

3. Beres S.B., Musser J.M. Contribution of exogenous genetic elements to the group A *Streptococcus* metagenome. *PLoS One*. 2007, 2 (8): e800.
4. Carapetis J.R., Steer A.C., Mulholland E.K. et al. The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infectious Diseases*. 2005, 5 (11): 685-694.
5. Elliot J.A., Farmer K.D., Facklam R.R. Sudden increase in isolation of group B streptococci, serotype V, is not due to emergence of a new pulsed-field gel electrophoresis type. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36: 2115-2116.
6. Feng L.J., Lin H.R., Ma Y.L. et al. Macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* from Chinese pediatric patients in association with Tn916 transposons family over a 16-year period. *Diagnostic Microbiology Infectious Disease*. 2010, 67 (4): 369-375.
7. Guy R., Williams C., Irvine N. et al. Increase in scarlet fever notifications in the United Kingdom, 2013/14. *Eurosurveillance*. 2014, 19 (12): 20749.
8. Ip M., Lyon D.J., Leung T. et al. Macrolide resistance and distribution of *erm* and *mef* genes among beta-haemolytic streptococci in Hong Kong. *European J. Clinical Microbiology Infectious Diseases*. 2002, 21 (3): 238-240.
9. Kataja J., Huovinen P., Seppala H. Macrolide resistance study G. Erythromycin resistance genes in group A streptococci of different geographical origins. *J. Antimicrobial Chemotherapy*. 2000, 46 (5): 789-792.
10. Luk E.Y., Lo J.Y., Li A.Z. et al. Scarlet fever epidemic, Hong Kong, 2011. *Emerging Infectious Diseases*. 2012, 18 (10): 1658-1661.
11. Olivieri R., Morandi M., Zanchi A. et al. Evolution of macrolide resistance in *Streptococcus pyogenes* over 14 years in an area of central Italy. *J. Medical Microbiology*. 2015, 64: 1186-1195.
12. ProMED-Mail (2009, June 20). *Streptococcus, group A, scarlet fever — Vietnam*. Retrieved December 06, 2015.
13. Tse H., Bao J.Y.J., Davies M.R. et al. Molecular characterization of the 2011 Hong Kong Scarlet Fever Outbreak. *J. Infectious Diseases*. 2012, 206 (3): 341-351.
14. Varaldo P.E., Montanari M.P., Giovanetti E. Genetic elements responsible for erythromycin resistance in streptococci, *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 2009, 53: 343-353.
15. Yan J.J., Wu H.M., Huang A.H. et al. Prevalence of polyclonal *mefA*-containing isolates among erythromycin-resistant group A streptococci in southern Taiwan. *J. Clinical Microbiology*. 2000, 38 (7): 2475-2479.

*Поступила 05.11.17.*

Контактная информация: Киреева Александра Геннадьевна,  
197376, Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, 12, р.т. (812)234-05-42

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*А.Е.Платонов<sup>1</sup>, J.Koetsveld<sup>2</sup>, Н.М.Колясникова<sup>1,3</sup>, О.А.Стуколова<sup>1</sup>,  
А.С.Долгова<sup>1</sup>, М.Г.Топоркова<sup>4</sup>, Д.С.Сарксян<sup>5</sup>*

## **ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НЕЙТРОФИЛОВ ЧЕЛОВЕКА С *VORRELIA MIYAMOTOI*, ВОЗБУДИТЕЛЕМ ИКСОДОВОГО КЛЕЩЕВОГО БОРРЕЛИОЗА**

<sup>1</sup>Центральный НИИ эпидемиологии, Москва; <sup>2</sup>Academic Medical Centre, University of Amsterdam, Netherlands; <sup>3</sup>Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П.Чумакова, Москва; <sup>4</sup>ООО МО Новая больница, Екатеринбург; <sup>5</sup>Ижевская государственная медицинская академия

*Цель.* Исследованы последствия инкубации *Vorrelia miyamotoi* с нейтрофилами. *Материалы и методы.* Спирахеты *V. miyamotoi* штамма НТ31 инкубировали 3 часа при 37°C с нейтрофилами здоровых доноров (5\*10<sup>6</sup> клеток/мл) в пропорции 1:1. Среда инкубации содержала также неиммунную сыворотку крови здоровых доноров (СЗД) и в ряде экспериментов высокоиммунную сыворотку крови переболевших ИКБ-БМ (С-ИКБ-БМ). Методом темнопольной микроскопии оценивали долю нейтрофилов, связавших боррелии, а также количество и жизнеспособность (подвижность) свободных боррелий. *Результаты.*

