

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ИННОВАЦИОННЫХ ТЕСТОВ В ДИАГНОСТИКЕ ЛАТЕНТНОЙ И АКТИВНОЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ

© М.Э. Лозовская, В.Б. Белушков, О.П. Гурина, Е.Б. Васильева, Л.В. Клочкова

ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России

Резюме. У 50 детей изучены результаты новых трех тестов на основе антигенов CFP-10 и ESAT-6: внутрикожного теста Диаскинтест и тестов *in vitro* QUANTIFERON и Тубинферон. Диаскинтест и Тубинферон разработаны и выпускаются в Российской Федерации. Тест QUANTIFERON производится фирмой Cellestis (Australia). У 20 детей были активные формы туберкулеза, у 22 латентная туберкулезная инфекция и 8 были не инфицированы *M. tuberculosis*. Установлено, что при высокой частоте совпадения результатов (66 %), в некоторых ситуациях тесты могут реагировать по-разному и давать дополнительную информацию при совместном применении в сложных диагностических случаях. Тесты *in vitro* оказались более чувствительными при иммунопатологических состояниях по сравнению с Диаскинтестом. Тест «Тубинферон» показал большую чувствительность при латентной туберкулезной инфекции (40,9 %) по сравнению с Диаскинтестом (22,7 %) и тестом QUANTIFERON (31,8 %), но меньшую при развившемся туберкулезе — 60, 80 и 85 % соответственно. Все три пробы более информативны при заболевании туберкулезом, чем при латентной туберкулезной инфекции. Важное преимущество теста «Тубинферон» — возможность оценки *in vitro* поствакцинальной аллергии, благодаря наличию пробы с туберкулином. Это может быть использовано при дифференциальной диагностике туберкулеза и генерализованной БЦЖ-инфекции, в том числе у детей с ВИЧ. У детей, не вакцинированных БЦЖ, проба Манту может быть эффективнее Диаскинтеста. Тест-система Тубинферон заслуживает широкого клинического применения, дальнейшего изучения и совершенствования.

Ключевые слова: дети; туберкулезная инфекция; Диаскинтест; QUANTIFERON; Тубинферон.

Одним из наиболее значимых научных достижений фтизиатрии за последние годы можно по праву считать открытие секреторных белков ESAT-6 и CFP-10, которые кодируются в зоне RD1 *M. tuberculosis* (МБТ) при размножении микобактерий [9, 10]. В связи с их отсутствием в *M. bovis* BCG и большинстве микобактерий окружающей среды, оба эти белка были использованы за рубежом в создании тестов для диагностики и дифференциальной диагностики туберкулеза [11]. Наиболее распространенным из них является зарегистрированный в РФ «Квантиферон» или квантифероновый тест — QuantiFERON (QFT) (Cellestis, Australia), основанный на измерении продукции гамма-интерферона (IFN- γ) Т-лимфоцитами крови *in vitro* в ответ на стимуляцию специфическими антигенами (Interferon-gamma release assay — IGRA) [8]. В нашей стране создан аллерген рекомбинантный для проведения внутрикожной пробы «Диаскинтест», представляющий собой два связанных между собой антигена: ESAT-6 и CFP-10 [2, 3]. Применение диаскинтеста (ДСТ) регламентировано Приказом Минздравсоцразвития России № 855 от 29 октября 2009 года [7], после чего он получил широкое распространение по всей стране [1, 5]. Помимо диаскинтеста российскими учеными разработана тест-система *in vitro* «Тубинферон» (ООО «МонА», Москва), близкая по принципу действия Квантиферону, но употребляемая не столь широко. Тубинфероновый тест (ТИТ) при значительно меньшей стоимости, по сравнению с QFT, позволяет *in vitro* дополнительно опреде-

лять уровень поствакцинальной аллергии (ПВА), поскольку помимо пробы с антигенами ESAT-6 и CFP-10 включает пробу с традиционным туберкулином — PPD [4].

