

Новые рекомбинантные антигены *T. pallidum* Tr0453 и Tr0319 в диагностике сифилиса

А.В. Рунина, Р.Ф. Хайруллин, К.В. Рог, В.И. Семина, С.В. Ротанов

ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» Минздрава России
107076, Москва, ул. Короленко, д. 3, стр. 6

С использованием методов геной инженерии разработана технология получения рекомбинантного варианта нового целевого белка *T. pallidum* Tr0319 для серологической диагностики сифилиса. В результате проведенных работ получен гомогенный (по данным денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле) рекомбинантный вариант белка *T. pallidum* Tr0319. Молекулярная масса рекомбинантного белка *T. pallidum* Tr0319, определенная по электрофоретической подвижности, составила около 37 кД, что хорошо согласуется с молекулярной массой фрагмента белка Tr0319 без сигнального пептида, рассчитанной по аминокислотной последовательности (37,3 кД). В соответствии с разработанной технологией были получены очищенные рекомбинантные белки *T. pallidum* Tr0319 и Tr0453. Эти белки были использованы в качестве антигенов в составе твердофазного иммуносорбента для выявления специфических IgG к исследуемому белку в сыворотке крови больных с разными формами приобретенного сифилиса. Применение полученного рекомбинантного белка позволило выявить антитела к *T. pallidum* в сыворотке крови больных сифилисом (первичным, вторичным, скрытым ранним и поздним). При исследовании образцов сыворотки крови, полученных от здоровых доноров, антитела не обнаруживались. Результаты проведенных исследований позволяют сделать вывод о возможности использования полученного рекомбинантного белка Tr0319 в качестве дополнительного антигена при диагностике сифилиса. Включение нового антигена в состав иммуносорбента тест-систем для диагностики сифилиса (в формате иммуноферментного анализа, иммуноблотинга или иммуночипа) расширяет возможности серологической диагностики данного заболевания за счет увеличения спектра определяемых антител к *T. pallidum*.

Ключевые слова: антигены *T. pallidum*, сифилис, рекомбинантные белки, Tr0453, Tr0319.

Контактная информация: runina@snikvi.ru. Вестник дерматологии и венерологии 2014; (3): 72—78.

New recombinant *T. pallidum* antigens Tp0453 and Tp0319 in the diagnostics of syphilis

A.V. Runina, R.F. Khairullin, K.V. Rog, V.I. Semina, S.V. Rotanov

State Research Center of Dermatovenereology and Cosmetology, Ministry of healthcare of the Russian Federation
Korolenko str., 3, bldg 6, Moscow, 107076, Russia

A new technology for obtaining a recombinant version of a new dedicated protein *T. pallidum* Tp0319 for the serological diagnostics of syphilis was gene engineered. As a result, a homogeneous (according to denaturing polyacrylamide gel electrophoresis) recombinant version of *T. pallidum* Tp0319 protein was obtained. The molecular mass of recombinant *T. pallidum* Tp0319 protein according to electrophoretic mobility is about 37 kDa, which corresponds to the molecular mass of a fragment of Tp0319 protein without a signal peptide calculated based on the amino-acid sequence (37.3 kDa).

According to the developed technology, purified recombinant *T. pallidum* Tp0319 and Tp0453 proteins were obtained. The proteins were used as antigens as a part of a solid-phase immunoabsorbent for detecting specific IgG to the study protein in the serum of patients suffering from different types of acquired syphilis. The use of the resulting recombinant protein enabled the authors to reveal *T. pallidum* antibodies in the blood serum in patients suffering from syphilis (primary, secondary, latent early and late stage syphilis). The examination of blood serum samples taken from healthy donors revealed no antibodies.

Based on the study results, it is possible to make a conclusion about the possibility to use the resulting recombinant protein (Tp0319) as an extra antigen for diagnostics of syphilis. The introduction of the new antigen in the immunoabsorbent for test systems used for diagnosing syphilis (in the form of immune-enzyme assay, immunoblotting or immune chips) expands the potential of serological diagnostics of this disease due to the expansion of the range of *T. pallidum* antibodies to be revealed.

