко Д.Г., Логвиненко О.В., и др. Интенсивность специфической сенсibilизации и иммунный статус у больных бруцеллезом // *Медицинская иммунология.* 2016. Т. 18, № 4. С. 365–372. doi: 10.15789/1563-0625-2016-4-365-372
39. Костюченко М.В., Пономаренко Д.Г., Ракитина Е.Л., и др. Перспектива оценки антигенреактивности лимфоцитов *in vitro* для диагностики острого бруцеллёза // *Инфекция и иммунитет.* 2017. Т. 7, № 1. С. 91–96. doi: 10.15789/2220-7619-2017-1-91-96

40. Scholz H.C., Vergnaud G. Molecular characterisation of *Brucella* species // *Rev Sci Tech.* 2013. Vol. 32. P. 149–162. doi: 10.20506/rst.32.1.2189
41. Zerva L., Bourantas K., Mitka S., et al. Serum is the preferred clinical specimen for diagnosis of human brucellosis by PCR // *J Clin Microbiol.* 2001. Vol. 39, N 4. P. 1661–1664. doi: 10.1128/JCM.39.4.1661-1664.2001
42. Sanjuan-Jimenez R., Colmenero J.D., Morata P. Lessons learned with molecular methods targeting the BCSP-31 membrane protein for diagnosis of human brucellosis // *Clin Chim Acta.* 2017. Vol. 469. P. 1–9. doi: 10.1016/j.cca.2017.03.014
43. Kattar M.M., Zalloua P.A., Araj G.F., et al. Development and evaluation of real-time polymerase chain reaction assays on whole blood and paraffin embedded tissues for rapid diagnosis of human brucellosis // *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007. Vol. 59, N 1. P. 23–32. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2007.04.002
44. Mitka S., Anetakis C., Souliou E., et al. Evaluation of different PCR assays for early detection of acute and relapsing brucellosis in humans in comparison with conventional methods // *J Clin Microbiol.* 2007. Vol. 45, N 4. P. 1211–1218. doi: 10.1128/JCM.00010-06
45. El Kholy A.A., Gomaa H.E., El Anany M.G., et al. Diagnosis of human brucellosis in Egypt by polymerase chain reaction // *East Mediterr Health J.* 2009. Vol. 15, N 5. P. 1068–1074. doi: 10.26719/2009.15.5.1068
46. Baddour M.M., Alkhalifa D.H. Evaluation of three polymerase chain reaction techniques for detection of *Brucella* DNA in peripheral human blood // *Can J Microbiol.* 2008. Vol. 54, N 5. P. 352–357. doi: 10.1139/w08-017
47. Al-Nakkas A.F., Wright S.G., Mustafa A.S., Wilson S. Single-tube, nested PCR for the diagnosis of human brucellosis in Kuwait // *Ann Trop Med Parasitol.* 2002. Vol. 96, N 4. P. 397–403. doi: 10.1179/000349802125001203
48. Bounaadja L., Albert D., Chénais B., et al. Real-time PCR for identification of *Brucella* spp.: a comparative study of IS711, bcs31, and per target genes // *Vet Microbiol.* 2009. Vol. 137, N 1-2. P. 156–164. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.12.023
49. Sanjuan-Jimenez R., Colmenero J.D., Morata P. Lessons learned with molecular methods targeting the BCSP-31 membrane protein for diagnosis of human brucellosis // *Clin Chim Acta.* 2017. Vol. 469. P. 1–9. doi: 10.1016/j.cca.2017.03.014
50. López-Goñi I., García-Yoldi D., Marín C.M., et al. Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains // *J Clin Microbiol.* 2008. Vol. 46, N 10. P. 3484–3487. doi: 10.1128/JCM.00837-08
51. Colmenero J.D., Reguera J.M., Martos F., et al. Complications associated with *Brucella melitensis* infection: a study of 530 cases // *Medicine (Baltimore, MD).* 1996. Vol. 75, N 4. P. 195–211. doi: 10.1097/00005792-199607000-00003
52. Buzgan T., Karahocagil M.K., Irmak H., et al. Clinical manifestations and complications in 1028 cases of brucellosis: a retrospective evaluation and review of the literature // *Int J Infect Dis.* 2010. Vol. 14, N 6. P. e469–e478. doi: 10.1016/j.ijid.2009.06.031