Цель исследования: сопоставление результатов ДСТ, QFT и ТИТ и пробы Манту с 2 ТЕ у детей с различными проявлениями туберкулезной инфекции, в том числе, при иммунопатологических состояниях, для уточнения их информативности и показаний к применению.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Методами QFT, ТИТ и ДСТ обследованы 50 детей, у которых имелись трудности при диагностике и дифференциальной диагностике туберкулеза. Возраст детей от 7 мес. до 15 лет: от 0 до 2 лет — 24 ребенка, 3–6 лет — 8 чел., 7–11 лет — 11 чел., с 12 до 15 лет — 7 детей. Для установления факта инфицирования детей МБТ пользовались общепринятыми во фтизиатрии критериями [6]. Вакцинацию против туберкулеза получили 47 детей (94,0 %), в том числе без формирования рубца — 8 (16,0 %), остальные 3 ребенка (6 %) не вакцинированы. Ревакцинированы БЦЖ 2 ребенка (4 %). Туберкулезный контакт (семейный, родственник) установлен у 21 ребенка (42 %), в том числе бациллярный — у 12 детей (24,0 %). Детям в условиях туберкулезного диагностического отделения проведено комплексное фтизиатрическое обследование, включающее помимо перечисленных тестов, постановку проб Манту с малыми дозами туберкули-

Таблица 1

Результаты тестов у детей, не инфицированных МБТ (n=8)

Число наблюдений	Манту 2 ТЕ	ДСТ	QFT	Тубинферон	
				ESAT-6, CFP-10	PPD
4	+	–	–	–	–
3	+	–	–	–	+
1	–	–	±	–	+

на (0,01 ТЕ и 0,001 ТЕ), рентгено-томографическое исследование с проведением МСКТ по показаниям (62% детей), УЗИ органов брюшной полости, фибробронхоскопию в показанных случаях. Всем детям проводилось стандартное бактериологическое обследование (посев на МБТ промывных вод бронхов и мочи). Бронхиальные смывы, взятые при ФБС, и ликвор, промывные воды желудка у тяжелых больных исследованы методом ПЦР и Bactec. Следует отметить, что бактериовыделение было обнаружено только у 1 ребенка в промывных водах бронхов (посев на плотную среду), и у одного — положительный результат ПЦР и Bactec из ликвора и промывных вод желудка. Кровь на QFT и ТИТ бралась одномоментно. Диаскинтест и индивидуальная диагностика проводились после тестов *in vitro*. Окончательные диагнозы были установлены после комплексного фтизиатрического обследования и динамического наблюдения: у 20 детей — клинические формы туберкулеза различной степени тяжести (среди них — 2 ребенка с сочетанной инфекцией туберкулез-ВИЧ), у 3 детей посттуберкулезные изменения во внутригрудных лимфатических узлах (кальцинаты), 7 детей — туберкулезное инфицирование с прошлых лет (ТИ), 12 — ранний период первичной туберкулезной инфекции (РПТИ), 8 — не инфицированы МБТ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

По итогам обследования **не инфицированными МБТ** признано 8 детей из 50. Среди них — 1 ребенок 4 лет и 7 детей до трех лет. Поводом для обследования у трех детей были заболевания: менингит неуточненной этиологии — 1, легочные процессы, требующие исключения туберкулеза — 2 (в том числе у 1 больного с ВИЧ-инфекцией 4-А стадии). В остальных случаях дети были направлены по результатам туберкулинодиагностики и по контакту с подозрением на туберкулез внутригрудных лимфатических узлов (ТВГЛУ). Туберкулезный контакт имел место у 3 детей: 1 ребенок — перинатальный контакт по туберкулезу и ВИЧ, 2 — разобщенные контакты по туберкулезу. Все 8 детей были привиты вакциной БЦЖ, у всех (кроме 1 ребенка, имевшего ВИЧ-инфекцию) были положительными пробы

Манту с 2 ТЕ. В результате обследования, по совокупности клинико-рентгенологических данных и лабораторных показателей, динамического наблюдения этих 8 детей данных в пользу заболевания туберкулезом и инфицирования МБТ не получено. Результаты тестов с ESAT-6 и CFP-10 были следующими: ДСТ — отрицательный у всех 8 пациентов, QFT — отрицательный у 7, сомнительный у 1 (за счет низкого положительного контроля: пробы с митогеном). Сомнительный квантифероновый тест отмечался у ребенка с менингитом неуточненной этиологии, специфический характер которого в дальнейшем был исключен в связи с быстрой нормализацией ликвора. Тубинфероновый тест (ТИТ) дал отрицательный результат по пробе с ESAT-6 и CFP-10 у всех неинфицированных больных. Проба тубинферонового теста с PPD оказалась положительной у 4 из 8 неинфицированных, свидетельствуя о наличии ПВА (табл. 1).