Key words: *T. pallidum* antigens, syphilis, recombinant proteins, Tp0453, Tp0319.

Corresponding author: runina@cnikvi.ru. Vestnik Dermatologii i Venerologii 2014; 3: 72—78.

■ Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» на период 2012—2014 гг. Раздел I. Выполнение фундаментальных научных исследований. Наименование темы: «Поиск новых диагностически значимых антигенов возбудителя сифилитической инфекции» (Государственный контракт 114/БУ-2012-051 от 16.01.2012 г.).

Несмотря на разработку и применение эффективных антимикробных препаратов и успехи, достигнутые в борьбе с распространением сифилитической инфекции, уровень заболеваемости сифилиса остается высоким. По данным за 2013 г., средняя заболеваемость сифилисом в России в десятки раз выше, чем в Европе. Известно, что наличие сопутствующей сифилитической инфекции значительно повышает риск передачи ВИЧ вследствие повреждения кожи и слизистых оболочек половых органов эрозивными и язвенными поражениями.

Важнейшими методами диагностики сифилитической инфекции являются серологические методы, основанные на выявлении реактивных и антитрепонемных антител. В настоящее время наряду с развитием технологии получения рекомбинантных форм антигенов *Treponema pallidum* применяются суммарные антигенные препараты близкородственного вида *T. phagedenis* штамм Рейтер (ранее причисляемого к виду *T. pallidum* штамм Рейтер). Ввиду возможности культивирования на искусственных средах и наличия общих антигенных эпитопов штаммы *T. phagedenis* Рейтер применяются при производстве наборов реагентов для диагностики сифилиса.

Получение нативных белков *T. pallidum* в промышленных масштабах ограничивается невозможностью культивирования возбудителя сифилиса на искусственных средах. Получение белков *T. pallidum* путем культивирования возбудителя на лабораторных животных с последующей очисткой дает низкий выход целевого белка. Применение технологии получения рекомбинантных аналогов целевых белков *T. pallidum* позволяет преодолеть трудности с культивированием микроорганизма, сложной и многоступенчатой процедуры выделения и очистки природных целевых антигенов возбудителя сифилиса. Для получения функционально-активных рекомбинантных аналогов белков *T. pallidum* в качестве штаммов-продуцентов применяются близкородственные культивируемые виды, например *T. denticola* [1], *T. phagedenis* [2]. Такой подход оправдан в случае необходимости сохранения нативного фолдинга исследуемых белков, особенно это важно при исследовании ферментов возбудителя. При получении белковых антигенов для производства тест-систем чаще всего применяют экспрессию в клетках *E. coli*. Для облегчения дальнейшей очистки целевого рекомбинантного антигена от примесных белков

в последовательность вводят «тэг» — последовательность, обеспечивающую специфическую сорбцию на хроматографическом носителе.

В ФГБУ «ГНЦДК Минздрава России в рамках научной работы по разработке новых целевых антигенов возбудителя сифилиса проводятся исследования поверхностных белков. С целью определения поверхностных белков *T. pallidum* был проведен биоинформатический анализ антигенов, выявленных в ходе сравнительного анализа данных научной литературы, полученных в ходе выполнения протеомных исследований по серологическому скринингу иммунной активности компонентов рекомбинантных экспрессионных библиотек, и нативных белков *T. pallidum*, разделенных методом двумерного электрофореза [3]. В результате анализа были определены целевые антигены возбудителя сифилиса для определения их антигенных свойств *in vivo*.