53. Morata P., Queipo-Ortuño M.I., Reguera J.M., et al. Diagnostic yield of a PCR assay in focal complications of brucellosis // *J Clin Microbiol.* 2001. Vol. 39, N 10. P. 3743–3746. doi: 10.1128/JCM.39.10.3743-3746.2001
54. Li M., Zhou X., Li J., et al. Real-time PCR assays for diagnosing brucellar spondylitis using formalin-fixed paraffin embedded tissues // *Med (Baltimore, MD).* 2018. Vol. 97, N 9. P. e0062. doi: 10.1097/MD.00000000000010062
55. Sanjuan-Jimenez R., Colmenero J.D., Bermúdez P., et al. Amplicon DNA melting analysis for the simultaneous detection of *Brucella* spp. and *Mycobacterium tuberculosis* complex. Potential use in rapid differential diagnosis between extrapulmonary tuberculosis and focal complications of brucellosis // *PLoS One.* 2013. Vol. 8, N 3. P. e58353. doi: 10.1371/journal.pone.0058353

56. Vrioni G., Gartzonika C., Kostoula A., et al. Application of a polymerase chain reaction enzyme immunoassay in peripheral whole blood and serum specimens for diagnosis of acute human brucellosis // *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004. Vol. 23, N 3. P. 194–199. doi: 10.1007/s10096-003-1082-4
57. Queipo-Ortuño M.I., Colmenero J.D., Reguera J.M., et al. Rapid diagnosis of human brucellosis by SYBR green I-based real-time PCR assay and melting curve analysis in serum samples // *Clin Microbiol Infect*. 2005. Vol. 11, N 9. P. 713–718. doi: 10.1111/j.1469-0691.2005.01202.x
58. Debeaumont C., Falconnet P.A., Maurin M. Real-time PCR for detection of *Brucella* spp. DNA in human serum samples // *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005. Vol. 24, N 12. P. 842–845. doi: 10.1007/s10096-005-0064-0
59. Surucuoglu S., El S., Ural S., et al. Evaluation of real-time PCR method for rapid diagnosis of brucellosis with different clinical manifestations // *Pol J Microbiol*. 2009. Vol. 58, N 1. P. 15–19.
60. Queipo-Ortuño M.I., Colmenero J.D., Baeza G., Morata P. Comparison between Light Cycler real-time polymerase chain reaction (PCR) assay with serum and PCR-enzyme-linked immunosorbent assay with whole blood samples for the diagnosis of human brucellosis // *Clin Infect Dis*. 2005. Vol. 40, N 2. P. 260–264. doi: 10.1086/426818

## REFERENCES

1. Khachaturova AA, Ponomarenko DG, Kovalev DA, et al. Analysis of the incidence of brucellosis in humans and molecular biological characteristics of *Brucella melitensis* isolates in long-term brucellosis-affected territories of the south of the European part of Russia. *J Microbiol Epidemiol Immunobiol*. 2022;99(1):63–74. (In Russ). doi: 10.36233/0372-9311-185
2. Maletskaya OV, Ponomarenko DG, Manin EA, et al. Brucellosis. The current state of the problem scientific publication. Ed. by G.G. Onishchenko, A.N. Kulichenko. Stavropol: Gubernia; 2019. 345 p. (In Russ).
3. Kulakov YK. Molecular aspects of brucella persistence. *Mol Gen Microbiol Virology*. 2016;(1):3–8. (In Russ).
4. Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, et al. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis*. 2006;6(2):91–99. doi: 10.1016/S1473-3099(06)70382-6
5. Stomachs MM. Brucellosis in Russia: modern epidemiology and laboratory diagnostics [dissertation abstract]. Moscow; 2009. 50 p. (In Russ).
6. Sannikova IV, Popov PN, Pavlova OM, et al. Brucellosis (clinic, diagnosis, treatment, organization of medical care): methodical manual for infectious diseases and general practitioners. Stavropol; 2015. 84 p. (In Russ).