Детей, **тубинфицированных (ТИ)** с прошлых лет, из групп повышенного риска оказалось 7 человек из 50 обследованных. Возраст детей составил от 5 до 15 лет, преобладали дети школьного возраста. Туберкулезный контакт (очаг смерти) был у одного ребенка. Все дети были направлены в стационар для исключения локальной формы туберкулеза, дифференциальная диагностика с неспецифическими заболеваниями требовалась в 2 случаях. У двух детей имела сопутствующая хроническая неспецифическая патология легких (бронхиальная астма, постпневмонический пневмофиброз). У двух детей отмечалась гиперергическая чувствительность к туберкулину, у 1 ребенка — параспецифическая реакция (кольцевидная гранулема). Изучаемые тесты показали следующие результаты (табл. 2).

Среди 7 детей, тубинфицированных с прошлых лет, у 2 детей (с гиперергической чувствительностью к туберкулину) все 3 теста с ESAT-6 и CFP-10 (ДСТ, QFT и ТИТ) были положительны, у 2 детей — все отрицательны, но чаще всего (у 3 из 7 детей) отрицательные результаты ДСТ и QFT сочетались с положительным тестом ТИТ. У всех детей, кроме одного, отмечалась и положительная проба Тубинферон-PPD.

Таблица 2

Результаты тестов у детей, инфицированных МБТ с прошлых лет из групп риска (n=7)

Число наблюдений	Манту 2 ТЕ	ДСТ	QFT	Тубинферон	
				ESAT-6, CFP-10	PPD
2	+	+	+	+	+
1	+	–	–	–	+
1	+	–	–	–	–
3	+	–	–	+	+

Таблица 3

Результаты тестов у детей в раннем периоде первичной туберкулезной инфекции (n=12)

Число наблюдений	Манту 2 ТЕ	ДСТ	QFT	Тубинферон	
				ESAT-6, CFP-10	PPD
1	+	+	+	+	+
1	+	+	+	–	–
1	+	–	+	+	+
1	+	+	–	+	–
1	+	–	–	+	–
1	–	–	+	–	–
3	+	–	–	–	+
1	+	–	+	–	–
2	+	–	–	–	–

Ранний период первичной туберкулезной инфекции (РППТИ) или вираж диагностирован у 12 детей (три ребенка младшего школьного возраста, остальные — до 3 лет). Туберкулезный контакт отмечался у 6 детей (с больным МБТ(+)) у 4 детей). Результаты изучаемых тестов отражены в таблице 3.

Все три положительные теста (ДСТ, QFT и ТИТ) отмечались у 1 ребенка (мальчик 2 лет из очага туберкулезной инфекции с виражом и гиперергической чувствительностью к туберкулину). Все три отрицательные теста (ДСТ, QFT и ТИТ) оказались у 2 детей (также 2 лет, один из них из туберкулезного контакта, виражи с гиперергической чувствительностью к туберкулину). Обращает внимание тот факт, что ДСТ у 9 из 12 детей в РППТИ показал отрицательный результат. У этих диаскин-отрицательных пациентов в 1 случае были положительными оба теста *in vitro*, и в трех случаях один из этих тестов (QFT или ТИТ). В целом складывается впечатление, что в РППТИ пробы *in vitro* были более чувствительны по сравнению с ДСТ. У одного ребенка ран-

него возраста, при обследовании по туберкулезному контакту оказался положительным только квантифероновый тест, по которому и был диагностирован РППТИ, так как проба Манту у этого ребенка, также дала отрицательный результат.