В настоящей работе проводилось изучение антигенных свойств белков *T. pallidum* Tr0453 и Tr0319. Белок Tr0453 является гипотетическим белком наружной мембраны возбудителя сифилиса, с рассчитанной молекулярной массой белка около 31,9 кД. Данный белок представляет интерес для серодиагностики сифилиса в связи с предполагаемой локализацией на наружной мембране возбудителя [3, 4], высокой иммуногенностью и отсутствием гомологов среди бактерий других родов. Белок Tr0319 (TnpC, PnrA) — мембранный липопротеин *T. pallidum*, предположительно ABC-транспортный белок с рассчитанной молекулярной массой около 37,7 кД. Предположительно данный липопротеин является заякоренным во внутренней мембране посредством липидной части молекулы. В качестве системы гетерологической экспрессии рекомбинантных белков *T. pallidum* в нашей работе был выбран штамм *E. coli* BL21 (DE3) с экспрессионной плазмидой *pET28a*, позволяющей проводить экспрессию целевых антигенов под контролем T7 промотора.

Цель работы: получение новых рекомбинантных антигенов *T. pallidum* и изучение клинической эффективности их использования при диагностике сифилиса.

Материал и методы

В работе использовали клетки *E. coli*, штаммы BL21 (DE3) и Top10 («Invitrogen», США), плазмидный вектор для экспрессии *pET28a* («Novagen», США). Чистоту получаемых белков определяли электрофоретически в денатурирующих условиях с додецилсульфатом натрия в 12% полиакриламидном геле по Лэмбли [5]. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорд [6].

Для определения антигенных свойств рекомбинантных белков использовались образцы сыворотки крови больных с диагнозом «сифилис», поступивших в Лабораторный центр ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России. Биообразцы отбирались на основе результатов

серологических исследований, регламентированных действующими нормативными документами: реакции микропреципитации с кардиолипновым антигеном (РМП), быстрого плазмареагинового теста (RPR), реакции пассивной гемагглютинации (РПГА), реакции непрямой иммунофлюоресценции (модификации РИФ_{abc} и РИФ₂₀₀), иммуноферментного анализа (ИФА).

Конструирование штаммов-продуцента. Для получения продуцента белка Тр0453 применяли методику, описанную в предыдущей работе [7]. Конструирование продуцента *E. coli* BL-21 (DE3) [pET28a-Тр0319] проводилось по аналогичной методике.

Фрагмент гена *tp0319*, кодирующего последовательность белка Тр0319 без сигнального пептида, соответствующего аминокислотным остаткам 24—353, амплифицировали с помощью праймеров, сконструированных на основе последовательности гена *tp0319* (Gene ID: 2611484). Для амплификации были разработаны праймеры: Тр0319_F_NdeI и Тр0319_R_BamHI (таблица), которые содержали на 5'-конце сайты распознавания эндонуклеаз рестрикции NdeI и BamHI соответственно (выделены полужирным шрифтом, см. таблицу). Амплификация проводилась с использованием высокоточной полимеразы *Pfu* («Fermentas», Латвия) по следующей программе: 95 °С — 5 мин. (95 °С — 30 с., 59 °С — 30 с., 72 °С — 5 мин.) 45 циклов; 72 °С — 7 мин.

Продукты ПЦР очищали от компонентов реакционной среды с помощью агарозного гель-электрофореза с последующим выделением целевого продукта с применением набора *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, США). Амплифицированные фрагменты гена *tp0319* гидролизировали эндонуклеазами NdeI и BamHI в двукратном Tango буфере и лигировали с плазмидой pET28a (Novagen, США), предварительно гидролизованной теми же эндонуклеазами. После гидролиза фрагменты и вектор проходили очистку с применением набора реагентов *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, США) и лигировались (лигаза Fermentas, Латвия).

Компетентные клетки *E. coli* штамма TOP10 трансформировали лигазной смесью и высевали на агаризованную среду LB, содержащую 50 мкг/мл канамицина. Наличие гена *tp0319* в выросших на поверхности агаризованной среды трансформированных клетках под-