7. Di Bonaventura G, Angeletti S, Ianni A, et al. Microbiological laboratory diagnosis of human brucellosis: an overview. *Pathogens*. 2021;10(12):1623. doi: 10.3390/pathogens10121623
8. MUC 3.1.7.3402-16. Epidemiological surveillance and laboratory diagnosis of brucellosis: Guidelines. Moscow: Federal Center of Hygiene and Epidemiology of Rospotrebnadzor; 2017. 60 p. (In Russ).
9. Malov VA. Therapeutic masks of brucellosis. *Pharmateca*. 2011;(4):22–28. (In Russ).
10. Baron EJ, Weinstein MP, Dunne WM, et al. Cumitech 1C. Blood cultures IV. Coordinating ed, Baron E.J. ASM Press; Washington: DC; 2005.
11. Yagupsky P. Use of the BACTEC MYCO/FLYTIC medium for detection of *Brucella melitensis* bacteremia. *J Clin Microbiol*. 2004;42(5):2207–2208. doi: 10.1128/jcm.42.5.2207-2208.2004

12. Sagi M, Nesher L, Yagupsky P. The Bactec FX blood culture system detects *Brucellamelitensis* bacteremia in adult patients within the routine 1-week incubation period. *J Clin Microbiol.* 2017;55(3):942–946. doi: 10.1128/JCM.02320-16
13. Ayaslioglu E, Kilic D, Kaygusuz S, et al. The detection of *Brucella* spp. by BACTEC 9050 blood culture system. *Mikrobiyol Bul.* 2004;38:415–419. (In Turkish).
14. Al-Attas RA, Al-Khalifa M, Al-Qurashi AR, et al. Evaluation of PCR, culture and serology for the diagnosis of acute human brucellosis. *Ann Saudi Med.* 2000;20(3-4):224–228. doi: 10.5144/0256-4947.2000.224
15. Kazemi S, Borzoueisileh S, Ebrahimpour S. Evaluation of brucellosis in patients and diagnostic tests. *Online J Anim Feed Res.* 2015;4(3):60–66. doi: 10.5829/idosi.aejas.2015.15.3.92127
16. Ratushna VG, Stugrill DM, Ramamoorthy S, et al. Molecular targets for rapid identification of *Brucella* spp. *Bio Med Central Microbiology.* 2006;6:13. doi: 10.1186/1471-2180-6-13
17. Kulakov YK, Zheludkov MM, Tolmacheva TA, Tsirelson LE. The PCR method in laboratory diagnosis of brucellosis. *Epidemiol Vaccination.* 2010;(2):29–33. (In Russ).
18. Whatmore AM, Koylass MS, Muchowski J, et al. Extended multilocus sequence analysis to describe the global population structure of the genus *Brucella*: phylogeography and relationship to biovars. *Front Microbiol.* 2016;7:2049. doi: 10.3389/fmicb.2016.02049
19. Gopaul KK, Koylass MS, Smith CJ, et al. Rapid identification of *Brucella* isolates to the species level by real time PCR based single nucleotide polymorphism (SNP) analysis. *BMC Microbiology.* 2008;8:86. doi: 10.1186/1471-2180-8-86
20. Al Dahouk S, Le Fleche P, Nockler K, et al. Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human brucellosis. *J Microbiol Methods.* 2007;69(1):137–145. doi: 10.1016/j.mimet.2006.12.015
21. Kulakov YK, Kovalev DA, Misetova EN, et al. The use of multiple locus variable tandem repeats analysis in the systematics of the causative agent of brucellosis. *Mol Gen Microbiol Virology.* 2012;30(2):30–34. (In Russ).