У больных туберкулезом (20 детей от 7 мес. до 14 лет) клинические формы были следующими: туберкулез внутригрудных лимфатических узлов (ТВГЛУ) — 8, ТВГЛУ осложненного течения — 2, первичный туберкулезный комплекс (ПТК) — 2, туберкулезная интоксикация — 3, генерализованный туберкулез — 3 (в том числе — 2 в сочетании с ВИЧ), инфильтративный туберкулез и туберкулема — по одному случаю. Результаты были следующими (табл. 4).

У 9 из 20 больных детей (45,0%) все 3 изучаемых теста (ДСТ, QFT и ТИТ) были положительны, у 3 (15,0%) детей не отреагировал ТИТ при положительных ДСТ и QFT. У всех 3 детей с генерализованным туберкулезом не отреагировал ДСТ при положительных QFT или ТИТ. У 2 (11,1%) детей с доказанным туберкулезом была положительна только проба Манту с 2 ТЕ при отрицательных QFT, ТИТ и ДСТ. Так, у ребенка А., трех лет, не привитого вакциной БЦЖ, по виражу пробы Манту был выявлен ТВГЛУ в фазе начинающейся кальцинации. Все три теста с рекомбинантными антигенами были отрицательными. Таким образом, при отсутствии постановки пробы Манту с 2 ТЕ туберкулез у этого ребенка остался бы не выявленным.

У трех детей с **посттуберкулезными изменениями** (не активные кальцинаты в легочной ткани и внутригрудных лимфатических узлах) все пробы с антигенами ESAT-6 и CFP-10 дали отрицательный результат. Проба Манту с 2 ТЕ была отрицательной у 1 из трех детей с кальцинациями.

Таблица 4

Результаты тестов у детей больных туберкулезом (n=20)

Число наблюдений	Манту 2 ТЕ	ДСТ ESAT-6, и CFP-10	QFT ESAT-6, CFP-10	Тубинферон	
				ESAT-6, CFP-10	PPD
9	+	+	+	+	+
2	+	+	+	–	+
1	+	+	+	+	–
3	+	+	+	–	–
1 генерализованный ТВ	–	–	–	+(!)	–
2 генерализованный ТВ	–	–	+(!)	–	–
1 туберкулема	+	–	–	–	–
1 ТВГЛУ (без БЦЖ)	+	–	–	–	–

В целом среди 50 детей, обследованных тремя методами на основе антигенов ESAT-6 и CFP-10, процент совпадения результатов тестов составил: ДСТ и QFT — 90,0%, ДСТ и ТИТ — 74,0%, QFT и ТИТ — 68,0%; все три теста совпали в 66,0%. При расхождении ДСТ и теста с Тубинфероном (12 чел.): в 6 случаях отмечался положительный ТИТ при отрицательном ДСТ и в 6 случаях — наоборот. Первый вариант результатов тестов имел место у 5 детей инфицированных МБТ (из них 2 — в РППТИ) и одного ребенка с генерализованным туберкулезом на фоне ВИЧ. При втором варианте (положительный ДСТ при отрицательном ТИТ), напротив, у 5 детей было заболевание и у 1 — вираж.

При активной туберкулезной инфекции, у 20 больных активными формами туберкулеза положительные результаты тестов (чувствительность метода) составили: ДСТ — 80% (положительный результат у 16 детей), QFT — 85% (17 детей), ТИТ — 60% (12 детей). Проба Манту с 2 ТЕ была положительной у 18 из 20 больных детей (90%).

В группу **«латентная туберкулезная инфекция»** вошли 22 пациента: 7 детей, инфицированных с прошлых лет, 3 ребенка с неактивными кальцинациями и 12 детей в раннем периоде первичной туберкулезной инфекции. Чувствительность тестов составила: ДСТ — 22,7% (положительный результат у 5 детей), QFT — 31,8% (7 детей), ТИТ — 40,9% (9 детей). Проба Манту имела чувствительность 90,9% (положительный результат у 20 детей) при латентной туберкулезной инфекции. Вместе с тем у неинфицированных детей специфичность тестов с ESAT-6 и CFP-10 составляет 100% (отрицательных результатов), тогда как проба Манту мало информативна за счет поствакцинальной аллергии.