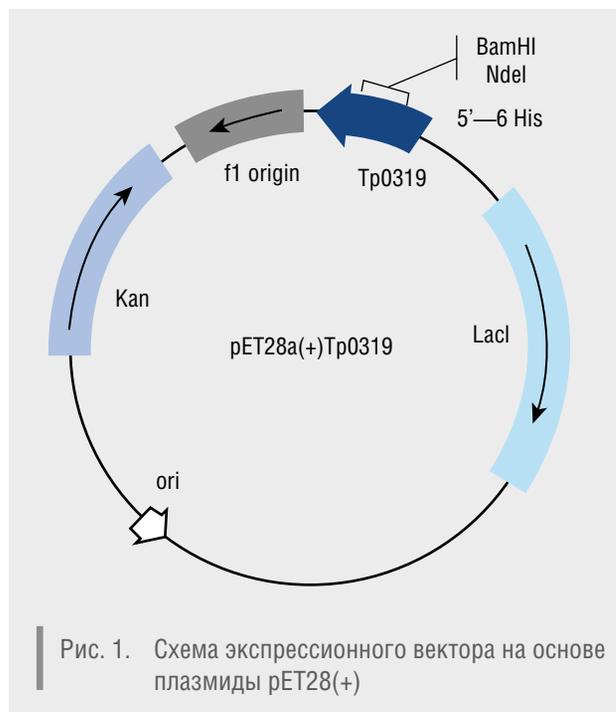


Рис. 1. Схема экспрессионного вектора на основе плазмиды pET28(+)

тверждали амплификацией сайтов встраивания вставки с использованием пар праймеров Т7_F/Тр0319_R_BamHI и Тр0319_F_NdeI/Т7_R (см. таблицу). Схема экспрессионного вектора, сконструированного на основе плазмиды pET28(+), приведена на рис. 1.

Колонию *E. coli* с подтвержденным секвенированием ДНК плазмиды наличием целевого фрагмента гена *tp0319* инокулировали в 10 мл среды LB, содержащей 50 мкг/мл канамицина, и культивировали при 37 °С и непрерывном перемешивании на шейкере в течение 12 ч. Из полученной биомассы плазмидную ДНК выделяли с применением набора *Plasmid Miniprep* («Evrogen», Россия). Данной генетической конструкцией трансформировали клетки штамма *E. coli* BL-21(DE3) («Novagen», США) с целью дальнейшего получения целевого белка.

Выделение и очистка рекомбинантного белка Тр0319. Продукт *E. coli* BL-21(DE3)-Тр0319 пересеивали в 5 мл среды LB, содержащей 50 мкг/мл канами-

Таблица

Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе

Праймер	Последовательность 5'—3'
Тр0319_F_NdeI	TAT CATATGG ACAGGCCGCGAGATGGGAAAC
Тр0319_R_BamHI	TTT GGATCCT TAGTTCATCATCGCTGCAGAT
T7_F	ATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTG
T7_R	GTTATGCTAGTTATTGCTCAGCGGT

цина, и проводили двенадцатичасовое культивирование. После культивирования 5 мл ночной культуры пересевали в 500 мл среды LB, содержащей 50 мкг/мл канамицина. Культивирование проводили при 37 °С и непрерывном перемешивании в термостатируемой шейкере в течение 3 ч. до $A_{600} \approx 0,8-0,9$. Индукция биосинтеза рекомбинантного белка производилась добавлением изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (IPTG) до конечной концентрации 1 мМ при 37 °С и непрерывном перемешивании на шейкере в течение 3 ч.

Биомассу штамма-продуцента отделяли от культуральной жидкости центрифугированием при 3000 об/мин в течение 20 мин. при 4 °С. Супернатант сливали, осадки объединяли, ресуспендировали в малом объеме буфера и повторно центрифугировали при 3000 об/мин в течение 20 мин. Биомассу использовали немедленно для выделения суммарного белкового препарата или хранили до использования при -20 °С.

Для разрушения клетки (3 г) ресуспендировали в 4-кратном объеме 50 мМ натрий-фосфатного буфера pH 7,4, содержащего 0,5 М NaCl (буфер А) и ингибиторы протеаз (Sigma, США). Бактериальную биомассу предварительно обрабатывали лизоцимом в конечной концентрации 1 мг/мл и инкубировали при помешивании при комнатной температуре в течение 1 ч. Суспензию обрабатывали ультразвуком (5 x 1 мин.) на ультразвуковом дезинтеграторе Sonics VCX-130PB. Полученный гомогенат центрифугировали при 14 000 об/мин в течение 30 мин. при 4 °С. Супернатант отбирали и фильтровали через насадки Millex с диаметром пор 0,22 мкм. Наличие целевого белка определяли с помощью денатурирующего полиакриламидного гель-электрофореза в 12% полиакриламидном геле.