22. Vergnaud G, Hauck Y, Christiany D, et al. Genotypic expansion within the population structure of classical *Brucella* species revealed by MLVA16 typing of 1404 *Brucella* isolates from different animal and geographic origins, 1974–2006. *Front Microbiol.* 2018;9(8):1253–1262. doi: 10.3389/fmicb.2018.01545
23. Kovalev DA, Kuznetsova IV, Zhirov AM, et al. Genetic typing of *Brucella melitensis* strains based on the analysis of the variability of INDEL loci. *Epidemiol Inf Dis.* 2022;(1):81–86. (In Russ). doi: 10.18565/epidem.2022.12.1.81-6
24. Patel R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clin Chem.* 2015;61(1):100–111. doi: 10.1373/clinchem.2014.221770
25. Lista F, Reubsaet FA, De Santis R, et al. Reliable identification at the species level of *Brucella* isolated with MALDI-TOF. *BMC Microbiol.* 2011;11:267. doi: 10.1186/1471-2180-11-267
26. Karger A, Melzer F, Timke M, et al. Inter laboratory comparison of intact-cell matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry results for identification and differentiation of *Brucella* spp. *J Clin Microbiol.* 2013;51(9):3123–3126. doi: 10.1128/JCM.01720-13
27. Sali M, De Maio F, Tarantino M, et al. Rapid and safe one-step extraction method for the identification of *Brucella* strains at genus and species level by MALDI-TOF mass spectrometry. *PLoS One.* 2018;13(6):e0197864. doi: 10.1371/journal.pone.0197864
28. Poonawala H, Marrs Conner T, Peaper DR. The brief case: misidentification of *Brucella melitensis* as *Ochrobactrum anthropi* by matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *J Clin Microbiol.* 2018;56(6):e00914-17. doi: 10.1128/JCM.00914-17

29. Mesureur J, Arend S, Cellière B, et al. A MALDI-TOF MS database with broad genus coverage for species-level identification of *Brucella*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(10):e0006874. doi: 10.1371/journal.pntd.0006874
30. Ulshina DV, Kovalev OV, Bobrysheva, DG, et al. The use of time-of-flight mass spectrometry for the diagnosis of brucellosis and interspecific differentiation of *Brucella* spp. strains. *Inf Diseases News Opinions Training*. 2018;7(4):15–24. (In Russ).
31. Al Dahouk S, Nöckler K. Implications of laboratory diagnosis on brucellosis therapy. *Expert Rev Anti-Infect Ther*. 2011;9(7):833–845. doi: 10.1586/eri.11.55.
32. Ruiz-Mesa JD, Sánchez-Gonzalez J, Reguera JM, et al. Rose Bengal test: diagnostic yield and use for the rapid diagnosis of human brucellosis in emergency departments in endemic areas. *Clin Microbiol Infect*. 2005;11(3):221–225. doi: 10.1111/j.1469-0691.2004.01063.x
33. Mantur B, Parande A, Amarnath S, et al. ELISA versus conventional methods of diagnosing endemic brucellosis. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;83(2):314–318. doi: 10.4269/ajtmh.2010.09-0790
34. Osoba AO, Balkhy H, Memish Z, et al. Diagnostic value of *Brucella* ELISA IgG and IgM in bacteremic and non-bacteremic patients with brucellosis. *J Chem*. 2001;13(Suppl 1):54–59. doi: 10.1080/1120009x.2001.11782330
35. Konopleva MV. Development of an automated quantitative agglutination test (ACAT) and its application for immunodetection of pathogens and diagnosis of infections [dissertation abstract]. Moscow; 2007. 42 p. (In Russ).
36. De Weck AL, Sanz ML, Gamboa PM, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drug hypersensitivity syndrome: a multicenter study. II. Basophil activation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs and its impact on pathogenesis. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2010;20(1):39–57.
37. Ponomarenko DG, Logvinenko OV, Sarkisyan NS, et al. A new approach to the allergodiagnosis of brucellosis. *Inf Immunity*. 2013;3(1):89–92. (In Russ).