ВЫВОДЫ

1. Тесты на основе антигенов ESAT-6 и CFP-10: Диаскинтест, Квантиферон, Тубинферон — при высокой частоте совпадения результатов, в некоторых ситуациях могут реагировать по-разному и давать дополнительную информацию при совместном применении в сложных диагностических случаях.
2. Тесты *in vitro* (QFT и ТИТ) оказались более чувствительными при иммунопатологических состояниях по сравнению с ДСТ.
3. Тест «Тубинферон» показал большую чувствительность при латентной туберкулезной инфекции (40,9%) по сравнению с ДСТ (22,7%) и QFT (31,8%), но меньшую при развившемся туберкулезе — 60, 80 и 85 % соответственно. Все три пробы более информативны при заболевании туберкулезом, чем при латентной туберкулезной инфекции.
4. Важное достоинство теста «Тубинферон» — возможность оценки *in vitro* поствакцинальной аллергии, благодаря присутствию пробы с PPD. Это может быть использовано при дифференциальной диагностике туберкулеза и генерализованной БЦЖ-инфекции, в том числе у детей с ВИЧ.
5. У детей, не вакцинированных БЦЖ, проба Манту может быть эффективнее ДСТ.
6. Тест-система Тубинферон заслуживает широкого клинического применения, дальнейшего изучения и совершенствования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аксенова В.А., Клевно Н.И., Барышникова Л.А. и др. Выявление туберкулеза и тактика диспансерного наблюдения за лицами из групп риска с использованием рекомбинантного туберкулезного аллергена — диаскинтест: Метод. рекомендации // МЗ и СР РФ. — М., 2011. — 20 с.
2. Киселев В.И., Барановский П.М., Рудых И.В. и др. Клинические исследования нового кожного теста «диаскинтест» для диагностики туберкулеза // Туберкулез и болезни легких. — 2009. — № 2. — С. 11–16
3. Кожная проба с препаратом «Диаскинтест» — новые возможности идентификации туберкулезной инфекции / Под ред. академика РАН и РАМН М.А. Пальцева — М.: Шико, 2011. — 256 с.
4. Мордовская Л.И., Владимирский М.А., Аксенова В.А. и др. Индукция интерферона-гамма в образцах цельной крови *in vitro* — тест для определения туберкулезного инфицирования детей и подростков // Проблемы туберкулеза и болезней легких. — 2009. — № 6. — С. 19–24.
5. Овсянкина Е.С., Губкина М.Ф., Ершова Н.Г. и др. Опыт применения нового кожного теста (диаскинтеста) для диагностики туберкулеза органов дыхания у детей и подростков в туберкулезном отделении // Туберкулез и болезни легких. — 2010. — № 1. — С. 16–19.
6. Приказ Минздрава России от 21.03.2003 г. № 109 «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации».
7. Приказ Минздравсоцразвития России от 29.10.2009 г. № 855 «О внесении изменения в приложение № 4 к приказу Минздрава России от 21 марта 2003 г. № 109».
8. Слогоцкая Л.В., Кочетков Я.А., Иванова Д.А. и др. Сравнительные результаты кожного теста с препаратом, содержащим рекомбинантный белок CFP-10-ESAT-6, и лабораторного теста QUANTIFERON // Всероссийская научно-практическая конф. «Совершенствование медицинской помощи больным туберкулезом»: Материалы. — СПб., 2011. — С. 379–381.

9. Arend S., Andersen P., van Meijgaarden K. et al. Detection of active tuberculosis infection by T cell responses to early-secreted anti-genic target 6-kDa protein and culture filtrate protein 10 // J. Infect. Dis. – 2000. – Vol. 181. – P. 1850–1854.
10. Berthet F.X., Rasmussen P.B., Rosenkrands I. et al. Mycobacterium tuberculosis operon encoding ESAT-6 and novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10) // Microbiologi. – 1998. – Vol. 144 (Pt 11). – P. 3195–3203.
11. Mazurek G., Jereb J., Lobue P. et al. Guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold test for detecting Mycobacterium tuberculosis infection // United States. MMWR Recomm. Rep. – 2005. – Vol. 54. – P. 49–55.