В СЗД или С-ИКБ-БМ, инактивированной нагреванием, свободно плавающие боррелии остаются жизнеспособными, но около 10% боррелий оказывается связанными с нейтрофилами. В С-ИКБ-БМ с нейтрофилами доля свободных жизнеспособных боррелий снижается приблизительно на 10% по сравнению с С-ИКБ-БМ без нейтрофилов, еще около 15% связывается нейтрофилами. При добавлении хемоаттрактанта fMLP доля нейтрофилов, связавших боррелии, возрастает до 25%, а доля иммобилизованных не связанных боррелий достигает 40%. *Заключение.* Хотя нейтрофилы способны уничтожать боррелии при контакте или без контакта с ними, в модельных условиях совместное действие высокоиммунной сыворотки крови и нейтрофилов человека не обеспечивает 100% элиминации *B. miyamotoi*.

Журн. микробиол., 2018, № 2, С. 30—38

Ключевые слова: иксодовый клещевой боррелиоз, *Borrelia miyamotoi*, нейтрофилы, *in vitro*, антитела, система комплемента

*A.E. Platonov<sup>1</sup>, J. Koetsveld<sup>2</sup>, N.M. Kolyasnikova<sup>1,3</sup>, O.A. Stukolova<sup>1</sup>, A.S. Dolgova<sup>1</sup>, M.G. Toporkova<sup>4</sup>, D.S. Sarksyanyan<sup>5</sup>*

## **BACTERICIDAL EFFECT OF HUMAN SERUM ON *BORRELIA MIYAMOTOI*, CAUSATIVE AGENT OF IXODES TICK-BORNE BORRELIOSIS**

<sup>1</sup>Central Research Institute of Epidemiology, Moscow; <sup>2</sup>Academic Medical Centre, University of Amsterdam, Netherlands; <sup>3</sup>Chumakov Federal Scientific Centre for Research and Development of Immunobiological Products, Moscow; <sup>4</sup>Medical Association «New Hospital», Ekaterinburg; <sup>5</sup>Izhevsk State Medical Academy, Russia

*Aim.* In this paper we investigate the impacts of co-incubation of *Borrelia miyamotoi* with neutrophils. *Materials and methods.* Spirochetes *B. miyamotoi*, strain HT31, were incubated 3 hours at 37°C with neutrophils of healthy donors ( $5 \times 10^6$  cells/ml) in a 1:1 ratio. The incubation medium contained also non-immune serum of healthy blood donors (SHD) and, in some experiments, high-immune serum of patients recovered from ITBB-BM (S-ITBB-BM). The proportion of neutrophils that bound borrelia, as well as the number and viability (mobility) of free borrelia, was estimated by dark-field microscopy. *Results.* Free-swimming borrelia remain viable in SHD or heat-inactivated S-ITBB-BM, but about 10% of borrelia are associated with neutrophils. In S-ITBB-BM with neutrophils, the proportion of viable borrelia among free ones decreases by approximately 10% compared to S-ITBB-BM without neutrophils; in addition about 15% of borrelia become bound by neutrophils. If chemoattractant fMLP was added, the proportion of neutrophils binding borrelia increases to 25%, and the proportion of immobilized non-bound borrelia reaches 40%. *Conclusion.* Although neutrophils are able to destroy borrelia with or without direct contact, under model conditions the combined effect of blood neutrophils and high-immune human serum does not provide 100% elimination of *B. miyamotoi*.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No.2, P. 30—38

Key words: Ixodes tick-borne borreliosis, *Borrelia miyamotoi*, neutrophils, *in vitro*, antibodies, complement system

## **ВВЕДЕНИЕ**

Классический иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ) — это болезнь Лайма (БЛ), вызываемая спирохетами *Borrelia burgdorferi sensu lato*, переносимыми «твердыми» клещами рода *Ixodes*. «Мягкие» клещи рода *Ornithodoros*, встречающиеся преимущественно в зонах теплого и жаркого климата, переносят иные виды боррелий (*B. hermsii*, *B. duttonii* и др.), вызывающих клещевые возвратные лихорадки (КВЛ) [4]. Несмотря на широкое распространение БЛ

и КВЛ, поражающих миллионы людей ежегодно, взаимодействие нейтрофилов, моноцитов/макрофагов и других клеток иммунной системы с патогенными боррелиями изучено недостаточно. Известно, что боррелии могут быть фагоцитированы, в той или иной степени они вызывают дегрануляцию нейтрофилов, выделение активных форм кислорода, продукцию цитокинов и иных биологически активных соединений [14, 20]. Истощение фагоцитирующих макрофагов, дендритных клеток, нейтрофилов приводит к развитию высокой спирохетемии после подкожной инъекции *B. hermsii* или *B. duttonii* мышам, возможна гибель животных [4, 22]. С другой стороны, утверждается, что Т-независимая продукция специфических IgM необходима и достаточна для защиты мышей от КВЛ [11]. Роль фагоцитов в защите от локализованной и генерализованной форм БЛ также неясна. Возможно, нейтрофилы и макрофаги не способны в полной мере реализовать свои протективные функции, поскольку многие патогенные боррелии экспрессируют белки, угнетающие фагоцитоз, например OspB и OspC [10, 12].