38. Sarkisyan NS, Ponomarenko DG, Logvinenko OV, et al. Intensity of specific sensitization and immune status in patients with brucellosis. *Med Immunol*. 2016;18(4):365–372. (In Russ). doi: 10.15789/1563-0625-2016-4-365-372
39. Kostyuchenko MV, Ponomarenko DG, Rakitina EL, et al. The prospect of assessing the antigen reactivity of lymphocytes in vitro for the diagnosis of acute brucellosis. *Inf Immunity*. 2017;7(1):91–96. (In Russ). doi: 10.15789/2220-7619-2017-1-91-96
40. Scholz HC, Vergnaud G. Molecular characterisation of *Brucella* species. *Rev Sci Tech*. 2013;32:149–162. doi: 10.20506/rst.32.1.2189
41. Zerva L, Bourantas K, Mitka S, et al. Serum is the preferred clinical specimen for diagnosis of human brucellosis by PCR. *J Clin Microbiol*. 2001;39(4):1661–1664. doi: 10.1128/JCM.39.4.1661-1664.2001
42. Sanjuan-Jimenez R, Colmenero JD, Morata P. Lessons learned with molecular methods targeting the BCSP-31 membrane protein for diagnosis of human brucellosis. *Clin Chim Acta*. 2017;469:1–9. doi: 10.1016/j.cca.2017.03.014
43. Kattar MM, Zalloua PA, Araj GF, et al. Development and evaluation of real-time polymerase chain reaction assays on whole blood and paraffin embedded tissues for rapid diagnosis of human brucellosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007;59(1):23–32. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2007.04.002
44. Mitka S, Anetakis C, Souliou E, et al. Evaluation of different PCR assays for early detection of acute and relapsing brucellosis in humans in comparison with conventional methods. *J Clin Microbiol*. 2007;45(4):1211–1218. doi: 10.1128/JCM.00010-06
45. El Kholy AA, Gomaa HE, El Anany MG, El Abd Rasheed E. Diagnosis of human brucellosis in Egypt by polymerase chain reaction. *East Mediterr Health J*. 2009;15(5):1068–1074. doi: 10.26719/2009.15.5.1068

46. Baddour MM, Alkhalifa DH. Evaluation of three polymerase chain reaction techniques for detection of *Brucella* DNA in peripheral human blood. *Can J Microbiol.* 2008;54(5):352–357. doi: 10.1139/w08-017
47. Al-Nakkas AF, Wright SG, Mustafa AS, Wilson S. Single-tube, nested PCR for the diagnosis of human brucellosis in Kuwait. *Ann Trop Med Parasitol.* 2002;96(4):397–403. doi: 10.1179/000349802125001203
48. Bounaadja L, Albert D, Chénais B, et al. Real-time PCR for identification of *Brucella* spp: a comparative study of IS711, bcs31, and per target genes. *Vet Microbiol.* 2009;137(1-2):156–164. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.12.023
49. Sanjuan-Jimenez R, Colmenero JD, Morata P. Lessons learned with molecular methods targeting the BCSP-31 membrane protein for diagnosis of human brucellosis. *Clin Chim Acta.* 2017;469:1–9. doi: 10.1016/j.cca.2017.03.014
50. López-Goñi I, García-Yoldi D, Marín CM, et al. Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. *J Clin Microbiol.* 2008;46(10):3484–3487. doi: 10.1128/JCM.00837-08
51. Colmenero JD, Reguera JM, Martos F, et al. Complications associated with *Brucella melitensis* infection: a study of 530 cases. *Med (Baltimore, MD).* 1996;75(4):195–211. doi: 10.1097/00005792-199607000-00003
52. Buzgan T, Karahocagil MK, Irmak H, et al. Clinical manifestations and complications in 1028 cases of brucellosis: a retrospective evaluation and review of the literature. *Int J Infect Dis.* 2010;14(6):e469–e478. doi: 10.1016/j.ijid.2009.06.031