COMPARATIVE EVALUATION OF INNOVATIVE DIAGNOSTIC TESTS FOR LATENT AND ACTIVE TB INFECTION IN CHILDREN

Lozovskaya M.E., Belushkov V.B., Gurina O.P., Vasilyeva Ye.B., Klochkova L.V.

◆ **Resume.** The results of three new tests based on antigens CFP-10 and ESAT-6 were studied in 50 children: intradermal Diaskintest and tests *in vitro* QUANTIFERON and Tubinferon.

Diaskintest and Tubinferon are developed and produced in the Russian Federation. QUANTIFERON test is performed by Cellectis (Australia). 20 children had active TB, 22 children had latent TB infection, and 8 were not infected by *M. tuberculosis*. It has been established that while the frequency of coincidence of the results is high (66 %), in some situations, tests may react differently and give additional information when used together in difficult diagnostic cases. *In vitro* tests were more sensitive compared with Diaskintest in immunopathological conditions. Tubinferon test had higher sensitivity in latent TB infection (40.9 %) compared to Diaskintest (22.7 %) and QUANTIFERON test (31.8 %), but lower sensitivity in developed tuberculosis – 60, 80 and 85 % respectively. All three tests are more informative in TB disease than in latent TB infection. An important advantage of the Tubinferon test is the ability to evaluate *in vitro* postvaccinal allergy, due to presence of the sample with the tuberculin. This can be used in the differential diagnostic between tuberculosis and generalized BCG infection, including children with HIV. Mantoux test may be more effective than Diaskintest in children who was not vaccinated with BCG. Tubinferon test system deserves wide clinical application, further study and development.

◆ **Key words:** children; TB infection; Diaskintest; QUANTIFERON; Tubinferon.

◆ Информация об авторах

Лозовская Марина Эдуардовна – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой фтизиатрии. ГБОУ ВПО СПбГПМУ Минздрава России. 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2. E-mail: lozovskaja-marina@rambler.ru.

Белушков Вячеслав Валерьевич – аспирант кафедры фтизиатрии. ГБОУ ВПО СПбГПМУ Минздрава России. 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2. E-mail: belushkov@inbox.ru.

Гурина Ольга Петровна – канд. мед. наук, старший научный сотрудник, заведующая лабораторией клинической иммунологии научно-исследовательского центра. ГБОУ ВПО СПбГПМУ Минздрава России. 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2. E-mail: ol.gurina.@yandex.ru.

Васильева Елена Борисовна – канд. мед. наук, доцент, кафедра фтизиатрии. ГБОУ ВПО СПбГПМУ Минздрава России. 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2. E-mail: helenchern27@mail.ru.

Клочкова Людмила Владимировна – канд. мед. наук, доцент, кафедра фтизиатрии. ГБОУ ВПО СПбГПМУ Минздрава России. 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2. E-mail: lklochkova@yahoo.com.

Lozovskaya Marina Eduardovna – MD, PhD, Dr Med Sci, Professor, Head of Department of Phthiisiatry. Saint-Petersburg State Pediatric Medical University. 2, Litovskaya St., St. Petersburg, 194100, Russia. E-mail: lozovskaja-marina@rambler.ru.

Belushkov Vyacheslav Valeryevich – Postgraduate Student of Department of Phthiisiatry. Saint-Petersburg State Pediatric Medical University. 2, Litovskaya St., St. Petersburg, 194100, Russia. E-mail: belushkov@inbox.ru.

Gurina Olga Petrovna – MD, PhD, Senior Researcher, Head of the Laboratory of Clinical Immunology Research Center. Saint-Petersburg State Pediatric Medical University. 2, Litovskaya St., St. Petersburg, 194100, Russia. E-mail: ol.gurina.@yandex.ru.

Vasilyeva Yelena Borisovna – MD, PhD, Associate Professor, Department of Phthiisiatry. Saint-Petersburg State Pediatric Medical University. 2, Litovskaya St., St. Petersburg, 194100, Russia. E-mail: helenchern27@mail.ru.

Klochkova Lyudmila Vladimirovna – MD, PhD, Associate Professor, Department of Phthiisiatry. Saint-Petersburg State Pediatric Medical University. 2, Litovskaya St., St. Petersburg, 194100, Russia. E-mail: lklochkova@yahoo.com.