Очистку исследуемого рекомбинантного антигена возбудителя сифилиса проводили методом металл-хеллатной хроматографии. Для этого осветленную пробу наносили на хроматографическую колонку с 5 мл Ni-NTA-агарозы (GE Healthcare, США), уравновешенной с буфером А. Промывали колонку этим буфером до $A_{280} = 0$. Элюирование осуществляли линейным градиентом имидазола 0—250 мМ со скоростью 2 мл/ч в буфере А, объем фракций — 1 мл. Наличие целевого белка во фракциях элюата определяли с помощью денатурирующего электрофореза в 12% полиакриламидном геле. Фракции, которые содержали целевой белок, объединяли, диализовали против буфера А и концентрировали до объема 1 мл в ячейках для ультрафильтрации Amicon Ultra-4 Ultracel 10k с пределом исключения 10 кД. Полученный раствор повторно очищали на колонке с Ni-NTA-агарозой. Промывали колонку этим буфером до $A_{280} = 0$. Элюирование связанного белка Tr0319 осуществляли линейным градиентом имидазола 0—250 мМ со скоростью 2 мл/ч в буфере А, объем фракций — 1,5 мл. Наличие целевого белка во фракциях элюата определяли с помощью денатурирующего электрофореза в 12% полиакриламидном геле.

Фракции, в которых было подтверждено содержание целевого белка, вновь объединяли, диализовали против буфера 50 мМ натрий-фосфатного буфера pH 7,4 и концентрировали до объема 2 мл в ячейках для ультрафильтрации Amicon Ultra-4 Ultracel 10k с пределом исключения 10 кД.

Исследование антигенных свойств рекомбинантных белков Tr0453 и Tr0319

Для исследования антигенных свойств рекомбинантных белков Tr0453 и Tr0319 применили метод ИФА. Для изготовления иммуносорбента применяли 96-луночный полистироловый планшет высокой сорбции (NUNC, Дания). В каждую лунку планшета нанесли 100 мкл раствора исследуемого антигена (в концентрации 1 мг/мл). Планшет накрыли крышкой и инкубировали в течение 12 ч. при +4 °С. Блокировку неспецифических участков связывания на иммуносорбенте проводили 5% раствором сухого обезжиренного молока (Sigma, США). Полученный иммуносорбент до проведения исследования хранили при +4 °С.

Перед исследованием образцы сыворотки разводили в 10 раз в фосфатно-солевом буфере (PBS) с 0,05% Tween-20 и 0,1% бычьего сывороточного альбумина (BSA). В каждую лунку добавляли по 100 мкл исследуемых образцов сыворотки. Планшет заклеивали и проводили инкубацию в течение 1 ч. при 37 °С на термостатирующей шейкере. После инкубации планшет отмывали раствором PBS-T 3 раза. В каждую лунку вносили по 100 мкл рабочего раствора конъюгата в разведении 1:10 000 в PBS с 0,05% Tween-20 и 0,1% BSA. Планшет заклеивали и инкубировали 1 ч. при 37 °С на термостатирующей шейкере. После инкубации с конъюгатом планшет отмывали раствором PBS-T 3 раза. В каждую лунку добавляли по 100 мкл хромогена тетраметилбензидина в субстратном буфере («Вектор-Бест», Россия). Планшет инкубировали в темноте 30 мин. при 37 °С. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл/лунка 0,1 М HCl. Конечный результат оценивали по оптической плотности содержимого лунки при 450 нм.

Результаты и обсуждение

В результате проведенной работы была разработана методика экспрессии, выделения и очистки рекомбинантного аналога белка возбудителя сифилиса Tr0319. Молекулярная масса рекомбинантного белка *T. pallidum* Tr0319, определенная по электрофоретической подвижности, составила около 37 кД, что хорошо согласуется с молекулярной массой фрагмента белка Tr0319 без сигнального пептида, рассчитанной по аминокислотной последовательности (37,3 кД).