53. Morata P, Queipo-Ortuño MI, Reguera JM, et al. Diagnostic yield of a PCR assay in focal complications of brucellosis. *J Clin Microbiol.* 2001;39(10):3743–3746. doi: 10.1128/JCM.39.10.3743-3746.2001
54. Li M, Zhou X, Li J, et al. Real-time PCR assays for diagnosing brucellar spondylitis using formalin-fixed paraffin embedded tissues. *Med (Baltimore, MD).* 2018;97(9):e0062. doi: 10.1097/MD.00000000000010062
55. Sanjuan-Jimenez R, Colmenero JD, Bermúdez P, et al. Amplicon DNA melting analysis for the simultaneous detection of *Brucella* spp. and *Mycobacterium tuberculosis* complex. Potential use in rapid differential diagnosis between extrapulmonary tuberculosis and focal complications of brucellosis. *PLoS One.* 2013;8(3):e58353. doi: 10.1371/journal.pone.0058353
56. Vrioni G, Gartzonika C, Kostoula A, et al. Application of a polymerase chain reaction enzyme immunoassay in peripheral whole blood and serum specimens for diagnosis of acute human brucellosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004;23(3):194–199. doi: 10.1007/s10096-003-1082-4
57. Queipo-Ortuño MI, Colmenero JD, Reguera JM, et al. Rapid diagnosis of human brucellosis by SYBR green I-based real-time PCR assay and melting curve analysis in serum samples. *Clin Microbiol Infect.* 2005;11(9):713–718. doi: 10.1111/j.1469-0691.2005.01202.x
58. Debeaumont C, Falconnet PA, Maurin M. Real-time PCR for detection of *Brucella* spp. DNA in human serum samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2005;24(12):842–845. doi: 10.1007/s10096-005-0064-0
59. Surucuoglu S, El S, Ural S, et al. Evaluation of real-time PCR method for rapid diagnosis of brucellosis with different clinical manifestations. *Pol J Microbiol.* 2009;58(1):15–19.
60. Queipo-Ortuño MI, Colmenero JD, Baeza G, Morata P. Comparison between light cycler real-time polymerase chain reaction (PCR) assay with serum and PCR-enzyme-linked immunosorbent assay with whole blood samples for the diagnosis of human brucellosis. *Clin Infect Dis.* 2005;40(2):260–264. doi: 10.1086/426818

ОБ АВТОРАХ	AUTHORS' INFO
* Бургасова Ольга Александровна,	* Olga A. Burgasova, MD, Dr. Sci. (Med.),

д.м.н., профессор; адрес: Россия, 123098, Москва, ул. Гамалеи, д. 18; ORCID: <a href="https://orcid.org/0000-0002-5486-0837">https://orcid.org/0000-0002-5486-0837</a> ; eLibrary SPIN: 5103-0451; e-mail: olgaburgasova@mail.ru	Professor; address: 18 Gamalei street, 123098 Moscow, Russia; ORCID: <a href="https://orcid.org/0000-0002-5486-0837">https://orcid.org/0000-0002-5486-0837</a> ; eLibrary SPIN: 5103-0451; e-mail: olgaburgasova@mail.ru
<b>Кулаков Юрий Константинович</b> , к.м.н.,; ORCID: <a href="https://orcid.org/0000-0002-4482-9369">https://orcid.org/0000-0002-4482-9369</a> ; eLibrary SPIN: 7720-0692; e-mail: ykulakov@mail.ru	<b>Yuri K. Kulakov</b> , MD, Cand. Sci. (Med.), ; ORCID: <a href="https://orcid.org/0000-0002-4482-9369">https://orcid.org/0000-0002-4482-9369</a> ; eLibrary SPIN: 7720-0692; e-mail: ykulakov@mail.ru
<b>Далгатова Асият Асильдаровна</b> ; ORCID: ; eLibrary SPIN: ; e-mail: doctorchar2017@mail.ru	<b>Asiyat A. Dalgatova</b> , MD; ORCID: ; eLibrary SPIN: ; e-mail: doctorchar2017@mail.ru
<b>Бакалин Валерия Валерьевна</b> ; ORCID: <a href="https://orcid.org/0000-0002-0491-9925">https://orcid.org/0000-0002-0491-9925</a> ; eLibrary SPIN: ; e-mail: bacalinmed@gmail.ru	<b>Valeria V. Bacalin</b> ; ORCID: <a href="https://orcid.org/0000-0002-0491-9925">https://orcid.org/0000-0002-0491-9925</a> ; eLibrary SPIN: ; e-mail: bacalinmed@gmail.ru

ARTICLE IN PRESS