Иксодовый клещевой боррелиоз, вызванный *Borrelia miyamotoi* (ИКБ-БМ) — новое инфекционное заболевание, открытое в 2003 — 2009 гг. и клинически более близкое к КВЛ, чем к БЛ [1, 8, 15]. На стадии реконвалесценции ИКБ-БМ (7 — 21 день заболевания) наблюдается продукция специфических IgM к переменным основным липопротеинам наружной мембраны *B. miyamotoi* — variable major lipoproteins (VMPs), разделяемым на два семейства: variable small lipoproteins (Vsp) и variable large lipoproteins (Vlp); Vlp, в свою очередь, разделяются на подсемейства Alpha, Gamma и Delta [9, 21]. Антитела к VMPs, как было показано в работе [7], обладают комплемент-зависимым бактерицидным действием на *B. miyamotoi*, но не обеспечивают, по крайней мере *in vitro*, гибели 100% спирохет. Об участии фагоцитов в борьбе с инфекцией *B. miyamotoi* на ранней стадии заболевания и во время реконвалесценции ничего не известно. В данной работе рассматриваются последствия взаимодействия *B. miyamotoi* с нейтрофилами при инкубации в сыворотке крови здоровых неиммунных доноров или сыворотке переболевших ИКБ-БМ, богатой специфическими антителами к VMPs.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Источник сывороток крови лиц, переболевших ИКБ-БМ, методы выявления специфических антител к *B. miyamotoi* и подготовки штамма боррелий к исследованию описаны ранее [7]. Вкратце, сыворотки собраны в ходе систематического исследования клиники ИКБ-БМ [8, 15]; уровень антител к четырём антигенным вариантам VMPs, называемым Vlp15/16, Vlp18, Vsp1 и Vlp5, измеряли с помощью разработанного в ЦНИИ эпидемиологии планарного белкового биочипа; штамм *B. miyamotoi* HT31 подращивали в специализированной жидкой среде МКР-FS [6, 13] до концентрации около  $10^7$  боррелий/мл. Подсчет числа боррелий, а также контроль их жизнеспособности проводили методом темнопольной микроскопии.

Экспериментальная среда состояла из трех-пяти компонентов (табл.). В лунки с U-образным дном полипропиленового 96-луночного планшета добавляли компонент 1, сыворотку крови здорового донора (СЗД) без IgM и IgG к боррелиям. В отсутствие второго компонента объем компонента 1 составлял 50% от общего объема экспериментальной среды, то есть 50 мкл. В некоторых опытах вместо СЗД использовали инактивированную нагреванием СЗД (ИН-СЗД), в которой литическая активность системы комплемента (СК) равнялась

нулю. В качестве 2 компонента как источник специфических антител использовали смесь, в равных долях, сывороток крови 6 переболевших ИКБ-БМ (МІХ6) в объеме 25 мкл. При этом для стандартизации условий эксперимента (активности СК, биохимического состава сыворотки и т.п.) в экспериментальной среде присутствовал и компонент 1 — СЗД — в объеме 25 мкл. Третьим компонентом, также в объеме 50% от общего объема, или 50 мкл, была суспензия  $10^7$ /мл боррелий в среде МКР-FS. Таким образом, во всех экспериментальных условиях в начале эксперимента в лунке находилось  $5 \cdot 10^6$ /мл спирохет, 90 — 95% из которых были подвижными.

Нейтрофилы здорового донора выделяли из цельной крови с EDTA с помощью центрифугирования на среде Mono-Poly Resolving Medium согласно инструкции производителя (MP Biomedicals, США). После двукратной отмывки фосфатным буфером нейтрофилы пересуспензировали в компоненте 1 или смеси 1 и 2 компонентов до концентрации  $10^7$  клеток/мл. Соответственно, в начале эксперимента с нейтрофилами в лунке находилось  $5 \cdot 10^6$ /мл нейтрофилов (компонент 4). Таким образом, концентрация фагоцитов и отношение числа фагоцитов к числу боррелий (1 к 1) имитировали нормальный состав крови в условиях высокой для ИКБ-БМ спирохетемии. В ряде экспериментов для активации нейтрофилов добавляли компонент 5: пептидный хемоаттрактант fMLP до финальной концентрации 1 мкМ/л.

После окончательного заполнения лунок планшет немедленно заклеивали и помещали в термостат для инкубации в условиях постоянного активного встряхивания-перемешивания. Через 1 час и через 3 часа инкубации из каждой лунки отбирали по 5 мкл и наносили на предметное стекло под покровное стекло. Оценка доли подвижных и неподвижных боррелий, а также доли нейтрофилов, связавших боррелии, проводилась немедленно методом темнопольной микроскопии независимым исследователем, не оповещенным о статусе изучаемого образца (контроль или опыт и т.п.). В каждой капле определяли состояние не менее 100 боррелий и 100 нейтрофилов, как правило, в 5 — 6 полях зрения (подробнее см. в [7]).

Все статистические расчеты и оценки проведены с помощью лицензионной программы IBM SPSS Statistics 19. Для оценки значимости различий распределений количественных переменных использовали стандартные непараметрические методы [2].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты исследования жизнеспособности (подвижности) *V. miyamotoi* при инкубации в различных условиях представлены в табл., на основании которой возможны многочисленные сравнения проявлений эффекта иммобилизации. Для краткости величины уровня значимости всех подобных сравнений не приводятся. При рассмотрении таблицы читатель может воспользоваться правилом двух сигм: если диапазоны  $M_1 - 2 \cdot SD_1$  и  $M_2 + 2 \cdot SD_2$  не пересекаются, то величины  $M_1$  и  $M_2$  заведомо различны ( $p < 0.05$ ), где  $M$  — среднее арифметическое, а  $SD$  — выборочное стандартное отклонение. Строки 1 — 3 демонстрируют базовые, без добавления нейтрофилов, эффекты сыворотки: боррелии полностью сохраняют подвижность при инкубации в среде, содержащей 50% неиммунной СЗД (строка 1); их жизнеспособность статистически значимо уменьшается после часа или 3 часов инкубации в высокоиммунной С-ИКБ-БМ, содержащей IgM к каждому из VMPs (строка 2);

## Подвижность и иммобилизация *B. miyamotoi* при инкубации в различных условиях

Номер п/п	Состав экспериментальной среды, в которой проводится инкубация боррелий				Доля подвижных боррелий, %, среднее ± стандартное отклонение		
	Компонент 1 (сыворотка крови здорового донора)	Компонент 2 (сыворотка переболевших ИКБ-БМ)	Компонент 4 (нейтрофилы)	Компонент 5 (хемо-аттрактант)	В начале инкубации	Через 1 час инкубации	Через 3 часа инкубации
1*	СЗД50	нет	нет	нет	93.9±2.9	94.3±2.0	92.5±3.3
2	СЗД25	С-ИКБ-БМ, код МІХ6	нет	нет	92.0±1.3	82.2±3.6	80.0±1.5
3	ИН-СЗД25	ИН-С-ИКБ-БМ, код МІХ6	нет	нет	92.9±2.7	91.3±1.5	89.6±1.6
4	СЗД50	нет	НФ, 5*10 <sup>6</sup> /мл	нет	93.1±1.3	89.9±2.2	91.1±1.8
5	СЗД25	С-ИКБ-БМ, код МІХ6	НФ, 5*10 <sup>6</sup> /мл	нет	92.1±1.7	69.7±7.6	68.4±6.5
6	ИН-СЗД25	ИН-С-ИКБ-БМ, код МІХ6	НФ, 5*10 <sup>6</sup> /мл	нет	94.6±0.9	88.9±3.3	88.1±3.8
7	СЗД50	нет	НФ, 5*10 <sup>6</sup> /мл	fMLP, 1 мкМ/л	92.0±2.2	79.6±4.8	87.9±3.6
8	СЗД25	С-ИКБ-БМ, код МІХ6	НФ, 5*10 <sup>6</sup> /мл	fMLP, 1 мкМ/л	89.7±3.1	60.5±3.5	65.2±2.2
9	ИН-СЗД25	ИН-С-ИКБ-БМ, код МІХ6	НФ, 5*10 <sup>6</sup> /мл	fMLP, 1 мкМ/л	92.7±2.8	92.2±3.3	94.6±3.9

Примечание. \* Во всех экспериментальных средах инкубации (строки 1—9) присутствует 3 компонент: боррелии штамма НТ31 в среде МКР-FS, 5\*10<sup>6</sup> на мл. СЗД50 — сыворотка крови здорового донора, 50%; СЗД25 — СЗД, 25%. С-ИКБ-БМ, код МІХ6 — смесь взятых на стадии реконвалесценции сывороток крови 6 переболевших ИКБ-БМ, 25%. ИН-С-ИКБ-БМ — инактивированная нагреванием С-ИКБ-БМ, 25%. НФ — нейтрофилы. Указаны финальные концентрации сыворотки, боррелий, нейтрофилов и fMLP после их смешивания в составе экспериментальной среды инкубации.

инактивация СК нагреванием практически отменяет бактерицидное действие С-ИКБ-БМ (строка 3).

Добавление нейтрофилов к СЗД лишь незначительно, на 1 — 4%, снижает долю свободно плавающих боррелий (строка 4), при активации нейтрофилов хемоаттрактантом fMLP через час инкубации доля подвижных боррелий падает с 90 — 95% до 80% (строка 7). Визуально активация нейтрофилов в суспензии подтверждалась известным эффектом: большинство из них переходили из приблизительно сферической формы в поляризованную, ближе к овалу с отношением осей 1 к 2. При инкубации в С-ИКБ-БМ с нейтрофилами доля свободных подвижных боррелий дополнительно снижается приблизительно на 10% (строка 5), но это изменение не достигает уровня статистической значимости. При добавлении fMLP только 60 — 65% свободных боррелий остаются подвижными (строка 8), степень иммобилизации значимо отлична от иммобилизации только за счет бактерицидного действия С-ИКБ-БМ (строка 2),  $p < 0.05$ , критерий Манна-Уитни. При инактивации нагреванием С-ИКБ-БМ не отмечается не только бактерицидного действия собственно ИН-С-ИКБ-БМ, но и иммобилизирующего эффекта добавления нейтрофилов, не активированных или активированных (между данными в строках 1, 3, 6 и 9 нет значимых различий).

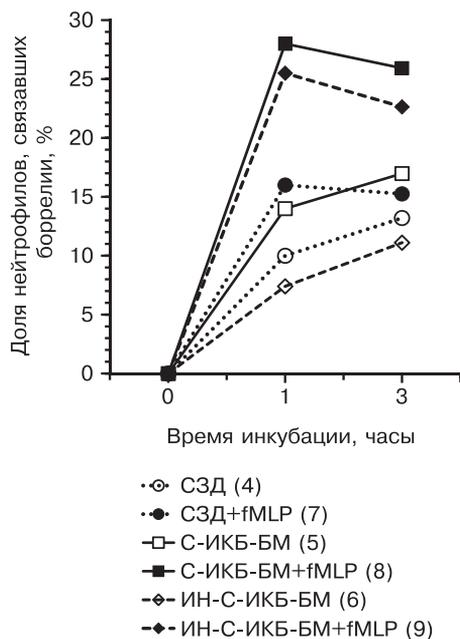
Уже через 10 — 30 мин совместной инкубации часть нейтрофилов оказывается связанными с *B. miyamotoi*. Первичный контакт является точечным, через один из концов спиралевидной боррелии. Это заставляет предположить, что плавающие спирохеты сами «натываются» на нейтрофил, а не «вылавливаются» филоподиями фагоцита, проплывая мимо. Такие столкновения действительно наблюдались при микроскопии. Первичный контакт не является абсолютно прочным: приблизительно в 10 — 20% случаев через несколько

минут контакта, в течение которых боррелии продолжают двигаться, им удается вырваться и уплыть. В ином варианте нейтрофил захватывает и противоположный конец спирали, после чего боррелия сгибается петлей, полностью иммобилизуется и, вероятно, впоследствии фагоцитируется (время наблюдения каждого стекла было ограничено 5 минутами, за это время завершенного фагоцитоза наблюдать не удалось). В использованных экспериментальных условиях (свободно плавающие боррелии и нейтрофилы в невысоких, но физиологических концентрациях, имитирующих ситуацию внутри кровеносных сосудов) большинству нейтрофилов удается связать только одну боррелию. Однако при наблюдении одной-двух сотен нейтрофилов среди них обнаруживались несколько клеток, являющихся центром клубка десятков адгезированных боррелий. Видимых причин для такого различия моделей связывания не выявлено. Отсутствовало и явление розеткообразования, определяемое как агрегация нескольких нейтрофилов вокруг одной или нескольких боррелий. Практически не наблюдалась адгезия нейтрофилов друг к другу.

Зависимость доли нейтрофилов, связавшихся с боррелиями, от условий инкубации, отражена на рис. В СЗД она невысока (10 — 13%); в С-ИКБ-БМ приблизительно на 4% выше; в ИН-С-ИКБ-БМ незначительно ниже, чем в СЗД, и значительно ниже, чем в С-ИКБ-БМ. При добавлении fMLP доля нейтрофилов, связавшихся с боррелиями, значительно возрастает ( $p < 0.05$ , критерий Манна-Уитни), достигая 25 — 27% в С-ИКБ-БМ и, что было несколько неожиданно, в ИН-С-ИКБ-БМ. Через 24 часа совместной инкубации доля нейтрофилов, связавшихся с боррелиями, в среднем на 10% ниже, чем через 3 часа.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно приведенным наблюдениям нейтрофилы способны частично ограничивать жизнеспособность *B. miyatotoi*. Один из механизмов, отраженный в табл., подразумевает дистанционное действие бактерицидных субстанций — активных форм кислорода и/или содержимого секреторных гранул [12, 20]. В наиболее благоприятных условиях (строка 9) это действие оказалось по мощности сопоставимо с бактерицидным действием собственно сыворотки/плазмы крови и привело к дополнительной иммобилизации приблизительно 20% боррелий. Другой механизм основан на непосредственном изъятии боррелий из кровотока (при генерализованной инфекции ИКБ-БМ) путем фагоцитоза. Исходя из данных, представленных на рис., он может обеспечивать сокращение популяции боррелий на 20 — 30%. Однако те же результаты ука-



### Связывание *B. miyatotoi* нейтрофилами при инкубации в различных условиях.

СЗД50 — сыворотка крови здорового донора; С-ИКБ-БМ — смесь взятых на стадии реконвалесценции сывороток крови 6 переболевших ИКБ-БМ; ИН-С-ИКБ-БМ — инактивированная нагреванием С-ИКБ-БМ; fMLP — пептидный хемоаттрактант. Номер в скобках соответствует номеру строки в табл., в которой дано более подробное описание соответствующих условий инкубации.

зывают, что нейтрофилы не являются ключевым элементом в защите от инфекции *V. miyamotoi*. Максимальный бактерицидный и опсонофагоцитарный эффект в отношении *V. miyamotoi* требует наличия интактной системы комплемента и специфических антител. Это не удивительно и характерно для иных боррелиозов [20, 22] и многих других генерализованных инфекций, например, менингококковой инфекции [16, 17], поскольку успешный опсонофагоцитоз предполагает синергичное действие рецепторов C3 компонента комплемента и Fc-рецепторов на поверхности нейтрофила и соответствующих мишеней на поверхности бактерии. Также и активация «дыхательного взрыва» и дегрануляции нейтрофилов невозможна без стимулирующего контакта с мишенью или внешнего активатора, подобного fMLP, интерлейкину-8 или анафилатоксину C5a. Важно для понимания механизма взаимодействия, но не критично в патофизиологическом смысле требование интактности СК, поскольку врожденные или приобретенные дефициты СК встречаются весьма редко [3]. Но требование наличия специфических антител отменяет значение нейтрофилов именно как эффекторов врожденного иммунитета против инфекции *V. miyamotoi*, то есть первой и наиболее быстро включающейся, даже по сравнению с макрофагами, линии защиты [20]. Возможно, с недостаточной эффективностью врожденного иммунитета связана относительно высокая, по сравнению с БЛ, контагиозность данной инфекции [19].

Наконец, обращает на себя внимание, что ни в работе [7], ни в данном исследовании не наблюдалось 100% уничтожение боррелий. Поскольку даже без антибиотикотерапии ИКБ-БМ рано или поздно заканчивается выздоровлением, то есть полной элиминацией боррелий, можно высказать несколько предположений, намечающих направление дальнейших исследований. Возможно, более плотное взаимодействие нейтрофилов с *V. miyamotoi* происходит не в свободном плавании, как в нашей модели, а в наиболее узких местах, таких как микрокапилляры, где может достигаться более высокая концентрация бактерицидных веществ. Поскольку и активированные нейтрофилы, и продукты их активации способны кроме бактерий поражать и сосудистый эндотелий, клиническим коррелятом событий в капиллярах может являться наблюдаемые при ИКБ-БМ микроциркуляторные нарушения [5]. Дополнительные затруднения в движении крови по капиллярам могут вызывать и выявляющиеся *in vitro* агрегаты нейтрофилов и десятков боррелий. Также *in vivo* боррелии могут преимущественно элиминироваться не нейтрофилами, а резидентными фагоцитами печени и селезенки. В опытах на крысах было показано, что Купфферовские клетки успешно связывают и убивают как различные штаммы группы *V. burgdorferi sensu lato*, так и боррелий-возбудителей КВЛ — *V. hermsii*, *V. parkeri* и *V. turicatae* [18]. Клиническим коррелятом взаимодействия клеток печени с *V. miyamotoi* могут быть проявления гепатита (повышение концентрации печеночных трансаминаз), наблюдающиеся приблизительно у половины больных ИКБ-БМ [8, 15]. В этой связи исследование патогенеза инфекции *V. miyamotoi* должно быть продолжено не только на клеточных моделях, но и в опытах на лабораторных животных.

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №15-15-00072). Авторы признательны медицинскому персоналу МО «Новая больница» Екатеринбург и Республиканской клинической инфекционной больницы Удмуртской Республики за помощь в проведении исследования.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Карань Л.С., Колясникова Н.М., Махнева Н.А. Топоркова М.Г., Надеждина М.В., Есаулкова А.Ю., Романенко В.В., Арумова Е.А., Платонов А.Е., Малеев В.В. Применение ПЦР в режиме реального времени для диагностики различных клещевых инфекций. Журн. микробиол. 2010, 3: 72-77.
2. Платонов А.Е. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы. М., РАМН, 2000.
3. Платонов А.Е., Вершинина И.В. Менингококковая инфекция у лиц с дефицитами терминальных компонентов комплемента. Эпидемиология и инфекционные болезни. 1999, 5: 38-43.
4. Платонов А.Е., Малеев В.В., Карань Л.С. Боррелиозные возвратные лихорадки: забытые и новые. Терапевтический архив. 2010, 82 (11): 74-80.
5. Платонов А.Е., Сарксян Д.С., Карань Л.С., Шипулин Г.А., Гордыгина Е.В., Малинин О.В., Малеев В.В. Состояние системы свертывания крови и микроциркуляторные нарушения при иксодовом клещевом боррелиозе, вызванном *Borrelia miyamotoi*. Терапевтический архив. 2015, 87 (11): 26-32.
6. Платонов А.Е., Koetsveld J., Колясникова Н.М., Сарксян Д.С., Топоркова М.Г., Шипулин Г.А., Novius J.W. Микробиологическое подтверждение этиологии «иксодового клещевого боррелиоза в безэритемной форме» — инфекции, вызываемой *Borrelia miyamotoi*. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2017, 92 (1): 29-35.
7. Платонов А.Е., Koetsveld J., Стуколова О.А., Долгова А.С., Колясникова Н.М., Топоркова М.Г., Сарксян Д.С. Бактерицидное действие сыворотки крови человека на *Borrelia miyamotoi*, возбудителя иксодового клещевого боррелиоза (ИКБ-БМ). Журн. микробиол. 2018, 1: 58—67.
8. Сарксян Д.С., Платонов А.Е., Карань Л.С., Малинин И.Е., Халитова Л.И., Шахов В.И., Дударев М.В., Малинин О.В., Малеев В.В. Клинические особенности «нового» клещевого боррелиоза, вызываемого *Borrelia miyamotoi*. Терапевтический архив. 2012, 84 (11): 34-41.
9. Стуколова О.А., Колясникова Н.М., Сарксян Д.С., Топоркова М.Г., Koetsveld J., Карань Л.С., Черкашина А.С., Маркелов М.Л., Долгова А.С., Novius J.W., Шипулин Г.А., Платонов А.Е. Разработка и использование планарного белкового биочипа для серологической диагностики клещевого боррелиоза, вызванного *Borrelia miyamotoi*. В: Молекулярная диагностика 2017. Под ред. Покровского В.И. Тамбов, ООО фирма «Юлис», 2017, 2: 151-152.
10. Carrasco S.E., Troxell B., Yang Y. et al. Outer surface protein OspC is an antiphagocytic factor that protects *Borrelia burgdorferi* from phagocytosis by macrophages. Infect. Immun. 2015, 83(12): 4848-4860.
11. Colombo M.J., Alugupalli K.R. Complement factor H-binding protein, a putative virulence determinant of *Borrelia hermsii*, is an antigenic target for protective B1b lymphocytes. J. Immunol. 2008, 180 (7): 4858-4864.
12. Hartiala P., Nytonen J., Suhonen J. et al. *Borrelia burgdorferi* inhibits human neutrophil functions. Microbes Infect. 2008, 10 (1): 60-68.
13. Koetsveld J., Kolyasnikova N.M., Wagemakers A. et al. Development and optimization of an in vitro cultivation protocol allows for isolation of *Borrelia miyamotoi* from patients with hard tick-borne relapsing fever. Clin. Microbiol. Infect. 2017, 23 (7): 480-484.
14. Oosting M., Buffen K., van der Meer J.W. et al. Innate immunity networks during infection with *Borrelia burgdorferi*. Crit. Rev. Microbiol. 2016, 42 (2): 233-244.
15. Platonov A.E., Karan L.S., Kolyasnikova N.M. et al. Humans infected with the relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia. Emerg. Infect. Dis. 2011, 17 (10): 1816-1822.
16. Platonov A.E., Shipulin G.A., Verшинina I.V. et al. Association of human FcγRIIa (CD32) polymorphism with susceptibility and severity of meningococcal disease. Clin. Infect. Diseases. 1998, 27: 746-750.
17. Platonov A.E., Verшинina I.V., Kayhty H. et al. Antibody-dependent killing of meningococci by human neutrophils in serum of late complement component deficient patients. Int. Archive Immunology Allergy. 2003, 130: 314-321.

18. Sambri V., Aldini R., Massaria F. et al. Uptake and killing of Lyme disease and relapsing fever borreliae in the perfused rat liver and by isolated Kupffer cells. *Infect. Immun.* 1996, 64 (5): 1858-1861.
19. Sarkisyan D.S., Platonov A.E., Karan L.S. et al. Probability of spirochete *Borrelia miyamotoi* transmission from ticks to humans. *Emerg. Infect. Dis.* 2015, 21 (12): 2273-2274.
20. Suhonen J., Hartiala K., Tuominen-Gustafsson H., Viljanen M.K. *Borrelia burgdorferi*-induced oxidative burst, calcium mobilization, and phagocytosis of human neutrophils are complement dependent. *J. Infect. Dis.* 2000, 181 (1): 195-202.
21. Wagemakers A., Koetsveld J., Narasimhan S. et al. Variable major proteins as targets for specific antibodies against *Borrelia miyamotoi*. *J. Immunol.* 2016, 196 (10): 4185-4195.
22. Woodman M.E., Cooley A.E., Avdiushko R. et al. Roles for phagocytic cells and complement in controlling relapsing fever infection. *J. Leukoc. Biol.* 2009, 86 (3): 727-736.

*Поступила 31.08.17*

Контактная информация: Платонов Александр Евгеньевич, д.б.н., проф.,  
111123, Москва, ул. Новогириевская, 3а, р.т. (495) 974-96-46

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*Е.А.Прокопьева*<sup>1,2</sup>, *К.А.Шаршов*<sup>1</sup>, *А.А.Романовская*<sup>3</sup>,  
*И.А.Соболев*<sup>1</sup>, *О.Г.Курская*<sup>1</sup>, *Е.И.Соловьева*<sup>1,2</sup>, *Л.В.Шестопалова*<sup>2</sup>,  
*А.В.Зайковская*<sup>4</sup>, *А.Ю.Алексеев*<sup>1</sup>, *А.М.Шестопалов*<sup>1</sup>

## **СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПАТОГЕННОСТИ ВИРУСОВ ГРИППА А(H5N1) И А(H1N1)pdm09 У ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ**

<sup>1</sup>НИИ экспериментальной и клинической медицины, Новосибирск; <sup>2</sup>Новосибирский национальный исследовательский государственный университет; <sup>3</sup>Университет Хельсинки, Финляндия; <sup>4</sup>ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», Новосибирск

*Цель.* Проведено экспериментальное инфицирование лабораторных мышей линии BALB/c высокопатогенным вирусом гриппа птиц А(H5N1) и пандемическим вирусом гриппа А(H1N1)pdm09, адаптированного к мышам, с целью сравнения степени патогенности вновь возникших штаммов вируса гриппа с пандемическим потенциалом. *Материалы и методы.* Первую группу мышей линии BALB/c (n=24) инфицировали высокопатогенным вирусом гриппа А(H5N1) в дозе 5 ЛД<sub>50</sub>, а вторую группу (n=24) инфицировали адаптированным вариантом пандемического вируса гриппа А(H1N1)pdm09 в дозе 5 ЛД<sub>50</sub>. Определение ЛД<sub>50</sub> и ТСID<sub>50</sub> выполняли с помощью вирусологических методов. Морфологические изменения во внутренних органах (легкое, головной мозг, печень, почка, селезенка) исследовали методами световой и трансмиссионной электронной микроскопии. *Результаты.* Вирусологический анализ показал, что оба штамма являются высоколетальными для мышей. Микроскопическое исследование выявило развитие интерстициальной пневмонии в легких и генерализацию инфекции по внутренним органам. *Заключение.* Обнаружено развитие высоко летального заболевания в виде респираторной пневмонии у обеих групп экспериментально инфицированных мышей линии BALB/c как под воздействием высокопатогенного вируса гриппа птиц А(H5N1), так и адаптированного пандемического вируса гриппа А(H1N1)pdm09. При этом отмечается различный механизм развития патологического процесса: под воздействием адаптированного варианта вируса гриппа А(H1N1)pdm09 сперва развивается бронхит, который быстро усугубляется развитием альвеолита, в то время как под воздействием высокопатогенного вируса гриппа птиц А(H5N1) сразу же развивается альвеолит. На 6 сутки после инфицирования регистрируется развитие генерализованной инфекции у мышей обеих экспериментальных групп.

Журн. микробиол., 2018, № 2, С. 38—44

Ключевые слова: адаптированный вирус гриппа А(H1N1)pdm09, А(H5N1), генерализованная инфекция