Для получения препаративного количества и дальнейшего изучения иммуногенности была проведена гетерологическая экспрессия целевых рекомбинантных белков Tr0319 и Tr0453. Очищенные реком-

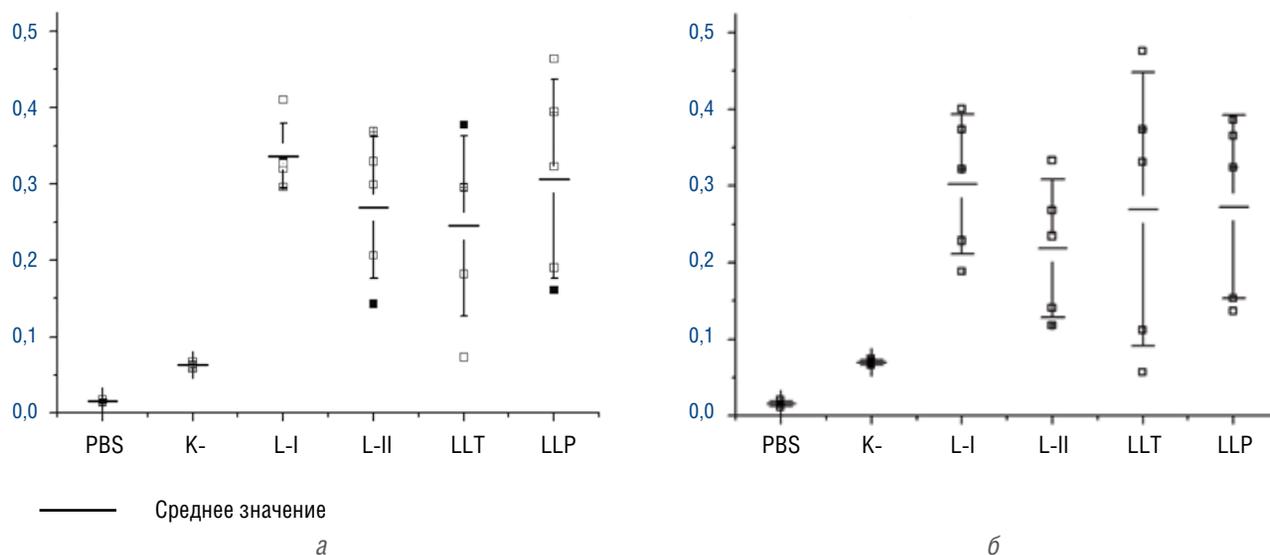


Рис. 2. Реактивность сыворотки, полученной от больных на различных стадиях сифилиса к рекомбинантным белкам Tr0319 (а) и Tr0453 (б): PBS — фосфатно-солевой буфер; K- — контрольные образцы, L-I (Lues I) — сифилис первичный; L-II (Lues II) — сифилис вторичный; LLT (Lues latens tarda) — сифилис скрытый ранний; LLP (Lues latens praecox) — сифилис скрытый поздний

бинантные белки *T. pallidum* Tr0319 и Tr0453 были использованы в качестве антигенов для выявления специфических IgG в сыворотке больных сифилисом с применением твердофазного ИФА. Для исследования антигенных свойств рекомбинантных белков Tr0319 и Tr0453 путем определения соответствующих антител к ним в крови больных сифилисом были использованы образцы сыворотки крови, полученные от больных разными клиническими формами сифилиса: первичным (5 образцов), вторичным (5), скрытым ранним (5) и поздним (5). В качестве группы контроля применяли сыворотку крови (5 образцов) от здоровых доноров, не имевших в анамнезе указаний на заболевание сифилисом и показавших отрицательные результаты исследования в регламентированных серологических тестах на сифилис.

Результаты ИФА показали, что значение оптической плотности для образцов сыворотки, полученной от больных сифилисом, достоверно превышает показатель оптической плотности реакции с сывороткой здоровых доноров, как в случае белка Tr0319 (рис. 2а), так и в случае белка Tr0453 (рис. 2б).

Предварительное исследование наличия специфических антител к белкам Tr0319 и Tr0453 показало, что полученные рекомбинантные белки специфически реагируют со всеми образцами сыворотки крови, полученными от больных сифилисом первичным,

вторичным, скрытым ранним и поздним, что свидетельствует о высокой клинической чувствительности исследования. При изучении сыворотки крови, полученной от здоровых доноров, антитела не были обнаружены, что характеризует исследование с позиции высокой клинической специфичности.

Заключение

Применение технологии рекомбинантных белков позволяет изучать белковую структуру некультивируемых микроорганизмов как с позиции их антигенных свойств, так и в свете их функциональной роли в патогенезе заболевания. На основании приведенных данных можно сделать вывод о перспективности использования полученных рекомбинантных белков в качестве антигенов для иммуносерологических исследований, предназначенных для диагностики сифилиса.

Остается актуальным расширение спектра изучаемых антигенов *T. pallidum* с целью совершенствования диагностики сифилиса. Для уточнения антигенных свойств целевых белков *T. pallidum* необходимо провести исследования на большем количестве образцов сыворотки с учетом возможной иммунологической кросс-реактивности в случаях инфекционных заболеваний, вызванных другими представителями рода спирохет (боррелиями, лептоспирами). ■

Литература

1. Chi B., Chauhan S., Kuramitsu H.; Development of a System for Expressing Heterologous Genes in the Oral Spirochete *Treponema denticola* and Its Use in Expression of the *Treponema pallidum* flaA Gene. *Inf immun* 1999; 67 (7): 3653—3656.
2. Cameron C.E., Kuroiwa J.M., Yamada M., Francescutti T., Chi B., Kuramitsu H.K. Heterologous expression of the *Treponema pallidum* laminin-binding adhesin Tp0751 in the culturable spirochete *Treponema phagedenis*. *J bacteriol* 2008; 190 (7): 2565—2571.
3. Khairullin R.F., Rotanov S.V., Frigo N.V., Belousova A.V. Bioinformatic analysis of *T. pallidum* specific antigens *Vestn Dermatol Venerol* 2012; 5: 56—64. [Хайруллин Р.Ф., Ротанов С.В., Фриго Н.В., Белоусова А.В.; Биоинформатический анализ специфических антигенов *T. pallidum*. *Вестн дерматол и венерол* 2012; (5): 56—64.]
4. Cox D.L., Luthra A., Dunham-Ems S., Desrosiers D.C., Salazar J.C., Caimano M.J., Radolf J.D. Surface immunolabeling and consensus computational framework to identify candidate rare outer membrane proteins of *Treponema pallidum*. *Inf immun* 2010; 78 (12): 5178—5194.
5. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature* 1970; 227 (5259): 680—685.
6. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 1976; 72 (1): 248—254.
7. Khairullin R.F., Runina A.V., Rog K.V., Frigo N.V., Rotanov S.V. Production and evaluation of the clinical efficacy of the recombinant *T. pallidum* antigen Tp0453 for syphilis diagnosis. *Vestn Dermatol Venerol* 2013; 6: 73—79. [Хайруллин Р.Ф., Рунина А.В., Рог К.В., Фриго Н.В., Ротанов С.В.; Получение и оценка клинической эффективности рекомбинантного антигена *T. pallidum* Tp0453 для диагностики сифилиса. *Вестн дерматол и венерол* 2013; (6): 73—79.]

об авторах: ▶

А.В. Рунина — научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ИППП и дерматозов ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва

Р.Ф. Хайруллин — к.х.н., старший научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ИППП и дерматозов ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва

К.В. Рог — младший научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ИППП и дерматозов ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва

В.И. Семина — младший научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ИППП и дерматозов ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва

С.В. Ротанов — д.м.н., доцент, врач Лабораторного центра ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье