

УЧРЕДИТЕЛИ:
ВСЕРОССИЙСКОЕ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО
ЭПИДЕМИОЛОГОВ, МИКРОБИОЛОГОВ И ПАРАЗИТОЛОГОВ

СОЮЗ ПЕДИАТРОВ РОССИИ

ООО «С-ИНФО»

ЖУРНАЛ МИКРОБИОЛОГИИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ИММУНОБИОЛОГИИ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор В. В. ЗВЕРЕВ, д.б.н., проф., академик РАН

Ю.В. АНАНЬИНА, д.м.н., проф., член-корр. РАН; Н.И. БРИКО, д.м.н., проф., академик РАН;
О.В. БУХАРИН, д.м.н., проф., академик РАН; А.Л. ГИНЦБУРГ, д.м.н., проф., академик РАН;
А.В. КАРАУЛОВ, д.м.н., проф., академик РАН; В.В. КУТЫРЕВ, д.м.н., проф., академик РАН;
В.В. МАЛЕЕВ, д.м.н., проф., академик РАН; М.И. МИХАЙЛОВ, д.м.н., проф., член-корр. РАН;
М.И. НАРКЕВИЧ; Г.Г. ОНИЩЕНКО, д.м.н., проф., академик РАН; В.И. ПОКРОВСКИЙ,
д.м.н., проф., академик РАН; Р.И. СЕПИАШВИЛИ, д.м.н., проф., член-корр. РАН;
В.П. СЕРГИЕВ, д.м.н., проф., академик РАН; Арег А. ТОТОЛЯН, д.м.н., проф., академик РАН;
Н.Н. ФИЛАТОВ, д.м.н., проф., член-корр. РАН; С.В. ЧЕРКАСОВ, д.м.н., проф., член-корр.
РАН; Н.Д. ЮЩУК, д.м.н., проф., академик РАН

Двухмесячный научно-практический журнал

Основан в 1924 г.

3

май—июнь

МОСКВА 2017

«С-ИНФО»

СОСТАВ РЕДАКЦИОННОГО СОВЕТА:

БРУСИНА Е.Б. (Кемерово), **ЗУЕВА Л.П.** (Санкт-Петербург), **КОРОЛЮК А.М.** (Санкт-Петербург), **ПРИСАКАРЬ В.И.** (Кишинев), **ТИТОВ Л.П.** (Минск), **ШАРКОВА В.** (Владивосток), **ШЕНДЕРОВ Б.А.** (Москва), **ШКАРИН В.В.** (Н. Новгород)

Адрес редакции и издателя:
121059, Москва, ООО «С-инфо», а/я 88,
редакция ЖМЭИ (для отправки статей и запросов о прохождении статей)
Телефон редакции: (495) 796-92-91 (не для справок о прохождении статей)

Зав. редакцией Л.В.Иваничева

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору
в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций.
Свидетельство ПИ № ФС77-36745

Подписной каталог:

«Пресса России. Газеты и журналы».
Индексы: 10277, 16729, 71436

**Журнал индексируется в Scopus, РИНЦ,
входит в перечень ВАК, является органом ВНОЭМП**

<http://www.jmicrobiol.com>

Подписано в печать 24.05.17. Выход в свет 13.06.17.
Формат 70x108 1/16. Печать офсетная. Заказ

Отпечатано в ООО «Буки Веди»
119049, г. Москва, Ленинский проспект, д. 4, стр. 1 А
Тел.: (495)926-63-96
www.bukivedi.com
E-mail: info@bukivedi.com

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

*О.В.Рыбальченко, М.В.Эрман, О.Г.Орлова,
Т.М.Первунина, В.В.Капустина, Е.Н.Парийская*

ПОДАВЛЕНИЕ БИОПЛЕНОК УСЛОВНО ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ НА МОЧЕВЫХ КАТЕТЕРАХ

Санкт-Петербургский государственный университет

Цель. Исследование закономерностей развития бактериальных биопленок условно патогенных бактерий на мочевых катетерах, а также возможности их подавления официальным препаратом растительного происхождения Канефрон и препаратом нитрофуранового ряда Фурамаг. *Материалы и методы.* Бактериальные культуры *Escherichia coli* M17 и *Staphylococcus aureus* 193 выращивали в виде биопленок на внутренней поверхности латексных катетеров Фолея. Оценивали влияние препарата Канефрон и препарата Фурамаг на способность данных штаммов к биопленкообразованию, а также подавление уже сформированных биопленок кишечной палочки и стафилококков на мочевых катетерах. Определение степени бактерицидного воздействия препаратов при инкубировании микроорганизмов на поверхности мочевых катетеров проводили по методу Коха. Морфологические и ультраструктурные изменения в бактериальных клетках и биопленках исследовали методами трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии. *Результаты.* Обнаружено выраженное бактерицидное воздействие Канефрона и препарата Фурамаг на сформированные бактериальные биопленки. Отмечено их ингибирующее воздействие на рост и развитие биопленок указанных штаммов микроорганизмов. На электронно-микроскопическом уровне показаны деструктивные изменения в клетках и биопленках при воздействии исследуемых препаратов. *Заключение.* Выявленное бактерицидное воздействие официального препарата растительного происхождения Канефрон и препарата нитрофуранового ряда Фурамаг на условно патогенные бактерии на мочевых катетерах Фолея, по сравнению с классическими способами антисептики, позволяет не только подавлять процесс биопленкообразования бактериальных культур *E. coli* M17 и *S. aureus* 193, но и эффективно разрушать уже сформированные ими биопленки, что должно предотвращать развитие катетер-ассоциированных инфекций и приводить к ускорению процесса выздоровления пациентов с заболеваниями мочевыводящих путей.

Журн. микробиол., 2017, № 3, С. 3—11

Ключевые слова: мочевые катетеры Фолея, бактериальные биопленки, бактерицидный эффект, *Escherichia coli* M17, *Staphylococcus aureus* 193

*О.В.Рыбальченко, М.В.Эрман, О.Г.Орлова,
Т.М.Первунина, В.В.Капустина, Е.Н.Парийская*

SUPPRESSION OF BIOFILMS OF OPPORTUNISTIC BACTERIA IN URINARY CATHETERS

St. Petersburg State University, Russia

Aim. Study regularities of development of bacterial biofilms in opportunistic bacteria in urinary catheters, as well as a possibility of their suppression by an official preparation of plant origin — Kanefron and nitrofurane class preparation — Furamag. *Materials and methods.* *Escherichia coli* M17 and *Staphylococcus aureus* 193 cultures were cultivated as biofilms on an inner surface of Foley latex catheter. Effect of Kanefron and Furamag on the ability of these strain to form biofilms was evaluated, as well as suppression of already developed biofilm of *E. coli* M17 and *S. aureus* 193

on urine catheters. Determination of bactericidal effect of preparations during incubation of microorganisms on the surface of urine catheters was carried out by Koch method. Morphologic and ultrastructure changes in bacterial cells and biofilms were studied by transmission and scanning electron microscopy. *Results.* A pronounced bactericidal effect of Kanefron and Furamag on the formed bacterial biofilms was detected. Inhibiting effect on growth and development of biofilms of the strains was noted. Destructive changes in cells and biofilms during the effect of the studied preparations are shown on electron microscopy level. *Conclusion.* The detected bactericidal effect of officinal preparation of plant origin — Kanefron and nitrofurantoin class preparation — Furamag on opportunistic bacteria on Foley urine catheters allows not only to suppress biofilm formation process of *E. coli* M17 и *S. aureus* 193 compared with classic antiseptic methods, but also effectively destroy already formed biofilms that must prevent development of catheter-associated infections and result in enhancement of recuperation of patients with diseases of the urinary tract.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 3, P. 3—11

Key words: Foley urine catheters, bacterial biofilms, bactericidal effect, *Escherichia coli* M17, *Staphylococcus aureus* 193

ВВЕДЕНИЕ

Катетеризация мочевыводящих путей относится к достаточно распространенным в медицинской практике процедурам. Кратковременная катетеризация, как правило, не приводит к осложнениям, однако при увеличении длительности пребывания катетера в организме повышается риск развития инфекционного процесса, так называемой катетер-ассоциированной инфекции (КАИ). На долю КАИ мочевыводящих путей приходится до 40% всех внутрибольничных инфекций [9].

Проблема инфицирования катетеров при их длительном использовании, в первую очередь, связана с развитием биопленок собственных эндогенных микроорганизмов пациента. Кроме того, при несоблюдении правил гигиены высока вероятность контаминирования катетеров медицинским персоналом, что может привести к развитию инфекционного процесса, вызванного возбудителями внутрибольничных инфекций. Установлено, что наиболее часто КАИ вызывают *Escherichia coli* (80%) и *Proteus mirabilis* (45%) [14]. Реже встречаются *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Staphylococcus* spp. У пациентов после повторных курсов антибиотикотерапии КАИ чаще всего вызывают *Pseudomonas aeruginosa* и *Candida* spp. [10].

В настоящее время препаратами выбора для лечения и профилактики инфекционных заболеваний мочевыводящей системы являются лекарственные средства из группы нитрофуранов. Терапевтический эффект нитрофуранов, например, при пиелонефрите, обусловлен тем, что через капиллярную сеть, оплетающую тубулярный аппарат, они проникают в интерстициальную ткань почки, где и оказывают воздействие на возбудителей инфекции, снижая риск развития КАИ [1].

Установлено, что основной механизм противомикробного действия нитрофуранов заключается в нарушении окислительно-восстановительных реакций в микробных клетках, приводящем к разрушению цитоплазматической мембраны бактерий [12].

Кроме того, наиболее частые возбудители внебольничных инфекций мочевых путей *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus saprophyticus* в 83–89% случаев демонстрируют чувствительность к Фурамагу [5].

Клинически доказано, что достоинством препаратов нитрофуранового ряда является сочетание противомикробного (препятствует, в первую очередь,

адгезии микроорганизмов), противовоспалительного и диуретического эффектов, что особенно важно при хронических процессах в мочевыводящих путях.

В последние годы наряду с антимикробными препаратами в урологической практике все шире используют препараты растительного происхождения, привлекательность которых заключается в достаточно низком риске развития осложнений и нежелательных побочных эффектов [13]. В этой связи, для лечения пациентов с острыми и хроническими инфекционными заболеваниями мочевыводящих путей рекомендовано одновременное применение препаратов нитрофуранового ряда с препаратами растительного происхождения [Семенов Б.В. и др., 2008]. Кроме прямого терапевтического действия, обнаружено, что препараты нитрофуранового ряда подавляют патологическую кристаллизацию мочи, что очень важно при терапии пациентов в период катетеризации [2].

Цель работы — исследование закономерностей развития бактериальных биопленок условно патогенных бактерий на мочевых катетерах, а также возможности их подавления официальным препаратом растительного происхождения Канефрон и препаратом нитрофуранового ряда Фурамаг.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили культуры микроорганизмов *E. coli* M17 (промышленный штамм) и *S. aureus* 193 (коллекция НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи). В работе использовали официальный препарат растительного происхождения Канефрон (Канефрон® Н, Canephron® N), раствор производства «Бионорика СЕ» (Германия) и препарат нитрофуранового ряда Фурамаг (Фурамаг®, Fugamag), капсулы производства АО «Олайнфарм» (Латвия). В качестве субстрата для выращивания модельных бактериальных биопленок использовали внутреннюю поверхность 2-ходовых стандартных латексных (силиконизированных) катетеров Фолея, «Unomedical» (Малайзия).

Определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) официальных препаратов растительного происхождения и препаратов нитрофуранового ряда для исследуемых культур микроорганизмов проводили по стандартной методике в соответствии с клиническими рекомендациями по определению чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам на основе двойных последовательных разведений концентрации вещества от максимальной к минимальной. Для этого исследуемые препараты в различных концентрациях вносили в жидкую питательную среду (бульон). Затем бактериальную суспензию определенной плотности, соответствующую стандарту мутности 0,5 по McFarland, помещали в бульон с препаратом. После инкубации в течение 24 ч при температуре 37°C проводили учет полученных результатов. Первую наименьшую концентрацию препарата из серии последовательных разведений, где визуально не определялся бактериальный рост, принимали за МИК и выражали в мг/л или мкг/мл.

На первом этапе экспериментов проводили исследование по воздействию препарата Канефрон и препарата Фурамаг на полноценные сформированные биопленки кишечной палочки и стафилококков. Для этого бактериальные биопленки выращивали на внутренней поверхности катетеров Фолея, разрезая их поперек на фрагменты длиной около 1 см, из которых затем готовили половинки с открытой внутренней полостью. Все манипуляции с катетерами проводили в стерильных условиях. Далее культуры *E. coli* M17 и *S. aureus* 193 засеивали в колбы с жидкой питательной средой (бульон с сердечно-

мозговой вытяжкой, «HiMedia», Индия), в которые предварительно помещали фрагменты катетеров. Культивирование проводили в условиях термостабилизации (температура 37°C в течение 24 часов), при этом на поверхности катетеров происходило формирование биопленок. Далее фрагменты катетеров с микробной биопленкой на внутренней поверхности переносили в растворы для инкубирования, содержащие в первом случае Канефрон, в другом варианте — препарат Фурамаг. Инкубирование биопленок проводили в различных жидких субстратах (растворах): питательный бульон, физиологический раствор и искусственная моча. Время инкубирования составляло 5 и 24 часа.

На втором этапе экспериментов проводили исследование влияния Канефрона и Фурамага на формирование и развитие микробных биопленок на внутренних поверхностях катетеров Фолея. Для этого фрагменты катетера, полученные, как описано выше, помещали в жидкую питательную среду (бульон с сердечно-мозговой вытяжкой с указанными выше препаратами), затем вносили культуры *E. coli* M17 или *S. aureus* 193 в концентрации 10⁸ КОЕ/мл в количестве 10% от объема пробы и выращивали в термостате при температуре 37°C в течение 24 часов.

Выращенные бактериальные биопленки смывали с поверхности катетеров физиологическим раствором в объеме 1 мл и титровали в физиологическом растворе по методу Коха с параллельными посевами на плотную питательную среду (колумбийский агар) для определения КОЕ через 24 ч культивирования при температуре 37°C.

Электронно-микроскопические исследования ультраструктурных изменений в клетках и в бактериальных биопленках *E. coli* M17 и *S. aureus* 193 после воздействия Канефрона и Фурамага проводили с использованием трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) методом ультратонких срезов. Материал для электронной микроскопии брали с поверхности катетеров. Особенности подготовки образцов описаны нами ранее [3]. Препараты просматривали в трансмиссионном электронном микроскопе JEM-100C («JEOL», Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Электронно-микроскопический анализ динамики развития микробных популяций *E. coli* M17 и *S. aureus* 193 на поверхности катетеров при воздействии Канефрона и Фурамага проводили, используя сканирующую электронную микроскопию (СЭМ). Для получения препаратов материал фиксировали в парах 25% раствора глутаральдегида в течение 12 часов при температуре 4°C, после чего на поверхность материала напыляли золото в вакуумной установке JFC-1100 («JEOL», Япония). Готовые препараты просматривали в сканирующем электронном микроскопе JSM-35C («JEOL», Япония) при ускоряющем напряжении 15 кВ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Вначале определяли МИК Канефрона и Фурамага при воздействии на суспензионные культуры. При исследовании МИК раствора Канефрона показано, что для суспензионной культуры *E. coli* M17 она составляла 0,2 мл на 1 мл среды, при этом МИК для суспензионных клеток *S. aureus* 193 увеличилась в два раза — 0,4 мл на 1 мл среды. При определении МИК сухого препарата Фурамага в отношении суспензионной культуры кишечной палочки и стафилококков установлено, что для обеих культур она оказалась одинаковой — 1 мкг/мл.

Затем мы определяли МИК Канефрона и Фурамага при воздействии на клетки в биопленках *E. coli* M17 и *S. aureus* 193. В связи с тем, что устойчивость

бактерий к АМП в составе биопленок в 10 — 100 раз выше, по сравнению с планктонными формами клеток, находящимися в суспензии, для Фурамага выбрана концентрация, в 10 раз превышающая МИК. Результаты инкубирования биопленок *E. coli* M17 и *S. aureus* 193 с Канефроном в концентрации, в 10 раз превышающей МИК, показали отсутствие подавления роста клеток в составе биопленки. В связи с этим, применяли раствор Канефрона в исходной концентрации без добавления питательной среды.

В дальнейшем мы изучали воздействие Канефрона и Фурамага на модельные сформированные биопленки *E. coli* M17 и *S. aureus* 193 на поверхности мочевых катетеров. При инкубировании сформированных на поверхности катетеров биопленок *S. aureus* 193 в растворе Канефрона исходной концентрации через 5 часов наблюдали снижение числа КОЕ на 6 порядков, через 24 часа инкубирования число КОЕ уменьшалось еще на 1 порядок. К 5 часу инкубирования биопленок *S. aureus* 193 с Фурамагом в концентрации 10 мкг/мл число КОЕ снижалось на 7,4 порядка, при этом через 24 часа наблюдали полное подавление жизнеспособности клеток *S. aureus* 193.

Инкубирование биопленок *E. coli* M17 на внутренней поверхности катетеров с добавлением неразбавленного раствора Канефрона через 5 часов приводило к снижению числа жизнеспособных клеток на 7 порядков, при этом через 24 часа жизнеспособные клетки не обнаруживались.

При воздействии Фурамага в концентрации 10 мкг/мл на биопленки *E. coli* M17, сформированные на внутренней поверхности катетеров, происходило полное подавление жизнеспособности кишечных палочек уже через 5 часов инкубирования.

Описанную выше гибель

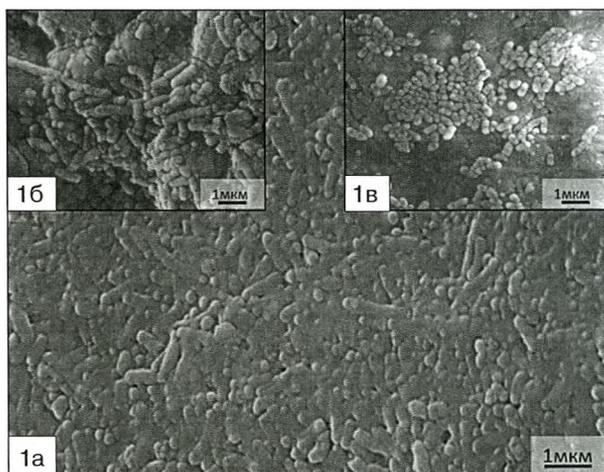


Рис. 1. СЭМ. Внутренняя поверхность мочевого катетера Фолея с 24-часовой культурой *E. coli* M17 в бульоне с сердечно-мозговой вытяжкой.

а — контроль, бактериальная биопленка; б — клетки и микроколонии после воздействия Канефрона, бактериальная биопленка не сформирована; в — клетки и микроколонии после воздействия Фурамага, бактериальная биопленка не сформирована.

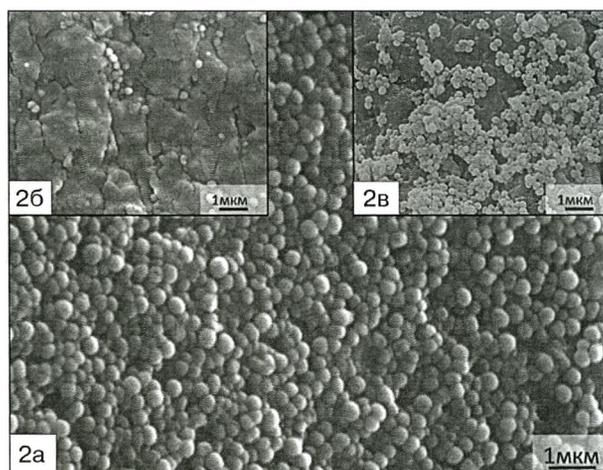


Рис. 2. СЭМ. Внутренняя поверхность мочевого катетера Фолея с 24-часовой культурой *S. aureus* 193 в бульоне с сердечно-мозговой вытяжкой.

а — бактериальная биопленка, контроль; б — единичные клетки после воздействия Канефрона, бактериальная биопленка не сформирована; в — клетки и микроколонии после воздействия Фурамага, бактериальная биопленка не сформирована.

клеток в составе биопленок *S. aureus* 193 и *E. coli* M17 при воздействии Канефрона и Фурамага прослеживали во всех применяемых для растворения этих препаратов жидкостях: питательный бульон, физиологический раствор и искусственная моча.

В растворе Канефрона, концентрация которого в 10 раз превышала МИК, на внутренней поверхности мочевых катетеров наблюдали формирование полноценных биопленок клетками *E. coli* M17 и *S. aureus* 193.

Выращивание биопленок *S. aureus* 193 и *E. coli* M17 в течение 24 часов в неразбавленном растворе Канефрона, в конечном итоге, приводило к формированию биопленок, однако число КОЕ на 6 порядков для *S. aureus* 193 и на 7 порядков для *E. coli* M17 было ниже, чем в контроле.

В растворе Фурамага при концентрации 10 мкг/мл развития обеих культур условно патогенных бактерий в виде биопленок в течение 24 час не наблюдалось. Полученные данные указывают на способность Канефрона и Фурамага подавлять формирование биопленок условно патогенных микроорганизмов на стенках мочевых катетеров.

Сканирующая электронная микроскопия подтвердила данные, полученные в результате проведения микробиологического анализа, об отсутствии бактериальных биопленок после обработки Канефроном и Фурамагом на внутренней поверхности мочевых катетеров в процессе выращивания обеих культур условно патогенных бактерий в течение 24 часов (рис. 1, 2).

На ультратонких срезах клеток *E. coli* M17 и *S. aureus* 193, взятых с внутренней поверхности мочевых катетеров Фолея после выращивания в бульоне с сердечно-мозговой вытяжкой и обработки Канефроном и Фурамагом,

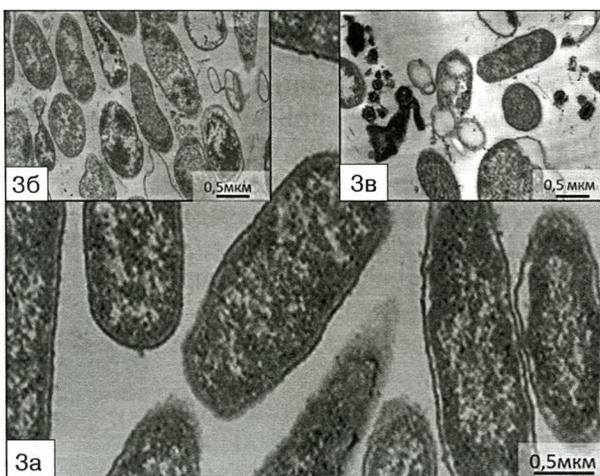


Рис. 3. ТЭМ. Ультратонкий срез 24-часовой бактериальной культуры *E. coli* M17 с внутренней поверхности мочевого катетера Фолея в бульоне с сердечно-мозговой вытяжкой.

а — фрагмент бактериальной биопленки, интактные клетки, контроль; б — деструкция клеток при воздействии Канефрона; в — деструкция клеток при воздействии Фурамага.



Рис. 4. ТЭМ. Ультратонкий срез 24-часовой бактериальной культуры *S. aureus* 193 с внутренней поверхности мочевого катетера Фолея в бульоне с сердечно-мозговой вытяжкой.

а — фрагмент бактериальной биопленки, интактные клетки, контроль; б — деструктивное воздействие на клетки Канефрона; в — деструктивное воздействие на клетки Фурамага.

выявлено большое количество деструктурированных клеток, фрагментов бактериальных клеточных стенок и клеточного детрита, что является свидетельством активного процесса лизиса клеток обеих исследуемых культур (рис. 3, 4).

Таким образом, электронно-микроскопический анализ структуры бактериальных биопленок и ультраструктурных изменений в клетках *E. coli* M17 и *S. aureus* 193 после воздействия официального препарата растительного происхождения Канефрона и препарата нитрофуранового ряда Фурамага показал активный процесс деструктивных изменений, характерных для бактерицидного воздействия препаратов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Электронно-микроскопический анализ ультратонких срезов клеток и биопленок *E. coli* M17 и *S. aureus* 193 при воздействии Канефрона и Фурамага продемонстрировал различные варианты изменений морфофизиологических свойств исследуемых культур при действии указанных лекарственных препаратов. Характер разрушения клеток в биопленках при воздействии Канефрона и Фурамага существенно отличался от автолитических изменений в клетках в ходе естественного отмирания, наблюдаемого в конце стационарной фазы роста культур. Ультраструктурные изменения, выявленные в клетках биопленок *E. coli* M17 и *S. aureus* 193 при воздействии Канефрона и Фурамага, свидетельствуют об определенной специфичности влияния каждого препарата на условно патогенные бактерии. При подавлении биопленок *E. coli* M17 Канефроном и Фурамагом в клетках наблюдали более глубокие деструктивные изменения, чем при воздействии на клетки *S. aureus* 193. Действие Канефрона на клетки *E. coli* M17 выражалось в усилении разреженности и гетерогенности цитоплазмы, сопровождающейся образованием глобулярных структур или пустот. Локальная деструкция цитоплазматической мембраны, в конечном итоге, приводила к разрывам клеточной стенки и лизису клеток. При действии на клетки *E. coli* M17 Фурамага также происходило изменение структуры цитоплазмы с образованием пустот и уплотнений, однако при этом отслаивание ЦПМ от наружной мембраны приводило не к разрыву клеточных стенок, а к изменению формы клеток кишечной палочки.

При исследовании на электронно-микроскопическом уровне влияния Канефрона на клетки *S. aureus* 193 наблюдали разрывы в пептидогликановых слоях клеточных стенок и их отслоение от ЦПМ, при этом отмечали хаотичные скопления остатков клеток в виде фрагментов клеточных стенок и мембран, что также свидетельствовало о гибели клеток в микробных сообществах. Фурамаг при воздействии на клетки *S. aureus* 193 вызывал разрушение ЦПМ и клеточных стенок, разрыхление цитоплазмы, и в конечном итоге, лизис клеток.

Таким образом, анализ ультратонкого строения клеток условно патогенных бактерий при воздействии Канефрона и Фурамага дает основание предполагать, что гибель клеток происходит в результате деструкции клеток вследствие прямого или опосредованного воздействия на цитоплазматическую мембрану и их клеточную стенку данных лекарственных препаратов.

В настоящее время хорошо известно, что большая часть инфекционной патологии человека связана с формированием бактериальных биопленок на различных поверхностях организма. Развитие микробных сообществ может происходить в присутствии влаги повсеместно, поэтому как биогенные, так и абиогенные субстраты могут быть колонизированы микроорганизмами, а

следовательно, на них формируются биопленки [4, 8]. Исследованию развития биопленок на мочевых катетерах посвящено множество работ [7].

Накопленный в настоящее время обширный экспериментально-клинический материал по оценке эффективности антимикробного воздействия на мочевые катетеры свидетельствует, что условия лабораторной диагностики достаточно далеки от реальных, при которых бактерии в организме пациентов с КАИ существуют в виде биопленок.

Методами электронной микроскопии доказано наличие микробных биопленок не только в области просвета катетера, но и на внешней его стороне. Показано, что биопленки на катетерах, установленных на срок менее 10 дней, формируются в основном на их внешней поверхности, а у катетеров, установленных на более длительное время — в просвете [16].

Опубликованы многочисленные данные о различных способах предотвращения развития микроорганизмов на поверхности катетеров. С целью предупреждения осложнений КАИ созданы материалы для изготовления катетеров с пониженной адгезивностью [11]. Кроме того, разработаны специфические материалы для катетеров с различного рода пропитками, включающие серебро и антимикробные препараты и т.д. [6].

К сожалению, на практике указанные разработки продемонстрировали недостаточно высокую эффективность, и на сегодняшний день основные меры профилактики, направленные на уничтожение микроорганизмов в мочевых путях и на поверхности мочевых катетеров, включают периодические промывания катетеров раствором борной кислоты (2%), калия перманганата (1:5000), оксицианистой ртути (1:10 000) и фурацилина (1:5000). Но в Европейско-азиатских рекомендациях по ведению пациентов с инфекциями, связанными с уретральными катетерами, и по профилактике КАИ, подчеркивается: «Польза от антисептических средств не была установлена, в связи с чем также не рекомендуется их использование» [15]. К сожалению, можно с уверенностью констатировать, что до настоящего времени не найдены универсальные меры, позволяющие полностью предотвратить развитие инфекционных агентов на поверхности мочевых катетеров.

Исследования, представленные в данной работе, показали, что Канефрон и Фурамаг — это препараты, которые способны не только препятствовать развитию биопленок патогенных микроорганизмов на поверхности мочевых катетеров, но и подавлять уже сформированные биопленки, что существенно снижает риск возникновения восходящей инфекции при длительной катетеризации мочевого пузыря. Важным фактом является показанное одновременно микробиологическими и электронно-микроскопическими методами подавление развития биопленок *S. aureus* 193 — культуры с выявленным геном биопленкообразования (*ica+*), что делает этот штамм более агрессивным в отношении организма-хозяина.

Обработка мочевых катетеров Канефроном и Фурамагом (в виде раствора исходной концентрации и 10 мкг/мл соответственно) способствовала разрушению сформированных бактериальных биопленок, что приводило к снижению обсемененности микроорганизмами, а также уменьшению процесса микробной контаминации всего организма. Воздействие Канефроном и Фурамагом можно проводить в качестве мероприятия, дополняющего классическую антисептическую обработку, а также в тех случаях, где она нежелательна. По сравнению с классическими схемами обработки мочевых катетеров применение указанных препаратов эффективно подавляет сформировавшиеся бактериальные биопленки, ускоряя процесс выздоровления пациентов.

Данный метод обработки мочевых катетеров в комплексном лечении пациентов с осложненными формами КАИ является эффективным дополнением к имеющимся способам предотвращения осложнений различных форм уропатологий. Показано, что выработка бактериями в составе биопленок сигнальных молекул QS-системы, обладающих иммуномодулирующими свойствами, способна обеспечить возбудителю преимущество при развитии хронического воспалительного процесса, особенно в организме иммунокомпрометированных пациентов. По-видимому, данный метод обработки мочевых катетеров способствует подавлению развития бактериальных биопленок путем воздействия, в первую очередь, на отдельные микробные клетки. Данные препараты могут быть использованы в качестве успешно дополняющих классическую схему антисептики у пациентов с осложненными формами КАИ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вдовиченко В.П., Бронская Г.М., Коршак Т.А., Казакевич Д.В., Соколов Н.К., Шеврук А.Н., Акуленец Е.В. Нитрофураны в фармакотерапии инфекций мочевыводящих путей. Медицинские новости. 2012, 3: 38-41.
2. Гресь А.А., Вошула В.И., Рыбина И.Л. и др. Мочекаменная болезнь: опыт применения и эффективность Канефрона Н. Медицинские новости. 2004, 8: 89-93.
3. Рыбальченко О.В. Электронно-микроскопическое исследование межклеточных взаимодействий микроорганизмов при антагонистическом характере взаимоотношений. Микробиология. 2006, 75 (4): 550-555.
4. Рыбальченко О.В., Бондаренко В.М. Биопленкообразование как форма существования индигенных и транзиторных представителей микробиоты кишечника. Вестник СПбГУ. 2013, 11(1): 179-186.
5. Яковлев С.В. и др. Клиническая и бактериологическая эффективность препарата «Фурамаг» у пациентов с острым циститом. Инфекции и антимикробная терапия. 2005, 7 (4): 1-6.
6. Crabtree J.H., Burchette R.J., Siddiqi R.A. et al. Efficacy of silver-ion implanted catheters in reducing peritoneal dialysis-related infections. Perit. Dial. Int. 2003, 23: 368-374.
7. Costerton J. W., Stewart P. S., Greenberg E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science. 1999, 284: 1318-1322.
8. Donlan R.M., Costerton J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin. Microbiol. Rev. 2002, 15: 167-193.
9. Dudeck M.A., Weiner L.M., Allen-Bridson K. et al. National Healthcare Safety Network (NHSN) report, data summary for 2012, device-associated module. Am. J. Infect. Control. 2013, 41: 1148-1166.
10. Fisher L.E., Hook A.L., Ashraf W. et al. Biomaterial modification of urinary catheters with antimicrobials to give long-term broad spectrum antibiofilm activity. J. Controlled Release. 2015, 202: 57-64.
11. Holme P.F., Currie E.P., Thies J.C. et al. Surface modified nanoparticles as a new, versatile, and mechanically robust nonadhesive coating: suppression of protein adsorption and bacterial adhesion. J. Biomed. Mater. Res. 2009, 91A: 824-833.
12. Katzung B.G. Basic & Clinical Pharmacology. McGraw-Hill. 2009, 9: 820-826.
13. Kurt G. N. Efficacy and safety of the phytotherapeutic drug Canephron® N in prevention and treatment of urogenital and gestational disease: review of clinical experience in Eastern Europe and Central Asia. Res. Rep. Urol. 2013, 5: 39-46.
14. Stickler D.J., Morgan S.D. Observations on the development of the crystalline bacterial biofilms that encrust and block Foley catheters. J. Hosp. Infect. 2008, 69: 350-360.
15. Tenke P., Kovacs B. et al. European and Asian guidelines on management and prevention of catheter-associated urinary tract infections. Int. J. Antimicrob. Agents. 2008 Feb, 31 (1): S68-78.
16. Toole G.A. To build a biofilm. J. Bacteriol. 2003, 185: 2687-2689.

Поступила 15.01.17

Контактная информация: Рыбальченко Оксана Викторовна, д.б.н., проф., 199034, С.-Петербург, Университетская наб., 7/9, р.т. (812)326-03-26

О.В.Бухарин, Е.В.Иванова, Н.Б.Перунова

РЕГУЛЯЦИЯ ИММУННОГО ГОМЕОСТАЗА КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА МЕТАБОЛИТАМИ БИФИДОБАКТЕРИЙ В УСЛОВИЯХ МИКРОБНОГО РАСПОЗНАВАНИЯ

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, Оренбург

Цель. Изучить продукцию цитокинов на модели лимфоцитов периферической крови под действием штамма *Bifidobacterium bifidum* 791, индуцированного метаболитами *Lactobacillus fermentum* 90Т-С4, *Escherichia coli* 157 и *Staphylococcus aureus* 209. **Материалы и методы.** В работе использованы эталонные штаммы, относящиеся к «своим» и «чужим» видам бактерий. Метод микробного распознавания «свой-чужой» (Бухарин О.В., Перунова Н.Б., 2011). Мононуклеарные лейкоциты выделяли из крови здоровых доноров методом градиентного центрифугирования в градиенте плотности фиколл-верографина (Pharmacia, Швеция). Продукция провоспалительных (IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-17) и противовоспалительного (IL-10) цитокинов исследовалась в культуре мононуклеаров методом ИФА. Результаты статистически обработаны. **Результаты.** Отмечена сходная направленность реакции лимфоцитов с дифференцировкой бифидобактериями «своих» и «чужих» видов микроорганизмов. Установлено, что в ответ на «чужие» эталонные культуры лимфоциты усиливали провоспалительный потенциал, а в отношении «своих» — противовоспалительный. Предварительное соинкубирование бифидобактерий с метаболитами *L. fermentum* 90Т-С4 усиливало противовоспалительный эффект *B. bifidum* 791, тогда как реакция лимфоцитов на бифидобактерии, индуцированные кишечной палочкой и стафилококком, была изменена в сторону провоспалительной. **Заключение.** Сочетанное однонаправленное влияние микробиоты и ее метаболической активности на уровень цитокинов может способствовать усилению защитного эффекта интестинального иммунного ответа. Способность бифидофлоры проводить первичный отбор микросимбионтов за счет межмикробного «распознавания» и дифференцированного воздействия на про- или противовоспалительный потенциал лимфоцитов — свидетельство ключевой роли бифидофлоры в поддержании гомеостаза кишечника человека.

Журн. микробиол., 2017, № 3, С. 12—18

Ключевые слова: бифидобактерии, микробное распознавание «свой-чужой», микробные метаболиты, мононуклеарные лейкоциты, цитокины

О.В.Бухарин, Е.В.Иванова, Н.Б.Перунова

REGULATION OF IMMUNE HOMEOSTASIS OF THE HUMAN INTESTINE BY METABOLITES OF BIFIDOBACTERIA UNDER CONDITIONS OF MICROBIAL RECOGNITION

Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg, Russia

Aim. To study the production of cytokines on the model of peripheral blood lymphocytes under the activity of *Bifidobacterium bifidum* 791 strain induced by *Lactobacillus fermentum* 90Т-С4, *Escherichia coli* 157 and *Staphylococcus aureus* 209 metabolites. **Materials and methods.** Reference strains of «self» and «non-self» types of bacteria were used in the investigation. «Self/non-self» microbial recognition method (Bukharin O.V., Perunova N.B., 2011). Mononuclear leukocytes were isolated from the blood of healthy donors by gradient centrifugation in ficoll-verographin density gradient (Pharmacia, Sweden). Production of pro-(IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-17) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines was investigated in mononuclear culture by ELISA method. The results are statistically processed. **Results.** Similarities in the direction of lymphocyte reaction and «self» and «non-self» microbial differentiation of bifidobacteria were found. It was determined that in reaction to «non-self» reference cultures the lymphocytes increased pro-inflammatory potential and increased anti-inflammatory potential in reaction to «self» bacteria. Preliminary

co-incubation of bifidobacteria with *L. fermentum* metabolites 90T-C4 increased anti-inflammatory effect of *B. bifidum* 791, whereas lymphocyte reaction to *E. coli* and staphylococcus induced bifidobacteria was changed to pro-inflammatory. *Conclusion.* Combined unidirectional influence of microbiota and its metabolic activity on cytokine level might enhance defence effect of intestinal immune response. The capacity of bifidoflora to carry out primary selection of microsymbionts on account of intermicrobial «recognition» and differentiated exposure to lymphocyte pro- and anti-inflammatory potential evidences the key role of bifidoflora in the human intestine homeostasis maintenance.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 3, P. 12—18

Key words: bifidobacteria, microbial «self/non-self» recognition, microbial metabolites, mononuclear leukocytes, cytokins

ВВЕДЕНИЕ

Центральная роль микроорганизмов в процессах формирования кишечного гомеостаза является ключевым моментом в микросимбиозе. Известно, что дефицит бифидофлоры в микросимбиозе отражает нарушение экологического равновесия в биотопе кишечника и отрицательно сказывается на здоровье хозяина в целом [10, 12]. *Bifidobacterium* spp. — важнейшая составляющая микросимбиоза кишечного биотопа, демонстрирующая широкий диапазон физиологических возможностей в толстом кишечнике человека [2, 7, 9]. Было показано, что бифидобактерии способны «сортировать» микробные антигены на «свои» и «чужие», осуществляя первичный отбор микросимбионтов, с последующим иницированием «сигналинга» в регуляции иммунного гомеостаза хозяина [3].

Актуальным остается изучение особенностей регуляции цитокинового ответа иммунных клеток метаболитами бифидобактерий в зависимости от микроокружения на этапе микробного распознавания ассоциантов. Известно, что сигналы, поступающие к дендритным клеткам от бифидобактерий, являются приоритетными в сравнении с другими представителями микросимбиоза [13]. Вместе с тем, в условиях истощения нормобиоты, прежде всего бифидобактерий, уменьшаются интестинальные иммунные ответы, контролируемые кишечные инфекции, вызванные *Citrobacter* spp. и *Campilobacter* spp. [6]. Предполагается, что изучение регуляции бифидобактериями иммунного гомеостаза в биотопе толстого кишечника позволяет оценить особенности иммуномодулирующей активности доминантов в зависимости от сопутствующих факторов в микросреде, включая присутствие компонентов патогена или представителей нормобиоты, что и явилось целью работы. В связи с этим, была изучена продукция цитокинов на модели лимфоцитов периферической крови под действием штамма *B. bifidum* 791, индуцированного метаболитами *L. fermentum* 90T-C4, *E. coli* 157 и *S. aureus* 209.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы эталонные штаммы бактерий Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ГосНИИ «Генетика» (*Bifidobacterium bifidum* 791, № депонента АС-1247), отечественной коллекции ГИСК им. Л.А.Тарасевича (*Lactobacillus fermentum* 90T-C4), Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «НЦЭСМП» Минздрава России (*Escherichia coli* 157, № депонента 900751), *Staphylococcus aureus* 209, № депонента 900781).

Исследуемые эталонные штаммы были условно разделены на 2 группы:

микроорганизмы, относящиеся к «своим» видам (*L. fermentum* 90T-C4) и бактерии, имеющие признаки «чужеродности» (*E. coli* 157 и *S. aureus* 209). Основанием к разделению штаммов послужили ранее проведенные эксперименты с использованием алгоритма микробного распознавания «свой-чужой» [1], где индикатором являлась культура *B. bifidum* 791.

В данной работе в экспериментах *in vitro* штамм *B. bifidum* 791 (доминант) индуцировали метаболитами *L. fermentum* 90T-C4, *E. coli* 157 и *S. aureus* 209 (ассоциант) методом предварительного соинкубирования при реализации алгоритма «свой-чужой». Для этого были получены метаболиты (супернатанты) лактобациллы, стафилококка и кишечной палочки (эталонные культуры). Бульонные культуры *L. fermentum* 90T-C4, *E. coli* 157 и *S. aureus* 209 центрифугировали (3200 об/мин 15 минут) и пропускали внеклеточную жидкость через мембранные фильтры «Millipore» с диаметром пор 0,2 мкм. Метаболиты эталонных культур соинкубировали со взвесью *B. bifidum* 791 (9×10^8 КОЕ/мл, 3 McF) в соотношении 1:2 в течение 1 часа в CO₂-инкубаторе (Binder, Германия). В контрольной пробе к штамму бифидобактерий вместо супернатантов эталонных культур добавляли питательный бульон в эквивалентном соотношении. После соинкубирования контрольные и опытные пробы трижды отмывали физраствором (0,9% NaCl), ресуспендировали в питательном бульоне Schaedler (BBL, США) и культивировали в течение 48 часов в CO₂-инкубаторе (Binder, Германия).

Далее было оценено влияние метаболитов индуцированных и контрольных проб бифидобактерий, а также метаболитов эталонных культур на продукцию цитокинов лимфоцитами периферической крови при культивировании мононуклеаров в полной культуральной среде. Мононуклеарные лейкоциты выделяли в стерильных условиях из гепаринизированной крови здоровых доноров методом градиентного центрифугирования (400g) в градиенте плотности фиколл-верографина (Pharmacia, Швеция) плотностью 1,077г/см³. Продукцию цитокинов изучали в культуре мононуклеаров, сокультивируемой с метаболитами бактерий (опыт) и без добавления метаболитов (контроль, спонтанная продукция) после 24-часовой инкубации клеток (2×10^6) при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в полной культуральной среде RPMI-1640 с добавлением

Таблица 1. Иммунорегуляторный эффект метаболитов эталонных культур на модели периферических мононуклеарных клеток

Цитокины	Супернатант	Контроль (спонтанная продукция цитокинов ПМК), пг/мл	Опыт (продукция цитокинов ПМК при влиянии метаболитов культур), пг/мл			
			<i>B. bifidum</i> 791	<i>S. aureus</i> 209	<i>E. coli</i> 157	<i>L. fermentum</i> 90T-C4
INF-γ		18,1±1,2	9,1±1,1*	18,4±1,3	39,1±2,0*	7,6±0,2*
TNF-α		42,0±2,4	14,3±0,4*	110,6±5,6*	17,9±0,3*	13,1±1,1*
IL-6		171,0±3,7	169,0±4,3*	210,0±3,1*	35,0±2,2*	113,0±4,2*
IL-17		140,5±3,2	36,8±3,1*	137,3±2,6	148,3±3,4	30,0±1,3*
IL-10		50,03±1,1	102,0±2,5*	77,5±3,4*	48,0±1,6	30,3±2,1*
Эффект			↓Th1, ↓Th17/↑Th10 Противовоспалительный эффект и иммуномодуляция (поддержание ауто-толерантности и иммунного гомеостаза)	↑Th2 Воспалительный эффект, активация гуморального иммунитета	↑Th1/↓Th2 Воспалительный эффект, активация врожденного и Т-клеточного иммунитета	↓Th1, ↓Th2, ↓Th17 Противовоспалительный эффект

Примечание. * Наличие различий между показателями спонтанной продукции цитокинов ПМК (контроль) и индуцированной супернатантами эталонных культур (опыт), при $p < 0,05$.

10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma-Aldrich, США) и 80 мкг/мл гентамицина. Через сутки собирали супернатанты и замораживали (-20°C) для дальнейшего определения в них уровня цитокинов. В супернатантах мононуклеарных лейкоцитов в контрольных и опытных пробах измеряли ряд про- (IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-17) и противовоспалительного (IL-10) цитокинов методом ИФА с использованием тест-систем «Цитокин», Россия. Регистрацию результатов проводили на фотометре «Multiskan» (Labsystems, Финляндия). Результат влияния метаболитов микроорганизмов на мононуклеары оценивали по изменению концентрации цитокинов в культуральной среде, выражали в пг/мл.

Полученные данные статистически обработаны в компьютерной оболочке Windows с помощью процессора электронных таблиц Microsoft Office Excel и программы «Биостат» путем подсчета средней арифметической (M) и средней ошибки средней величины (m). Данные по определению регулирующего влияния бифидобактерий на продукцию цитокинов лимфоцитами — непараметрическими методами с применением критерия Манна-Уитни. Во всех процедурах статистического анализа уровень значимости $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При оценке влияния метаболитов *B. bifidum* 791 и исследуемых тест-культур на продукцию цитокинов лимфоцитами периферической крови было установлено, что под действием метаболитов бактерий у периферических мононуклеарных клеток (ПМК) изменялся профиль и уровень цитокинов (табл. 1).

В ответ на присутствие в культуральной среде метаболитов *B. bifidum* 791 у лимфоцитов по сравнению с контролем (спонтанная продукция) в 2,5 раза повышалась способность синтезировать противовоспалительный цитокин IL-10 и отмечался супрессирующий эффект в отношении провоспалительных цитокинов IFN- γ , TNF- α и IL-17 (на $50 \pm 0,5$; $66 \pm 0,3$ и $74 \pm 1,2\%$ соответственно), за исключением IL-6, уровень которого не изменялся. Метаболиты *L. fermentum* 90T-C4 оказывали выраженный ингибирующий эффект в отношении синтеза лимфоцитами как про-, так и противовоспалительного цитокинов. Уровень провоспалительных цитокинов снижался на 34 — 79% по сравнению с контролем, а противовоспалительного цитокина IL-10 — на $40 \pm 0,5\%$ по сравнению со спонтанной продукцией медиаторов (мононуклеары без внесения метаболитов бактерий).

Напротив, внесение в культуральную среду лимфоцитов супернатантов *E. coli* 157 и *S. aureus* 209 способствовало стимуляции продукции ряда провоспалительных цитокинов, однако профиль цитокинов различался. Под влиянием метаболитов *E. coli* 157 у лимфоцитов в 2,2 раза увеличивался синтез IFN- γ , однако снижалась способность синтезировать цитокины TNF- α и IL-6 (на $51 \pm 1,1\%$ и $60 \pm 1,4\%$ соответственно). На продукцию IL-17 и IL-10 метаболиты кишечной палочки не влияли, у лимфоцитов сохранялся конститутивный уровень продукции данных цитокинов. Супернатанты стафилококка стимулировали секрецию лимфоцитами TNF- α (в 3 раза по сравнению с контролем), IL-6 (на $20 \pm 1,1\%$) и IL-10 (на $50 \pm 2,3\%$). Вместе с тем, продукция провоспалительных цитокинов IFN- γ и IL-17 в культуральной среде не изменялась.

Полученные результаты показали, что влияние метаболитов *B. bifidum* 791 и исследуемых тест-культур на продукцию цитокинов лимфоцитами характеризовалось разнонаправленным эффектом. Так, штаммы бифидо- и лакто-

Таблица 2. Иммунорегуляторный эффект метаболитов интактного и индуцированного штамма *V.bifidum* 791 на ПМК

Цитокины	Супернатант	Контроль (спонтанная продукция цитокинов ПМК), пг/мл	Опыт (метаболиты интактного штамма <i>V.bifidum</i> 791), пг/мл	Опыт (метаболиты штамма <i>V.bifidum</i> 791, индуцированного компонентами тест-культур), пг/мл		
				<i>S.aureus</i> 209	<i>E.coli</i> 157	<i>L.fermentum</i> 90Т-С4
INF-γ		18,1±1,2	9,1±1,1*	20,0±1,4	35,1±1,3*	22,4±1,2
TNF-α		42,0±2,4	14,3±0,4*	38,2±2,1	13,5±0,4*	48,8±2,4
IL-6		171,0±3,7	169,0±4,3*	170,0±4,1	168,0±3,3	125,0±3,1*
IL-17		140,5±3,2	36,8±3,1*	34,4±2,3*	39,5±3,0*	40,7±2,1*
IL-10		50,03±1,1	102,0±2,5*	10,1±1,4*	56,0±1,5	261,4±3,3*
Эффект			↓Th1, ↓Th17 / ↑Th10 Противовоспалительный эффект и иммуномодуляция (активация и поддержание аутоотолерантности и иммунного гомеостаза)	↓Th10 Снижение аутоотолерантности	↑Th1 Активация врожденного и Т-клеточного иммунитета	↓Th2, ↓Th17/↑Th10 Противовоспалительный эффект и иммуномодуляция (активация и поддержание аутоотолерантности и иммунного гомеостаза)

Примечание. * Наличие различий между показателями спонтанной продукции цитокинов ПМК (контроль) и индукции цитокинов ПМК при влиянии метаболитами интактного штамма *V.bifidum* 791 и метаболитами штамма *V.bifidum* 791, индуцированного компонентами эталонных культур (опыт), при $p < 0,05$.

бацилл интенсивно подавляли *in vitro* секрецию системного флогенного цитокина TNF-α и усиливали противовоспалительный эффект ингибирующим влиянием на продукцию провоспалительных цитокинов IFN-γ, IL-6 и хемокина IL-17. У культуры бифидобактерий отмечался стимулирующий эффект в отношении противовоспалительного цитокина IL-10, что сопоставимо с литературными данными [11, 13] и имеет значение в поддержании аутоотолерантности и иммунного гомеостаза в условиях биотопа толстого кишечника человека. И напротив, у лимфоцитов, являющихся эффекторами адаптивного иммунитета, под влиянием метаболитов *E. coli* 157 и *S. aureus* 209 усиливался провоспалительный потенциал за счет повышения продукции провоспалительных цитокинов. Причем, в первом случае отмечена стимуляция ключевого цитокина IFN-γ, способствующего поляризации Th1-лимфоцитов, активирующих макрофаги, врожденный и Т-клеточный иммунитет, на фоне снижения уровня медиаторов Th2-иммунного ответа. Добавление к монокультурам метаболитов стафилококка способствовало увеличению в среде количества Th2 цитокинов, активирующих механизмы гуморального иммунитета. Не исключено, что стимуляция продукции IL-10 в ответ на метаболиты *S. aureus* 209 не случайна, поскольку между Th1 и Th2 существуют отношения антагонизма, реализуемые с участием продуктов — соответственно IFN-γ и IL-10 [5].

На заключительном этапе исследований был проведен анализ способности метаболитов *V. bifidum* 791, индуцированных компонентами эталонных культур, влиять на продукцию цитокинов лимфоцитами периферической крови. Было установлено (табл. 2), что предварительное соинкубирование штамма *V. bifidum* 791 с метаболитами *L. fermentum* 90Т-С4, *E. coli* 157 и *S. aureus* 209 влияло на способность бифидобактерий изменять концентрацию цитокинов в среде. Так, под действием метаболитов бифидобактерий, предварительно обработанных кишечной палочкой, в сравнении с эффектом интактных метаболитов *V. bifidum* 791, ингибирующий эффект в отношении IFN-γ сменялся на стимулирующий, в результате в среде в 1,9 раза увеличивалась продукция

данного цитокина. Стимулирующий эффект в отношении IL-10, характерный для метаболитов интактных бифидобактерий, отменялся, и уровень цитокина в среде соответствовал спонтанной продукции лимфоцитов. Супрессирующий эффект в отношении провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-17 сохранялся. Предварительное соинкубирование *B. bifidum* 791 с экзометаболитами *S. aureus* 209 приводило к тому, что метаболиты бифидобактерий способствовали подавлению продукции лимфоцитами противовоспалительного цитокина IL-10 и отмене ингибирующего влияния на уровень провоспалительных цитокинов IFN- γ , TNF- α и IL-6. Напротив, воздействие индуцированного штамма бифидобактерий метаболитами *L. fermentum* 90T-C4 характеризовалось усилением стимулирующего эффекта (в 5,2 раза по сравнению с интактными метаболитами бифидобактерий) в отношении синтеза лимфоцитами противовоспалительного цитокина IL-10 и появлению ингибирующего эффекта в отношении IL-6 (на $30 \pm 2,3\%$ в сравнении со спонтанным уровнем продукции).

ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнивая результаты микробного распознавания «свой-чужой», реализуемого штаммом *B. bifidum* 791, со способностью лимфоцитами дифференцированно отвечать синтезом цитокинов на компоненты тест-культур, можно отметить сходство в реакции распознавания, что подтверждает универсальность способности отличать «своих» от «чужих» как одного из фундаментальных свойств живых организмов [4]. По-видимому, бифидобактерии наряду со способностью иммуноцитов, усиливающих свой про- или противовоспалительный потенциал в ответ на метаболиты бактерий, занимаются отбором микросимбионтов, оппозиционно (усиление/подавление) регулируя базовые физиологические критерии (репродукции и адаптации) микроорганизмов в паре «доминант-ассоциант». Этот факт свидетельствует о том, что механизмы хозяина и микробиоты, являясь единым звеном в регуляции кишечного гомеостаза человека, вовлечены в тесное сотрудничество для своего синергидного существования в целях сохранения симбиоза.

Полученные результаты по изучению влияния экзометаболитов индуцированных бифидобактерий на продукцию цитокинов мононуклеарами периферической крови человека в системе *in vitro* характеризуют определенные различия в направленности воздействия штамма *B. bifidum* 791 на эффекторы иммунитета с учетом предварительного соинкубирования с метаболитами патогена или представителей нормобиоты. Причем, характер изменения иммуномодулирующего влияния индуцированных бифидобактерий имеет определенное сходство в направленности воздействия на эффекторы иммунитета с особенностями влияния самих тест-культур. Стимулирующий эффект продукции мононуклеарами Th1 медиаторов наблюдался как под действием кишечной палочки, так и при влиянии метаболитов штамма *B. bifidum* 791, индуцированного метаболитами *E. coli* 157. Таким образом, в условиях биотопа толстого кишечника человека сочетанное однонаправленное влияние микробиоты и ее метаболической активности на индукторы иммунитета может способствовать усилению эффектов интестинального иммунного ответа на присутствие патогена в среде. Наряду с этим доминантные микроорганизмы реализуют «хелперную» функцию посредством микробного распознавания через подавление биологических свойств патогена, способствуя его элиминации из биотопа [1, 2]. К защитному действию бифидофлоры также можно отнести ее способность усиливать противовоспалительный потенциал моно-

нуклеаров и стимулировать репродукцию и адаптацию «своего» микросимбионта (*L. fermentum* 90T-C4). В целом, это может способствовать колонизации нормобиоты и поддержанию аутоотолерантности и иммунного гомеостаза в биотопе толстого кишечника.

Таким образом, поддержание кишечного гомеостаза толстого кишечника человека реализуется через феномен микробного распознавания «свой-чужой», проявляющегося в способности бифидофлоры проводить первичный отбор микросимбионтов за счет оппозитного (усиление/подавление) влияния на базовые физиологические критерии ассоциантов и дифференцированного воздействия на про- или противовоспалительный потенциал лимфоцитов. Ранее выявленная способность сигналов от бифидобактерий через TLR-2 перекрывать и вытеснять сигналы от других микросимбионтов на дендритные клетки [8, 12, 13], являющиеся важным клеточным звеном врожденного и адаптивного иммунитета, в совокупности с полученными результатами могут свидетельствовать о ключевой роли бифидофлоры в процессах иммуномодуляции и поддержания кишечного гомеостаза человека.

Работа выполнена при грантовой поддержке по программе Президиума РАН № 7, проект 12-П-4-1045 «Изучение интеграционных механизмов межмикробных взаимоотношений микросимбионтов кишечной микробиоты человека» и проекта фундаментальных исследований УрО РАН № 15-5-4-7 «Роль бифидофлоры в формировании гомеостаза человека».

ЛИТЕРАТУРА

1. Бухарин О. В., Перунова Н. Б. Микросимбиоз. Екатеринбург: УрО РАН, 2014.
2. Бухарин О.В., Перунова Н.Б., Иванова Е.В. Бифидофлора при ассоциативном симбиозе человека. Екатеринбург: УрО РАН, 2014.
3. Бухарин О.В., Иванова Е.В., Перунова Н.Б., Чайникова И.Н. Роль бифидобактерий в формировании иммунного гомеостаза человека. Журн. микробиол. 2015, 6: 98-104.
4. Марков А.В., Куликов А.М. Гипотеза иммунологического тестирования партнеров — согласованность развития адаптаций и смены половых предпочтений. Изв. РАН. Сер. Биол. 2006, 3:261-274.
5. Хаитов Р.М. Физиология иммунной системы. М: ВИНТИ РАН, 2001.
6. Hapfelmeier S., Lawson M.A., Slack E. et al. Reversible microbial colonization of germ-free mice reveals the dynamics of IgA immune responses. Science. 2010, 328 (5986): 1705-1709.
7. Milani C., Lugli G. A., Duranti S. et al. Genomic encyclopedia of type strains of the genus *Bifidobacterium*. Appl. Environ. Microbiol. 2014, 80: 6290-6302.
8. Nelson K.E. Metagenomics of the Human Body. 2011.
9. O'Callaghan A., van Sinderen D. Bifidobacteria and their role as members of the human gut microbiota. Front. Microbiol. 2016, 7: 925.
10. Rivière A., Selak M., Lantin D. et al. Bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria: importance and strategies for their stimulation in the human. Gut. Front. Microbiol. 2016, 7: 1-21.
11. Tomosada Y., Villena J., Murata K. et al. Immunoregulatory effect of bifidobacteria strains in porcine intestinal epithelial cells through modulation of ubiquitin-editing enzyme A20 expression. PLoS One. 2013, 8 (3): e59259. doi: 10.1371/journal.pone.0059259.
12. Turroni F., Berry D., Ventura M. (Ed.) Bifidobacteria and their role in the human gut microbiota. Front. Microbiol. 2017, 7: 2148. doi: 10.3389/fmicb.2016.02148.
13. Zeuthen L.H., Fink L.N., Frokiaer H. Epithelial cells prime the immune response to an array of gut-derived commensals towards a tolerogenic phenotype through distinct actions of thymic stromal lymphopoietin and transforming growth factor-beta. Immunology. 2008, 123 (2): 197-208.

Поступила 20.02.17

Контактная информация: Бухарин Олег Валерьевич, д.м.н., проф., 460000, Оренбург, ул. Пионерская, 11 п.т. (3532)77-54-17

Н.И.Брико¹, Е.В.Глушкова¹, Д.А.Клейменов¹,
Н.Ф.Дмитриева¹, К.В.Липатов¹, А.В.Девяткин², В.Е.Маликов²

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ШТАММОВ STREPTOCOCCUS PYOGENES, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ БОЛЬНЫХ С ИНФЕКЦИЕЙ МЯГКИХ ТКАНЕЙ И АНГИНАМИ

¹Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова,
²Клиническая инфекционная больница № 1, Москва

Цель. Сравнить молекулярно-биологические свойства и чувствительность к антибиотикам культур стрептококков группы А (СГА) в группах больных с инфекцией мягких тканей и респираторной инфекциями. *Материалы и методы.* Были исследованы 86 культур СГА, выделенных от больных с респираторными инфекциями и 91 — с инфекцией мягких тканей. Определение чувствительности к шести антибиотикам (клиндамицин, эритромицин, азитромицин, кларитромицин, тетрациклин, левофлоксацин) проводили методом микроразведений. При emm-типировании и выявлении генов SpeA, SpeB и SpeC использовали ПЦР и секвенирование. *Результаты.* В группе больных с инфекцией мягких тканей преобладали emm-типы 49, 66, 88 и 169, а в респираторной — 1, 3, 12, 28, 75, 89. Один штамм оказался новым. Выделенные культуры являлись представителями трех паттернов (А-С, D, E); 116 штаммов обеих групп были отнесены к паттерну E. Паттерн D был представлен 15 штаммами (21%) исключительно из группы инфекций мягких тканей. Более половины культур, полученных от больных с инфекцией мягких тканей, были резистентны к тетрациклину. Устойчивость к макролидам определялась в обеих группах. Полирезистентные штаммы были выделены в каждой из исследуемых групп. Гены эритрогенных токсинов А и С чаще встречались у респираторных культур. *Заключение.* Группа респираторных СГА менее гетерогенна по emm-типовому составу. Ни один из глоточных штаммов СГА не был отнесен к паттерну D. Ген эритрогенного токсина speA в два раза чаще определялся у респираторных культур. Применение тетрациклина и макролидов было бы неэффективно приблизительно в половине случаев среди больных с инфекцией мягких тканей.

Журн. микробиол., 2017, № 3, С. 19—26

Ключевые слова: стрептококки группы А, инфекции мягких тканей, респираторные инфекции, гены эритрогенных токсинов

Н.И.Брико¹, Е.В.Глушкова¹, Д.А.Клейменов¹,
Н.Ф.Дмитриева¹, К.В.Липатов¹, А.В.Девяткин², В.Е.Маликов²

ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY AND MOLECULAR PROPERTIES OF STRAIN STREPTOCOCCUS PYOGENES FROM PATIENTS WITH SOFT TISSUE INFECTIONS AND ANGINA

¹Sechenov First Moscow State Medical University, ²Infectious Clinical Hospital No. 1, Moscow, Russia

Aim. To compare the molecular properties and antibiotic susceptibility of GAS isolates in patients with respiratory and soft tissue infections. *Materials and methods.* 86 GAS isolates from patients with respiratory infections and 91 isolates with soft tissue infections were studied. The antimicrobial susceptibility profile of six antibiotics (clindamycin, erythromycin, azithromycin, clarithromycin, tetracycline, levofloxacin) was performed by the microdilution method. PCR and sequencing were used in emm-typing and detection SpeA, SpeB and SpeC genes. *Results.* Emm-types: 49, 66, 88 and 169 were the most prevalent in patients with soft tissue infections, and 1, 3, 12, 28, 75, 89 — in patients with respiratory infections. One strain was new. Isolates were representatives of the three patterns (A-C, D, E). 116 strains of both groups comprised to pattern E. 15 strains (21%) exclusively from soft tissue infections comprised to pattern D.

More than half of isolates from patients with soft tissue infections had resistant to tetracycline. Resistance to macrolides was determined in both groups. In each of the studied groups were isolated strains with multidrug resistant. Erythrogenic toxins gene A and C was more frequently in respiratory isolates. *Conclusion.* The group of respiratory GAS was less heterogenic in emm-types composition. Pattern D was not contain any pharyngeal GAS strains. Erythrogenic toxin gene speA was identified twice as likely in respiratory isolates. The use of tetracycline and macrolides would be ineffective in approximately half of the cases among the patients with soft tissue infections.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 3, P. 19—26

Key words: group A streptococci, soft tissue infections, respiratory infections, erythrogenic toxins gene

ВВЕДЕНИЕ

Стрептококки группы А вызывают целый ряд заболеваний от инфекций верхних дыхательных путей (фарингиты, тонзиллиты, ангины и др.) до поражений кожи и мягких тканей (рожа, импетиго и др.), а также постстрептококковых аутоиммунных (ревматизм, гломерулонефрит) и токсико-септических осложнений [2]. Имеются сообщения о новых постстрептококковых состояниях, таких как летаргический энцефалит, обсессивно-компульсивное расстройство и тики [13, 15]. Ангины и фарингиты можно отнести к наиболее частым первичным стрептококковым (группы А) инфекциям (СГА). По данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) в мире каждый год регистрируется свыше 616 млн случаев фарингитов СГА-этиологии [7]. На территории РФ, начиная с 2000 г., СГА-инфекция ежегодно отмечалась среди 3,1 млн человек (207,1 на 10 000 населения). Удельный вес детей среди заболевших составлял в РФ 33% (991 тыс. случаев, или 389,7 на 10 000 населения), подростков — 9% (273,9 тыс. случаев, или 377,8 на 10 000 населения ежегодно), взрослых — 58% (более 1,7 млн случаев, или 154,8 на 10 000 населения ежегодно) [4]. Также регистрируются и такие генерализованные состояния, как некротическая рожа и некротизирующий фасциит, пневмонии стрептококковой этиологии, менингиты, которые нередко приводят к развитию синдрома токсического шока (СТШ) и наряду с сепсисом относятся к инвазивным формам стрептококковой инфекции (ИСИ). В целом, около 19% пациентов с инвазивной стрептококковой инфекцией умирают в течение 7 дней от начала заболевания и 44% — со стрептококковым токсическим шоком. Ежегодно регистрируется 700 миллионов случаев СГА-инфекции, из которых 650 000 случаев — инвазивные и 163 000 случаев — смертельные. По имеющимся данным на 2011 год летальность при некротическом фасциите в Европе составляла 32%, при целлюлите — 17%, при СТШ — 44%, а в Новой Каледонии и на Фиджи все случаи СТШ закончились смертельным исходом [15].

В эпидемиологических исследованиях во всех странах мира для характеристики штаммов широко используется классификация возбудителей по emm-генотипам. В настоящее время выделяют более 200 emm-типов. Определенные типы *S. pyogenes* часто ассоциируются с развитием той или иной формы СГА-инфекции. Так, в большинстве стран Европы с инвазивной СГА-инфекцией связывают emm-типы 1,3,12 и 28 [11]. В последние годы исторически сложившееся разделение штаммов СГА на «кожные» и «глочные» получило молекулярно-генетическую основу. Было показано, что все штаммы (emm-типы) по структуре и расположению в ДНК определенных

генов распределяются в группы или паттерны — «throat» (A-C), «skin» (D) и «generalist» (E)[6]. Более того, эти группы emm-типов разделяются на кластеры, объединяющие близкородственные emm-типы [12].

Целью данного исследования было сравнение молекулярно-биологических свойств и чувствительности к антибиотикам культур СГА, выделенных от больных с инфекциями мягких тканей, с таковыми от больных ангинами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование больных и биологического материала проводили с мая 2008 года по март 2011 года в гнойно-хирургическом отделении одного из стационаров Москвы. В первую группу включали больных с СГА-инфекцией мягких тканей гнойно-хирургического отделения ГКБ № 23 (n=90). Ко второй группе относили больных острой респираторной СГА-инфекцией отделения отоларингологии ИКБ № 1 (n=86). Биологический материал от пациентов с инфекцией мягких тканей получали во время операции при первичном нарушении целостности кожного покрова. У пациентов с острой респираторной СГА-инфекцией отбор проб производили в соответствии с рекомендациями ВОЗ. Исследуемого просили наклонить голову назад и глубоко дышать. Язык фиксировали шпателью таким образом, чтобы были видны миндалины и задняя стенка глотки. Тампон быстро и осторожно вводили в рот, стараясь не прикасаться к языку и зубам, чтобы избежать контаминации его микроорганизмами-комменсалами, и с легким надавливанием на поверхность миндалин и задней стенки глотки энергично снимали слизистое отделяемое [5]. Образец биоматериала засекали на кровяной агар с 5% крови барана. После учета результатов первичного посева выделяли чистую культуру и культивировали ее в бульоне Todd-Hewitt в течение 18 часов при 37°C. Идентификацию стрептококков группы А проводили методом латекс-агглютинации с использованием набора реагентов для групповой идентификации (Slidex Strepto-Kit bioMérieux, Франция). Основную часть молекулярно-генетических процедур (выделение геномной ДНК, ПЦР-реакция, электрофорез) осуществляли в соответствии с описанными рекомендациями [3].

Наличие генов бактериофаговых токсинов *speA*, *speB*, *speC* определяли методом ПЦР при условиях, определенных ранее [1]; emm-типирование культур СГА проводили согласно стандартным протоколам, рекомендованным Центром по контролю и профилактике заболеваний США (CDC) http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/protocol_emm-type.htm. Фрагменты ДНК выделяли из агарозного геля посредством набора Bacterial Genomic DNA Miniprep kit (Axugen, США). Секвенирование ДНК проводили с использованием набора BigDye v.3.1 (Applied Biosystems) на генетическом анализаторе ABI 3130x1 согласно инструкции производителя. С целью установления emm-типа и emm-подтипа штаммов полученные последовательности сравнивали с данными, опубликованными в Streptococcus pyogenes emm-sequence database (<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/strepblast.htm>).

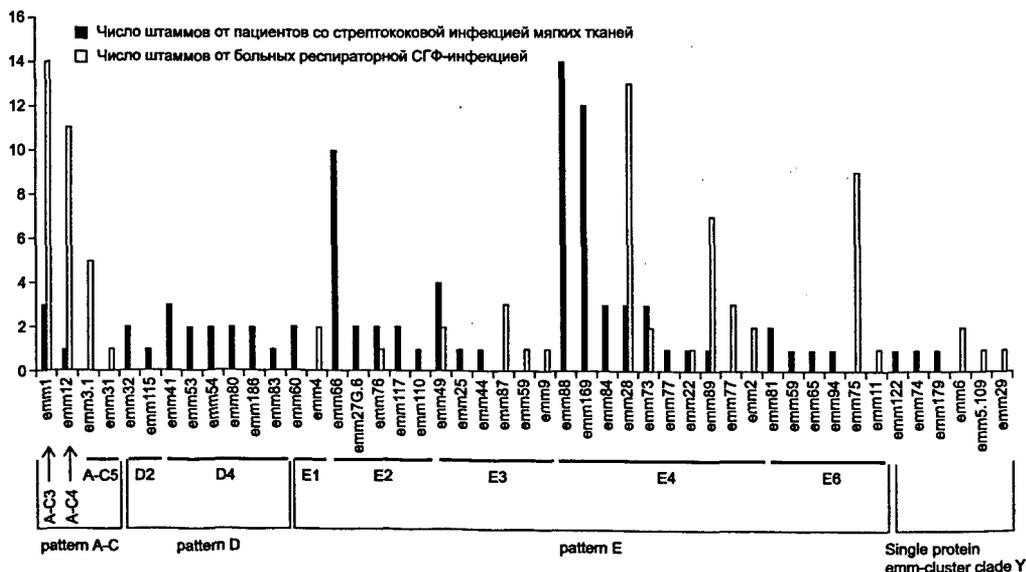
Определение чувствительности к антибиотикам проводили методом микроразведений в катион-сбалансированном бульоне Мюллера-Хинтона (BBL, США) с добавлением лизированной лошадиной крови (итоговая концентрация 5%). Для приготовления бактериальной суспензии чистую суточную культуру микроорганизмов разводили в стерильном 0,9% растворе хлорида натрия до мутности, эквивалентной 0,5 по стандарту МакФарланда. Инкубация микротитровальных планшетов проводилась при температуре 35°C в течение 18±2 ч в обычной атмосфере. Контроль качества с использованием

контрольного штамма *S. pneumoniae* ATCC 49619 проводился при каждой постановке чувствительности. Интерпретация результатов определения чувствительности проводилась согласно критериям Европейского комитета по определению чувствительности (EUCAST, v. 4.1.). В обеих группах у выделенных стрептококков группы А была определена чувствительность к тетрацилину, макролидам (азитромицину, эритромицину, кларитромицину), левофлоксацину, клиндамицину.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате проведенного генотипирования штаммов СГА от больных с инфекцией мягких тканей среди 90 культур выявили 34 различных emm-типа. Основное количество составили emm49 (n=4, или 4,3%), emm66 (n=10, или 11%), emm88 (n=14, или 15,4%) и emm169 (n=12, или 13,2%), остальные представлены одним, двумя или тремя культурами (рис.) Среди 86 культур от больных с респираторной СГА-инфекцией был выделен 21 различный emm-генотип. Основную часть (70,9%) составили штаммы со следующими emm-генотипами: 1 (n=14), 3 (n=5), 12 (n=11), 28 (n=13), 75 (n=9), 89 (n=8). Распределение по emm-типам оставшихся 26 культур проиллюстрировано на рис. Один штамм (выделен из зева больной острым тонзиллитом) оказался новым субгенотипом пятого emm-генотипа. Специалисты лаборатории изучения стрептококков Центра по контролю и профилактике заболеваний США подтвердили данный факт и присвоили ему номер emm5.109.

Среди выделенных нами культур встречались представители каждого из трех паттернов. В нашем исследовании наибольшее количество штаммов СГА (116) входили в паттерн Е. Штаммы двадцати девяти emm-типов данного паттерна обеих исследуемых групп относились к 5 кластерам: E1, E2, E3, E4 и E6. По данным литературы emm-типы, относящиеся к паттерну Е, выделяют как при кожных, так и при глоточных формах [13]; 68 культур (76%) двадцати одного emm-типа паттерна Е были выделены при инфекциях мягких тканей. Наиболее часто встречавшиеся культуры были типированы как emm49, emm66,



Распределение исследуемых культур СГА по emm-типам, кластерам и паттернам.

emm88, emm169. Из респираторной группы в паттерн Е вошли 48 образцов (58%) четырнадцати emm-типов. В данной клинической группе наибольшее число штаммов оказалось 28, 75 и 89 emm-типов. Паттерн А-С был представлен 3 кластерами А-С3, А-С4 и А-С5, к которым относился 31 штамм (37%) четырех emm-типов из респираторной группы и 4 штамма (4,4%) двух emm-типов из группы инфекций мягких тканей. «Кожный» паттерн D был представлен 15 штаммами (21%) исключительно из группы инфекций мягких тканей, при этом восемь emm-типов относились к D2 и D4 кластерам. Штаммы шести emm-типов (по три из каждой исследуемой группы) относились к так называемым однопротеинным emm-кластерам (рис.).

В группе с инфекцией мягких тканей наибольшее количество культур проявили резистентность к тетрациклину ($n=46$, 50,5%). У 44 штаммов (48,4%) наблюдалась устойчивость к макролидам: только к азитромицину невосприимчивы были 15 (16,4%) образцов, к кларитромицину и эритромицину — по 14 (15,4%). К клиндамицину и левофлоксацину оказались нечувствительными 5 (5,5%) и 1 (1,1%) штаммов соответственно. Ко всем протестированным препаратам были чувствительны 43,96% ($n=40$) образцов. Только к тетрациклину были устойчивы 27 культур (29,7%). У двух штаммов помимо устойчивости к тетрациклину была выявлена резистентность к другим антибиотикам (один — к левофлоксацину и еще один — ко всем трем представителям макролидов: азитромицину, кларитромицину и эритромицину). Два образца были устойчивы к макролидам, четыре — к тетрациклину, 13 имели устойчивость к трем и более препаратам (являлись полирезистентными).

В группе культур, выделенных от больных респираторными формами СГА-инфекции, устойчивостью только к тетрациклину обладали 2 культуры, к клиндамицину — 2, к левофлоксацину — 1. Два штамма были полирезистентны и обладали устойчивостью ко всем представителям макролидов.

При изучении распределения устойчивости к антибиотикам по кластерам было установлено, что в группе респираторных инфекций устойчивость к одному антимикробному препарату имели представители паттернов А-С и Е. Среди них к тетрациклину были резистентными штаммы кластеров А-С5 ($n=1$) и Е4 ($n=2$), а к клиндамицину — Е6 ($n=1$). Два полирезистентных штамма были представителями одного паттерна (Е).

В группе инфекций мягких тканей 17 штаммов паттерна Е и 9 паттерна D были устойчивы только к тетрациклину. В данных паттернах часть культур проявляла устойчивость к двум антибиотикам. Среди них представитель кластера Е2 был нечувствителен к азитромицину и кларитромицину, Е3 — к азитромицину и тетрациклину, Е4 — к тетрациклину и левофлоксацину, D2 — к макролидам; 12 полирезистентных штаммов оказались представителями паттерна Е. Из них все культуры кластеров Е3 ($n=4$) и Е6 ($n=1$), а также два штамма Е4 были устойчивы ко всем представителям макролидов и тетрациклину, а пять культур кластера Е4 обладали резистентностью к макролидам, тетрациклину и клиндамицину.

Определение генов эритрогенных токсинов (А, В, С) дало следующие результаты. У культур, выделенных от больных СГА-инфекцией мягких тканей, ген SpeA был выявлен в 13 случаях (14,3%). Наиболее часто среди них встречались emm-генотипы: 1 ($n=3$), 49 ($n=3$), 169 ($n=3$). У всех штаммов был выявлен ген SpeB. У 52 (57,8%) культур определялся только SpeB. Ген эритрогенного токсина С определялся в 28 культурах (30,8%). Среди них встречались следующие emm-генотипы: по 3 раза — 28, 88. Все три гена эритрогенных токсинов встречались у трех культур с emm-генотипами: 28, 117, 186, которые

были чувствительны ко всем антимикробным препаратам, кроме штамма emm-186 (устойчив к тетрациклину). У семи полирезистентных штаммов с emm-генотипами 65.0 (n=1), 73.0 (n=1), 88.2 (n=5) был определен только ген SpeB. Из них штамм emm65.0 был устойчив к макролидам и тетрациклину, emm88.2 — к макролидам, клиндамицину и тетрациклину, emm73 — к макролидам и тетрациклину. Гены SpeA и SpeB были определены у 6 культур с emm-генотипами 49 (n=4), 74 (n=1), 169 (n=1), все они обладали резистентностью к макролидам и тетрациклину.

В группе с респираторной СГА-инфекцией ген SpeB был определен у всех культур. Гены эритрогенного токсина А были определены у 26 культур (30,2%). Среди них чаще всего встречались emm-генотипы: 1 (n=14), 3 (n=4), 6 (n=2), 28 (n=3); 43 культуры (50%) имели гены эритрогенного токсина SpeC. Среди культур с наличием гена эритрогенного токсина SpeC выделяли следующие 10 различных emm-генотипов: 1, 2, 4, 6, 12, 28, 58, 73, 75, 89. Наиболее часто встречающимися emm-генотипами с наличием гена эритрогенного токсина С были 12 (n=10), 28 (n=11), 75 (n=6), 89 (n=7). Все три гена эритрогенных токсинов были определены у 6 культур. Два штамма, у которых присутствовали все три гена spe (speA, speB, speC) были с emm6 генотипом (один нечувствителен к левофлоксацину) и по одному — с emm1, emm12, emm28, emm73 (чувствительны ко всем препаратам). В анамнезе у больных, от которых были получены эти культуры, были указания на наличие еще одного стрептококкового заболевания, классифицируемого в других рубриках МКБ, осложнения или ОРВИ в дополнение к основному заболеванию. У полирезистентных культур были выделены следующие гены эритрогенных токсинов: у emm28 — speB и speC, у emm76 — только speB.

ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение двух групп штаммов указывает на их существенные различия. Группа респираторных СГА менее гетерогенна по emm-типовому составу (22 emm-типа) по сравнению с группой инфекций мягких тканей (34 emm-типа). В то же время, количество доминирующих emm-типов в респираторной группе больше. В респираторной группе преобладают шесть emm-генотипов, в группе инфекций мягких тканей — четыре. Среди культур, полученных от больных с инфекцией мягких тканей, наибольшее количество культур (50,5%) проявили резистентность к тетрациклину. Культуры, устойчивые к макролидам, определялись в обеих группах (16 — в группе с инфекцией мягких тканей, 2 — с ангинами). В исследовании глоточных культур в Португалии штаммы с emm-генотипом 75 встречались только при фарингитах, а резистентность к макролидам в группе респираторных инфекций составила 21% [14]. В группе с инфекцией мягких тканей преобладали emm-генотипы: 49, 66, 88, 169, а в группе с респираторными инфекциями — 1, 3, 12, 28, 75, 89. Хотя были определены штаммы с emm-генотипами, которые встречались в двух исследуемых группах: 1, 12, 22, 28, 49, 73, 76, 77, 89, культуры с одинаковыми emm-генотипами в ряде случаев, видимо, принадлежали к разным клонам. Так, штаммы emm28 и emm76 обладали полирезистентностью в группе с респираторными формами инфекции, а в группе с инфекцией мягких тканей были либо чувствительны ко всем исследуемым препаратам, либо резистентны только к тетрациклину. Среди культур, полученных от больных с инфекцией мягких тканей, штаммы emm49 (все), emm73 (n=1) обладали полирезистентностью, а среди культур от больных с респираторной формой инфекции были чувствительны ко всем исследуемым антибиотикам. Количество полирези-

стентных штаммов в группе с инфекцией мягких тканей было в 3,5 раза больше, причем их генотипы не встречались среди полирезистентных штаммов респираторной группы.

Большая часть полирезистентных штаммов относится к часто регистрируемому *emm*-генотипам. Штаммы *emm*-генотипа 49 известны еще с середины XX века, широко распространены во многих странах мира и вызывают большое количество заболеваний, что дало основание включать его при разработке вакцинных препаратов. Интерес представляют данные по чувствительности к антибиотикам штаммов с *emm*-генотипами 65, 74 и 169, так как они являются достаточно распространенными при инфекциях мягких тканей. По данным литературы штаммы с *emm*88 не относятся к часто регистрируемым и не входят в число вакцинных [8]. В нашем исследовании культуры с *emm*88 были самыми распространенными среди заболеваний мягких тканей (15,4%) и треть из них обладали полирезистентностью.

Ген эритрогенного токсина *speA* в два раза чаще определялся в группе культур, полученных от больных респираторными формами СГА-инфекции. Этот токсин определялся у штаммов *emm*1, *emm*49, *emm*169. Эритрогенный токсин *speC* определялся у *emm*-генотипов 12, 28, 75, 88, 89.

Наибольший интерес представляют данные по паттерну D, демонстрирующие обоснованность деления штаммов СГА на глоточные и кожные. Ни один из штаммов СГА, выделенных из глотки больных, не был отнесен к этому паттерну. Данный факт дает основание заключить, что возбудитель инфекций мягких тканей данной группы больных имеет «кожное» происхождение, что может помочь в расследовании пути его передачи. Полирезистентные культуры обеих групп относились к паттерну E и были одинаково невосприимчивы ко всем представителям макролидов. В то же время, при исследовании культур СГА у детей из социально-неблагополучных районов Новой Зеландии паттерн D (кластер D4) был преобладающим, причем часть культур была выделена из глотки [14].

В исследованиях последних лет было показано, что антитела, вырабатываемые в ответ на введение 30-валентной вакцины, реагировали не только с тридцатью вакцинными *emm*-типами, но и перекрестно с *emm*-типами, не входящими в их число [9]. Полученные результаты, наряду с филогенетической системой классификации СГА, определили направление исследований по проверке возможности однокомпонентных M-типовых вакцинных препаратов защищать от СГА-инфекции, вызванной штаммом не только вакцинного *emm*-типа, а от штаммов всех *emm*-типов, входящих с ними в один кластер. Более того, если раньше отслеживались *emm*-типы, наиболее часто циркулирующие на той или иной территории, то в свете новых данных стало понятно, что достаточно охватить распространенные кластеры, что существенно упрощает задачу. Так, среди 176 исследованных культур СГА нами выявлено пятьдесят шесть *emm*-типов, которые распределились между одиннадцатью кластерами. Наблюдение за распространением кластеров может способствовать научно-обоснованному прогнозу эпидемической ситуации по СГА-инфекции, включающей как распространение определенных клонов возбудителя, так и состояние напряженности иммунитета населения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Брико Н.И., Покровский В.И., Клейменов Д.А. Распространенность и клинико-эпидемиологическая характеристика заболеваний, вызываемых стрептококком группы А в России. *Терапевтический архив*. 2009, 11: 5-9.

2. Дмитриева Н.Ф., Трофимов Д.Ю., Ещина А.С., Ряпис Л.А., Скоркина Ю.А., Герасимов А.Н., Журавлев М.В., Брико Н.И. Частота встречаемости генов *spe ABC* в штаммах *Streptococcus pyogenes* и идентификация возбудителя с помощью ПЦР. Журн микробиол. 2002, 5: 3-6.
3. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М., Мир, 1984.
4. Покровский В.И., Брико Н.И., Ряпис Л.А. Стрептококки и стрептококкозы. М., ГЭОТАР-Медиа, 2006.
5. Ряпис Л.А., Брико Н.И., Ещина А.С., Дмитриева Н.Ф. Стрептококки: общая характеристика и методы лабораторной диагностики. М., Идеал-Пресс, 2009.
6. Bessen D.E., McShan W.M., Nguyenet S.V. et al. Molecular epidemiology and genomics of group A *Streptococcus*. *Infect. Genet. Evol.* 2015, 33: 393-418.
7. Carapetis J.R., Steer A.C., Mulholland E.K. et al. The current evidence for the burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infect. Dis.* 2005, 5 (11): 685-694.
8. Cole J.N., Barnett T.C., Nizet V. et al. Molecular insight into invasive group A streptococcal disease. *Nature Rev. Microbiol.* 2011, 9: 724-736.
9. Dale J.B., Penfound T.A., Chiang E.Y. et al. New 30-valent M protein-based vaccine evokes cross-opsonic antibodies against nonvaccine serotypes of group A streptococci. *Vaccine.* 2011, 29: 8175-8178.
10. Fittipaldi N., Olsen R.J., Beres S.B. et al. Genomic analysis of emm59 group A *Streptococcus* invasive strains, United States. *EID J.* 2012, 4: 18.
11. O'Loughlin R.E., Roberson A., Cieslak P.R. et al. The epidemiology of invasive group A streptococcal infection and potential vaccine implications: United States, 2000-2004. *Clin. Infect. Dis.* 2007, 45: 853-862.
12. Sanderson-Smith M., De Oliveira D.M., Guglielmini J. et al. A systematic and functional classification of *Streptococcus pyogenes* that serves as a new tool for molecular typing and vaccine development. *J. Infect. Dis.* 2014, 210 (8): 1325-1338.
13. Swedo S.E., Leonard H.L., Garvey M. et al. Pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infections: clinical description of the first 50 cases. *Am. J. Psychiatry.* 1998, 155: 264-271.
14. Williamson D.A., Smeesters P.R., Steer A.C. et al. Comparative M-protein analysis of *Streptococcus pyogenes* from pharyngitis and skin infections in New Zealand: Implications for vaccine development. *BMC Infectious Diseases.* 2016, 16: 561.
15. Yaddanapudi K., Hornig M., Serge R. et al. Passive transfer of streptococcus induced antibodies reproduces behavioral disturbances in a mouse model of pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infection. *Mol. Psychiatry.* 2010, 15: 712-726.

Поступила 03.02.17

Контактная информация: Глушкова Екатерина Владимировна,
119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2, р.т.(499)248-69-28

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

*С.Б.Чекнев, Е.И.Вострова, М.А.Сарычева,
С.В.Кисиль, В.В.Анисимов, А.В.Востров*

ТОРМОЖЕНИЕ РОСТА БАКТЕРИЙ В КУЛЬТУРАХ *STREPTOCOCCUS PYOGENES* И *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* В ПРИСУТСТВИИ КАТИОНОВ МЕДИ И ЦИНКА

Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи, Москва

Цель. Оценка антибактериального действия миллимолярных концентраций катионов меди и цинка, примененных в виде сульфатов или хлоридов, в культурах *S.pyogenes* и *S.agalactiae*. *Материалы и методы.* Суспензию бактерий *S.pyogenes* или *S.agalactiae*, содержащую 10^8 КОЕ/мл, засеивали газоном на чашки Петри с глюкозо-сывороточным питательным агаром. Спустя 30 мин на поверхность газона с помощью 36-канального

штампа-репликатора каплями объемом по 5 мкл наносили солевые растворы меди или цинка с концентрацией по катионам металлов от 5×10^{-3} М до 5×10^{-1} М. Затем чашки с культурой бактерий инкубировали в течение суток при 37°C , после чего определяли диаметр зоны задержки роста бактерий. Для оценки наличия (отсутствия) жизнеспособных бактерий в зонах задержки роста из центра зоны производили посевы материала в пробирки с глюкозо-сывороточным питательным бульоном, которые термостатировали в течение срока до 5 суток при 37°C , после чего оценивали прозрачность питательного бульона. **Результаты.** В диапазоне концентраций металлов от 500 мМ ингибирующее действие сульфата цинка в отношении бактерий *S.pyogenes* в 1.5 — 1.7 раза ($p < 0.001$) превосходит эффекты сульфата меди. При концентрациях катионов 100 и 500 мМ действие хлорида цинка в 1.2 — 1.3 раза ($p < 0.05 - 0,1$) превосходит эффекты хлорида меди. Посевы материала из зон задержки роста культуры *S.pyogenes*, обработанных солями меди, в 67 — 85% случаев, а обработанных солями цинка в 30% наблюдений обнаруживают соответствующую контрольной прозрачность питательного бульона. В культуре *S.agalactiae* при концентрациях металла 100 и 500 мМ хлорид меди реализует на 8 — 13% ($p > 0.1$) более выраженное антибактериальное действие, чем хлорид цинка. Посевы материала из зон задержки роста культуры *S.agalactiae*, обработанных солями меди, в 48 — 67% наблюдений обнаруживают соответствующую контрольной прозрачность питательного бульона. **Заключение.** В миллимолярных концентрациях катионы меди и цинка обладают выраженным антибактериальным действием в культурах *S.pyogenes* и *S.agalactiae*. Бактерии *S.pyogenes* проявляют более высокую, чем *S.agalactiae*, чувствительность к действию катионов меди и цинка, оцениваемому по зонам задержки роста. В отличие от *S.agalactiae*, они в значительной части наблюдений подвержены бактерицидному воздействию катионов цинка.

Журн. микробиол., 2017, № 3, С. 26—35

Ключевые слова: антибактериальное действие, медь, цинк, *S.pyogenes*, *S.agalactiae*

*S.B.Cheknev, E.I.Vostrova, M.A.Sarycheva,
S.V.Kisil, V.V.Anisimov, A.V.Vostrov*

INHIBITION OF THE BACTERIAL GROWTH IN THE CULTURES OF *STREPTOCOCCUS PYOGENES* AND *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* IN PRESENCE OF COPPER AND ZINC IONS

Gamaleya Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Aim. The work was performed with the purpose to study antibacterial action of millimolar concentrations of copper and zinc ions, used as sulfates or chlorides in the cultures of *S.pyogenes* and *S.agalactiae*. **Materials and methods.** Suspensions of the *S.pyogenes* and *S.agalactiae* bacteria which contained 10^8 CFU/ml were sown by the lawns into the standard Petri dishes coated with the supplemented Nutrient Agar. 30 min later the salt solutions of copper or zinc were added by the 5 μ l drops on the surfaces of the lawns with use of 36-channel stamp replicator. The salt solutions contained copper or zinc at the concentrations ranged between 5×10^{-3} M to 5×10^{-1} M of the metals. Then the dishes containing bacterial cultures were incubated for 24 hrs at 37°C followed by measuring diameter of the area of culture growth inhibition. The probes of material obtained from the centers of the stunting areas were passed into the centrifuge tubes with the supplemented Nutrient Broth, incubated for up to five days at 37°C and tested for the Broth clarity. **Results.** In presence of the metal concentrations ranged between 50 to 500 мМ the inhibitory action of zinc sulfate towards *S.pyogenes* bacteria was 1.5 — 1.7 times higher ($p < 0.001$) than the action of copper sulfate. In presence of 100 and 500 мМ of the metals the action of zinc chloride was 1.2 — 1.3 times higher ($p < 0.05 - 0.1$) than the effects of copper chloride. In presence of 100 and 500 мМ of copper used as chloride its antibacterial action towards *S.agalactiae* bacteria was 8 — 13 per cent higher ($p > 0.1$) than the effects of zinc chloride. Passages of the material obtained from the areas of culture growth inhibition demonstrate clarity of the Broth in 67 — 85 per cent (*S.pyogenes*) or 48 — 67 per cent (*S.agalactiae*) probes with samples from the areas treated with copper salts, and

in 30 per cent probes with samples from the areas treated with the salts of zinc. *Conclusion.* Inhibitory action of copper and zinc ions used in millimolar concentrations in the cultures of *S.pyogenes* and *S.agalactiae* was established. *S.pyogenes* bacteria demonstrate higher than *S.agalactiae* sensitivity to the action of zinc ions measured by the area of the growth inhibition. Also, in a comparison with *S.agalactiae*, the *S.pyogenes* bacteria undergo bactericidal action of zinc ions in a higher part of observations.

Zh.Mikrobiol. (Moscow), 2017, No 3, P. 26—35

Key words: antibacterial action, copper, zinc, *S.pyogenes*, *S.agalactiae*

ВВЕДЕНИЕ

Сегодня не подлежит сомнению ключевая роль катионов металлов в поддержании жизнедеятельности бактериальной клетки и реализации ее патогенных свойств в организме хозяина. Выступая структурными, каталитическими или регуляторными компонентами биомакромолекул, металлы вовлечены в обеспечение многих биологических процессов, принципиально значимых для функционирования клетки бактерии и определяющих ее вирулентность [14, 19, 20].

В то же время, высокие концентрации катионов токсичны для бактерий. Поэтому бактериальная клетка располагает эволюционно закрепленными механизмами и факторами детоксикации, переводящими металл в состояние и форму, снижающие или исключают его токсическое воздействие [8, 10, 11].

В реализации своего токсического действия катионы меди и цинка могут конкурировать за сайты связывания в металлопротеинах [7, 13], конкурентно ингибировать поглощение бактериями других металлов [16], опосредовать прямое бактерицидное действие [3, 20].

Ранее нами установлено, что катионы меди и цинка обладают антибактериальным действием в отношении клеток *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* [2 — 4]. При этом в миллимолярных концентрациях катионы меди реализуют бактерицидное действие, а катионы цинка опосредуют преимущественно бактериостатические эффекты [3]. В физиологических (микромолярных) концентрациях катионы цинка проявляют токсические свойства в отношении бактерий *S.aureus*, катионы меди обеспечивают достижение полного бактерицидного эффекта в культурах *S.aureus* и *P.aeruginosa*, подвергнутых метаболическому стрессу [4]. В связанном белками γ -глобулиновой фракции состоянии катионы меди и цинка реализуют антибактериальное действие в культурах *S.aureus* или *P.aeruginosa* в наномолярных концентрациях [2, 4].

Аналогично *S.aureus* и *P.aeruginosa*, для патогенных стрептококков катионы металлов, в частности цинка, служат важнейшим фактором, обеспечивающим взаимодействие бактерий с организмом хозяина [18]. Они определяют активность ряда поверхностных белков и факторов вирулентности патогенов [18], необходимы для деления бактериальной клетки и поддержания ее жизнедеятельности в ходе инфекционного процесса [6].

Вместе с тем, экспрессия стрептококками поверхностных протеинов, несущих сильный отрицательный заряд и содержащих консервативный общий эпитоп [1], может способствовать поступлению в клетки бактерий избыточных количеств цинка, что вследствие нарушения биосинтеза капсульной гиалуроновой кислоты и других ключевых звеньев метаболизма с необходимостью

будет изменять обменные процессы и снижать вирулентность стрептококков [Ong C.Y. et al., 2015].

Целью работы явилась оценка антибактериального действия миллимолярных концентраций катионов меди и цинка, примененных в виде сульфатов или хлоридов, в культурах *S.pyogenes* и *S.agalactiae*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культуры бактерий *S.pyogenes* и *S.agalactiae* предоставлены из рабочей коллекции лаборатории индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов В.Г.Жуховицким. В работе использовали по три клинических изолята *S.pyogenes* и *S.agalactiae*.

Для постановки реакций стандартизованную суспензию бактерий, полученную из суточных культур *S.pyogenes* и *S.agalactiae* и содержащую 10^8 КОЕ/мл, засекали газоном из объема 1.0 мл суспензии в физиологическом растворе на стандартные стерильные чашки Петри диаметром 90 мм с питательным агаром Blood Base Agar (HiMedia Lab.), дополненным 10% нормальной лошадиной сыворотки (Микроген) и 1% глюкозы. Спустя 30 мин на поверхность газона с использованием 36-канального штампа-репликатора с диаметром наконечников 2.0 мм каплями объемом по 5 мкл наносили солевые растворы — сульфат меди $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, сульфат цинка $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, хлорид меди $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ и хлорид цинка ZnCl_2 в 0.15 М NaCl (pH 7.11 — 7.31) с концентрацией по катионам металлов от 5×10^{-3} М до 5×10^{-1} М.

На препаративном этапе исследования маточные растворы солей стерилизовали методом мембранной фильтрации с использованием насадок для водно-солевых растворов Millex с диаметром пор 0.22 мкм (Millipore), после чего готовили серии последовательных разведений маточного образца в 0.15 М растворе NaCl, служившим внутренним контролем системы.

После нанесения солевых растворов каплями на газон содержавшие культуры бактерий *S.pyogenes* и *S.agalactiae* чашки Петри инкубировали в течение суток при 37°C. По истечении срока инкубации результат реакции учитывали, определяя диаметр зоны задержки роста культуры с использованием угловой линейки Partigen (Behringwerke AG).

На каждом газоне реакцию бактерий на серию разведений соли металла воспроизводили трижды. Для каждого клинического изолята бактерий использовали при этом не менее двух параллельных чашек Петри.

Для проверки наличия (отсутствия) жизнеспособных бактерий в зонах задержки роста культур и установления вклада бактерицидного компонента в действие солей металлов из центра зоны задержки роста микробиологической петлей диаметром 1.0 мм производили посевы материала в пробирки, содержавшие по 5.0 мл питательного бульона Nutrient Broth (HiMedia Lab.), дополненного 10% нормальной лошадиной сыворотки (Микроген) и 1% глюкозы. Образцы термостатировали в течение срока до 5 суток при 37°C, после чего оценивали прозрачность питательного бульона в сравнении с контрольным — стерильным.

В ходе экспериментов кислотность 0.15 М раствора NaCl контролировали с помощью базового электронного pH-метра Sartorius PB-11, укомплектованного электродом Sartorius PY-P11.

При математической обработке результатов исследования достоверность различия средних величин устанавливали с помощью t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Как показывают результаты, представленные на рис. 1, в культуре клеток *S. pyogenes* катионы меди и цинка, примененные в виде сульфата (рис. 1А) или хлорида (рис. 1Б) в миллимолярных концентрациях, реализуют выраженное антибактериальное действие, интенсивность которого при 10-кратном (с 50 до 500 мМ) повышении содержания катионов металлов в среде культивирования нарастает в 1.5 — 1.9 раза ($p < 0.001 - 0.002$). В отдельных случаях при концентрациях металлов менее 5×10^{-2} М в просвете зоны задержки роста наблюдали отдельные мелкие колонии; однако граница зоны определялась четко и позволяла характеризовать зону по ее диаметру.

Обращает на себя внимание более выраженное, чем в присутствии меди, торможение роста бактерий *S. pyogenes* катионами цинка (рис. 1). В диапазоне концентраций металлов от 50 до 500 мМ активность сульфата цинка в 1.5 — 1.7 раза ($p < 0.001$) превосходит действие сульфата меди (рис. 1А). Действие хлорида цинка при концентрациях катионов 100 и 500 мМ в 1.2 — 1.3 раза ($p < 0.05 - 0.1$) превосходит эффекты хлорида меди (рис. 1Б).

Действие катионов цинка нарастает при 10-кратном (с 50 до 500 мМ) повышении содержания металла в среде культивирования тоже более заметно, чем действие меди. Если для катионов меди прирост составляет по кратности 1.5 раза ($p < 0.001 - 0.002$), то в условиях применения катионов цинка размер зоны задержки роста бактерий увеличивается в 1.8 — 1.9 раза ($p < 0.001$) (рис. 1).

При этом заметна разница в действии катионов, определяемая анионным составом соли металла. Бактерии *S. pyogenes* более чувствительны к действию сульфата цинка, которое на отдельных концентрациях катионов превосходит эффекты хлорида в 1.2-1.35 раза ($p < 0.02 - 0.1$) (рис. 1А и Б). У катионов меди обнаруживается тенденция к проявлению более высокой активности металла в составе хлорида, действие которого на отдельных концентрациях катионов превосходит эффекты сульфата в 1.1 — 1.3 раза ($p < 0.1$ или $p > 0.1$) (рис. 1А и Б).

Посевы материала из зон задержки роста культуры *S. pyogenes*, обработанных солями меди, в 67 — 85% наблюдений обнаруживают соответствующую

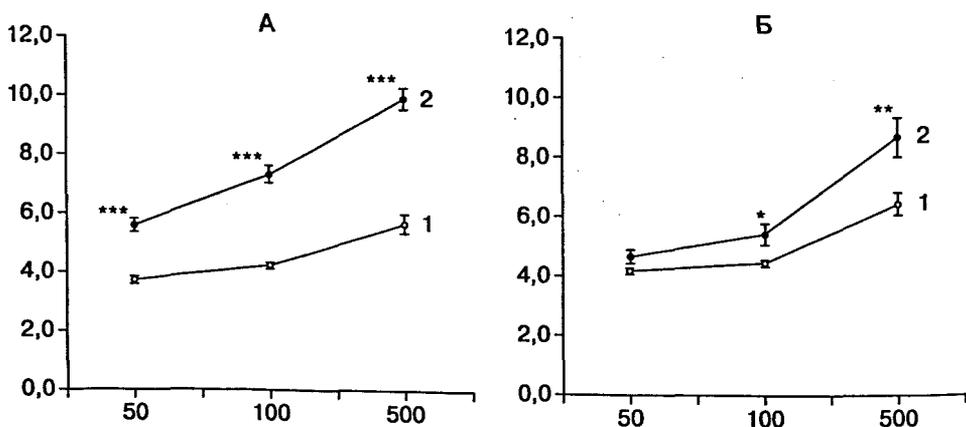


Рис. 1. Торможение роста культуры *S. pyogenes* в присутствии миллимолярных концентраций катионов меди (1) и цинка (2), $M \pm m$, $n=6$ или $n=9$.

* $p < 0.1$; ** $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ по сравнению с показателями меди. Здесь и на рис. 2: по оси абсцисс — концентрация катионов металлов, мМ; по оси ординат — диаметр зоны задержки роста, мм. А — водные сульфаты меди (II) и цинка; Б — водный хлорид меди (II) и хлорид цинка.

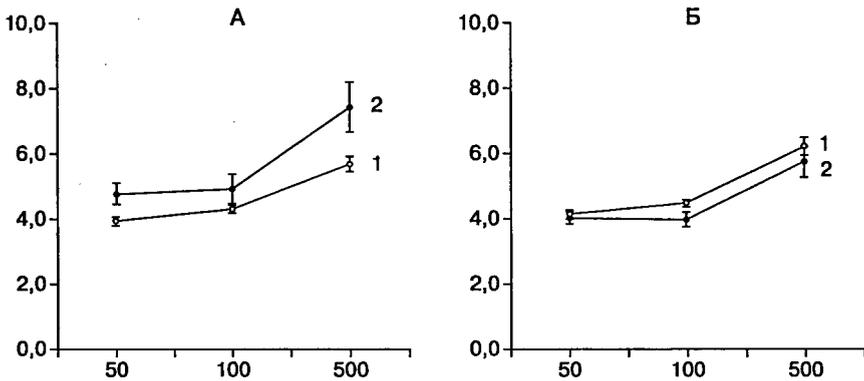


Рис. 2. Торможение роста культуры *S. agalactiae* в присутствии миллимолярных концентраций катионов меди (1) и цинка (2), $M \pm m$, $n=6$ или $n=9$.

контрольной прозрачность питательного бульона. Пробы из зон, обработанных солями цинка, по прозрачности питательного бульона соответствуют стерильному контролю в 30% случаев.

В отношении клеток *S. agalactiae* катионы меди и цинка, примененные в миллимолярных концентрациях в виде сульфата или хлорида, реализуют антибактериальное действие слабее, чем в культуре *S. pyogenes*. Интенсивность действия, оцениваемая по зонам задержки роста, при 10-кратном (с 50 до 500 мМ) повышении содержания катионов металлов в среде культивирования возрастает в 1.4 — 1.6 раза ($p < 0.001 - 0.05$) (рис. 2). И если в условиях применения сульфата и хлорида меди края зон задержки роста, в целом, были четкие и лишь в отдельных случаях отмечено появление единичных мелких колоний по краям, то при действии катионов цинка можно было наблюдать рост колоний как по краям, так и внутри зоны задержки роста.

Как и в отношении бактерий *S. pyogenes*, катионы цинка, примененные в культуре *S. agalactiae* в виде сульфата, в 1.15 — 1.3 раза ($p > 0.1$) активнее катионов меди (рис. 2А). В то же время, хлорид цинка оказывается в 1.2 — 1.3 раза ($p > 0.1$) слабее сульфата, в результате чего действие хлорида меди становится сопоставимо или даже на отдельных концентрациях катионов превосходит на 8 — 13% ($p > 0.1$) эффекты хлорида цинка (рис. 2Б).

Действие катионов меди при 10-кратном (с 50 до 500 мМ) повышении содержания металла в среде культивирования *S. agalactiae* нарастает в 1.4 — 1.5 раза ($p < 0.001$), что соизмеримо с показателем в условиях применения цинка, составляющим по кратности 1.4 — 1.6 ($p < 0.05$).

Посевы материала из зон задержки роста культуры *S. agalactiae*, в отличие от опытов на клетках *S. pyogenes*, обнаруживают помутнение питательного бульона во всех пробах, содержащих образцы из лунок, обработанных солями цинка. Пробы из зон, обработанных солями меди, в 48 — 67% случаев обнаруживают соответствующую контрольной прозрачность питательного бульона.

ОБСУЖДЕНИЕ

Бактерицидное действие металлов на патогенные бактерии, без сомнения, служит прямым указанием на возможность их использования в разработке подходов к созданию новых средств антибактериальной терапии. В то же время, достижение полного бактерицидного эффекта в организме хозяина в большинстве своем лимитировано токсическим воздействием металлов на

собственные, неизменные клетки организма, аналогично бактериям, критически нуждающиеся в поступлении катионов металлов и экспрессирующие эффективные системы инфлюкса катионов.

Одновременно они располагают специфическими транспортерами, активно выводящими металл из клетки во внеклеточное пространство в условиях его избыточного поступления в цитоплазму. Но сколь эффективными окажутся эти транспортеры, когда в ходе инфекционного процесса и воздействия токсических концентраций катионов находящиеся в периклеточном пространстве бактерии в целях собственной детоксикации будут активно экспортировать металл — сказать сложно.

Иное дело — бактериостатичность металлов, более щадящий с точки зрения влияния на жизнедеятельность режим взаимодействия клетки бактерии с катионом, не предполагающий с необходимостью гибель мишени, но вместе с тем, создающий условия торможения роста, ограничения персистенции, снижения динамики формирования биопленок и, следовательно, снижения устойчивости бактерий к действию других факторов противомикробной защиты (лизоцима, комплемента, протеолитических ферментов, активных по поверхности клетки). В условиях торможения роста бактерии не могут отвечать на неблагоприятное внешнее воздействие за счет многократного увеличения численности популяции в результате форсированной пролиферации.

В наших исследованиях бактерицидность выступает проявлением в отношении бактерий токсических свойств катионов меди, бактериостатичность преимущественно характеризует действие цинка [3]. Если при этом, как отмечали ранее, антибактериальное действие меди соответствует представлениям о высокой редокс-активности металла, его способности выступать в биологических системах в качестве мощного окислителя и отчасти дестабилизировать взаимодействующие с ним биомакромолекулы, то очевидно, что вклад окислительно-восстановительных реакций в эффекты катионов цинка в большинстве своем отсутствует, поскольку катион цинка в эти реакции не вовлечен [3].

В контексте изложенного действие меди, превалирующее над эффектами цинка, как в культуре *Paeruginosa* [3, 4], или заметно менее выраженное, нежели действие цинка, как у золотистого стафилококка [3] и исследованных стрептококков, не может трактоваться с позиций его специфичности, поскольку деструктурирующий биомакромолекулы окислительный потенциал катионов слишком высок, чтобы предполагать возможность экспонирования биополимерами специфических сайтов связывания меди, которые были бы открытыми на взаимодействие, не занятыми катионами и не подвергались бы в условиях хелатирования опосредованной медью деструкции. Известно, что распределение меди в организме, ткани и даже в отдельной клетке строго локализовано, эпитопически определено и дозировано. Ее содержание в клетках, включая бактериальные, поддерживается в строгом соответствии с потребностями в реализации зависящих от меди функций белков и ферментов. Ее практически нет в свободной, подлежащей обмену форме. Практически вся медь находится в циркуляции и распределяется в органах и тканях в связанном белками, гликопротеинами или аминокислотами состоянии.

Напротив, принимая во внимание неспецифический характер бактерицидного действия редокс-активной меди, его было бы неправомерно распространять на бактериостатическое, а тем более, бактерицидное, действие цинка, не участвующего, как отмечали, в окислительно-восстановительных реакциях и, в отличие от меди, стабилизирующего взаимодействующие с ним

биомакромолекулы и тропные к нему лиганды сайтов связывания. Понятно, что проявляющий высокое сродство к внутримолекулярным структурам и тиоловым группам белков, неактивный в редокс-обмене, но чрезвычайно эффективный в качестве комплексообразователя, способного формировать многочисленные координационные связи, цинк для реализации механизма своего воздействия должен встроиться в структуру связывающего сайта, не разрушая, а конформационно преобразуя ее в новую пространственную конфигурацию. Если это действие приводит к изменению потока сигнальных путей, вовлекающих данную молекулу-мишень, эффект цинка обоснованно трактовать как структурно-регуляторный, коль скоро в локальном микроокружении возникает, по сути, новая структура с новыми или измененными функциями.

А поскольку любая действующая структурно-функциональная связь в основе своей специфична, возникновение на этой же основе любой другой структурно-функциональной связи или изменение действующей не может рассматриваться иначе, как с позиций строгой специфичности, которая, следовательно, характеризует и эффект воздействия фактора, меняющего эту специфичность или создающего новую.

В предложенном контексте специфичность — это функция, обеспеченная структурно и организованная топически. Топика действия цинка — внутриклеточные (бактериальные) сигнальные пути, ответственные за реализацию метаболических процессов, формирующих и поддерживающих состояние и уровень патогенности и вирулентности. Цинк способен обратимо ингибировать гемолитическую активность *Serpulina hyodysenteriae* [9] и угнетать активность протеаз *Borrelia burgdorferi* [17]. В отношении бактерий *S.pyogenes* катионы цинка ингибируют гемолиз [5], активность цистеинпротеазы, необходимой для функционирования ряда факторов патогенности [13], ферменты гликолиза, биосинтез капсульной гиалуроновой кислоты [Ong C.Y. et al., 2015].

Не подлежит сомнению многофакторное с позиций получаемого результата и многооточное с позиций определения мишенивой локализации и топика реакции, в высокой степени специфическое воздействие катионов цинка, которое в ряде наблюдений оказывается обратимым, что, само по себе, служит свидетельством специфичности реакции, поскольку она, следовательно, может быть воспроизведена новым воздействием на те же молекулярные мишени.

В контексте изложенного логичным видится существование у стрептококков межвидовых различий по чувствительности к действию катионов цинка. Средний диаметр зоны задержки роста, оцененный совокупно в присутствии сульфата и хлорида цинка, составляет 9.3 мм в культуре *S.pyogenes* и 6.6 мм в культуре *S.agalactiae*.

Понятно, что если мишенью воздействия катионов выступают внутриклеточные сигнальные пути, детерминирующие синтез или активность факторов патогенности микроорганизмов, таких мишеней с необходимостью должно быть больше и выраженность их экспрессии должна быть выше у патогенных *S.pyogenes*, нежели у условно патогенных *S.agalactiae*, входящих в состав нормальной микрофлоры кишечника человека и обладающих существенно меньшей в сравнении с *S.pyogenes* гемолитической активностью [12, 15, 21]. Неспецифическое бактерицидное действие катионов меди, практически не различающееся в культурах *S.pyogenes* и *S.agalactiae*, служит адекватным контролем специфическим эффектам катионов цинка.

В использованном алгоритме сравнения бактерии *S.aureus* проявляют более высокую, чем *S.pyogenes*, чувствительность к действию катионов цинка. Средний диаметр зоны задержки роста в культуре *S.aureus* составляет 10.9 мм [3], в культуре бактерий *P.aeruginosa* показатель соответствует 6.4 мм [3].

Таким образом, использованная методика оценки торможения роста бактерий в культуре позволяет установить наличие и вклад в жизнедеятельность бактериальной клетки внутриклеточных сигнальных путей, которые могут быть блокированы специфическим воздействием катионов металлов. Она, следовательно, становится применимой в скрининговых исследованиях, предполагающих отбор катионов металлов, обладающих наиболее выраженным токсическим воздействием на определенные виды патогенных бактерий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Костюкова Н.Н., Бехало В.А. Факторы патогенности пневмококка и их протективные свойства. Журн. микробиол. 2014, 3: 67-77.
2. Чекнев С.Б., Вострова Е.И., Писковская Л.С., Востров А.В. Эффекты катионов меди и цинка, связанных белками γ -глобулиновой фракции, в культуре *Staphylococcus aureus*. Журн. микробиол. 2014, 3: 4-9.
3. Чекнев С.Б., Вострова Е.И., Апресова М.А., Писковская Л.С., Востров А.В. Торможение роста бактерий в культурах *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* в присутствии катионов меди и цинка. Журн. микробиол. 2015, 2: 9-17.
4. Чекнев С.Б., Вострова Е.И., Сарычева М.А., Востров А.В. Торможение роста бактерий в культурах *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* катионами меди и цинка, примененными в физиологических концентрациях. Журн. микробиол. 2016, 3: 9-18.
5. Avigad L.S., Bernheimer A.W. Inhibition by zinc of hemolysis induced by bacterial and other cytolytic agents. Infect. Immunity. 1976, 13 (3): 1378-1381.
6. Bayle L., Chimalapati S., Schoehn G. et al. Zinc uptake by *Streptococcus pneumoniae* depends on both AdcA and AdcAII and is essential for normal bacterial morphology and virulence. Molec. Microbiol. 2011, 82 (4): 904-916.
7. Blencowe D.K., Morby A.P. Zn(II) metabolism in prokaryotes. FEMS Microbiol. 2003, 27: 291-311.
8. Botella H., Stadthagen G., Lugo-Villarino G. et al. Metallobiology of host-pathogen interactions: an intoxicating new insight. Trends Microbiol. 2012, 20 (3): 106-112.
9. Dupont D.P., Duhamel G.E., Carlson M.P., Mathiesen M.R. Effect of divalent cations on hemolysin synthesis by *Serpulina* (*Treponema*) *hyodysenteriae*: inhibition induced by zinc and copper. Vet. Microbiol. 1994, 41: 63-73.
10. Hodgkinson V., Petris M.J. Copper homeostasis at the host-pathogen interface. J. Biol. Chemistry. 2012, 287 (17): 13549-13555.
11. Hood M.I., Skaar E.P. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. Nature Rev. Microbiol. 2012, 10: 525-537.
12. Joseph E.A. Streptococcal toxins (streptolysin O, streptolysin S, erythrogenic toxin). Pharmac. Ther. 1980, 11: 661-717.
13. Krishnan K.C., Mukundan S., Figueroa J.A.L. et al. Metal-mediated modulation of streptococcal cysteine protease activity and its biological implications. Infect. Immunity. 2014, 82 (7): 2992-3001.
14. Phan T.N., Buckner T., Sheng J. et al. Physiologic actions of zinc related to inhibition of acid and alkali production by oral streptococci in suspensions and biofilms. Oral Microbiol. Immunol. 2004, 19 (1): 31-38.
15. Rajagopal L. Understanding the regulation of group B streptococcal virulence factors. Future Microbiol. 2009, 4 (2): 201-221.
16. Rosado J.L. Zinc and copper: proposed fortification levels and recommended zinc compounds. J. Nutrition. 2003, 133 (Suppl.): 2985-2989.
17. Russell T.M., Tang X., Goldstein J.M. et al. The salt-sensitive structure and zinc inhibition of *Borrelia burgdorferi* protease BbHtrA. Molecular Microbiol. 2016, 99 (3): 586-596.
18. Shafeeq S., Kuipers O.P., Kloosterman T.G. The role of zinc in the interplay between pathogenic streptococci and their hosts. Molecular Microbiol. 2013, 88 (6): 1047-1057.

19. Stafford S.L., Bokil N.J., Achard M.E.S. et al. Metal ions in macrophage antimicrobial pathways: emerging roles for zinc and copper. *Bioscience Reports*. 2013, 33 (4): 541-554.
20. Weston B.F., Brenot A., Caparon M.G. The metal homeostasis protein, Lsp, of *Streptococcus pyogenes* is necessary for acquisition of zinc and virulence. *Infect. Immunity*. 2009, 77 (7): 2840-2848.
21. Whidbey C., Vornhagen J. A streptococcal lipid toxin induces membrane permeabilization and pyroptosis leading to fetal injury. *EMBO Mol. Med*. 2015, 7: 488-505.

Поступила 15.08.16

Контактная информация: Чекнев Сергей Борисович, д.м.н.,
123098, Москва, ул. Гамалеи, 18, р.т. (499)190-43-88

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

*С.А.Гуляев¹, А.А.Ляшенко¹, А.М.Чумаков¹, А.А.Сорокин¹, И.В.Гордейчук¹,
И.А.Потемкин^{2,3}, О.В.Исаева^{2,3}, К.К.Кюрегян^{2,3}, М.И.Михайлов^{2,3}*

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ ПРОТОТИПНОГО ВАКЦИННОГО ПРЕПАРАТА ПРОТИВ ГЕПАТИТА Е

¹ФНЦ исследования и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П.Чумакова,
²Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования,
³НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, Москва

Цель. Оценить специфическую иммуногенную активность прототипного варианта вакцины против гепатита Е (ГЕ). *Материалы и методы.* Нелинейных мышей, самцов (n=170), иммунизировали однократно внутривбрюшинно прототипной вакциной против ГЕ в дозах 5, 10 и 20 мкг/животное. Анти-ВГЕ IgG определяли методом ИФА с видоспецифичным конъюгатом на 7, 14, 21 и 28 дни после иммунизации. Для оптимизации условий иммуногенности вакцины 250 мышам, разделенным на 25 групп по 10 голов в каждой, однократно вводили экспериментальные образцы вакцинного препарата, содержащие 20 мкг антигена и композиции адъювантов на основе алюминия гидроксида и иммуномодуляторов полиоксидония и глутоксима. Анти-ВГЕ определяли в образцах сыворотки крови мышей на 28 день после иммунизации и рассчитывали среднюю иммунизирующую дозу (ID₅₀) для каждой композиции вакцинного препарата. *Результаты.* Увеличение иммуногенности при одной и той же стандартной дозе антигена (20 мкг) при использовании в качестве адъюванта глутоксима в концентрации 10 мг/мл в растворе алюминия гидроксида (0,5 мг/мл) составило 51,4%. Для композиции вакцины с полиоксидонием (1,0 мг/мл) также наблюдали незначительное увеличение иммуногенности, однако оно не было статистически значимым при сравнении со стандартным адъювантом (алюминия гидроксид 0,5 мг/мл). *Заключение.* Полученные данные свидетельствуют о высокой иммуногенности вакцинного препарата против гепатита Е. Применение в композиции экспериментальной вакцины против гепатита Е иммуномодулятора глутоксима обеспечивает ее наибольшую иммуногенность.

Журн. микробиол., 2017, № 3, С. 35—43

Ключевые слова: вирус гепатита Е (ВГЕ), анти-ВГЕ, антиген, вакцина, иммуногенность

*S.A.Gulyaev¹, A.A.Lyashenko¹, A.M.Chumakov¹, A.A.Sorokin¹, I.V.Gordeichuk¹,
I.A.Potemkin^{2,3}, O.V.Isaeva^{2,3}, K.K.Kyuregyan^{2,3}, M.I.Mikhaylov^{2,3}*

STUDY OF IMMUNOGENICITY OF A PROTOTYPE VACCINE AGAINST HEPATITIS E

¹Chumakov Federal Scientific Centre of Research and Development of Immune Biological Preparations, ²Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, ³Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Aim. Evaluate specific immunogenic activity of a prototype vaccine against hepatitis E (HE). *Materials and methods.* Non-linear mice, male (n=170), were immunized once intraperitoneally by a prototype vaccine against HE at 5, 10 and 20 µg per animal. Anti-HEV IgG were determined by ELISA using species-specific conjugate at days 7, 14, 21 and 28 after immunization. Experimental samples of the vaccine preparation containing 20 µg of the antigen and compositions of adjuvants based on aluminium hydroxide and immune modulators polyoxidonium and glutoxim were administered to 250 mice split into 25 groups (10 animals per group) to optimize vaccine immunogenicity. Anti-HEV were determined in mice sera samples at day 28 after the immunization, and mean immunization dose (ID₅₀) for each composition of the vaccine preparation was calculated. *Results.* Increase of immunogenicity for the same standard antigen dose (20 µg) for glutoxim adjuvant at 10 mg/ml in aluminium hydroxide solution (0,5 mg/ml) was 51.4%. A non-significant increase of immunogenicity was also observed for vaccine composition with polyoxidonium (1.0 mg/ml), however, it was statistically non-significant when compared with standard adjuvant (aluminium hydroxide at 0,5 mg/ml). *Conclusion.* The data obtained give evidence regarding high immunogenicity of the vaccine preparation against hepatitis E. Use of glutoxim immune modulator in the composition of the experimental vaccine against hepatitis E ensures highest immunogenicity.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 3, P. 35—43

Key words: hepatitis E virus (HEV), anti-HEV, antigen, vaccine, immunogenicity

ВВЕДЕНИЕ

Инфекция, вызываемая вирусом гепатита E (ВГЕ), является одной из основных причин заболеваемости острым гепатитом в эндемичных регионах Азии, Ближнего Востока и Африки, однако в последние годы также описаны спорадические случаи и даже вспышки заболевания на неэндемичных территориях, включая РФ. Резервуаром ВГЕ на неэндемичных территориях являются дикие и домашние животные, в частности свиньи. Попадание фекалий инфицированных животных в воду приводит к вспышечной заболеваемости с вовлечением в эпидемический процесс большого количества восприимчивых лиц. Наиболее адекватной мерой специфической профилактики гепатита E (ГЕ) в этих условиях является вакцинация групп риска, а также животных, формирующих резервуар вируса. Эпидемиологические особенности распространения ВГЕ-инфекции во многом зависят от генотипа (ГТ) вируса. ГТ1 и ГТ2 инфицируют только человека и вызывают эпидемии в эндемичных регионах, при этом источником инфекции на эндемичных территориях являются инфицированные лица. ГТ3 и ГТ4 инфицируют как человека, так и некоторых животных и вызывают вспышки заболевания на неэндемичных территориях. Основными генотипами ВГЕ, циркулирующими на эндемичных территориях, являются ГТ1 и ГТ2. Основным генотипом ВГЕ, циркулирующим на неэндемичных территориях, включая РФ, является ГТ3. Помимо собственно человека, ВГЕ был выделен от свиней, оленей, мангустов и кроликов. Антитела к вирусу были обнаружены у более широкого спектра животных, включая кошек, собак, кроликов, крупный рогатый скот, овец, коз, лошадей, макак, ослов, крыс и мышей [7]. Имеется множество свидетельств тому, что животные являются резервуаром ВГЕ ГТ3 и ГТ4 и играют значимую роль в поддержании циркуляции вируса. Неоднократно описаны случаи инфицирования людей ГТ3 и ГТ4 ВГЕ после употребления недостаточно термически обработанного мяса диких кабанов и оленей [4, 13]. Более того, было показано, что ВГЕ свиней и кроликов могут преодолевать межвидовой барьер и инфицировать приматов [6]. Более высокая распространенность антител к ВГЕ у работников, вовлеченных в уход за животными, и схожесть геномных

последовательностей ВГЕ, выделенных от людей и свиней в одном регионе, поддерживают предположение о значимой роли зоонозной трансмиссии в распространении ВГЕ-инфекции [8]. Представленные данные позволяют предположить, что вакцинация таких значимых природных резервуаров инфекции, как домашние свиньи и кролики, может прервать пищевой путь передачи и снизить количество случаев заболевания ГЕ у людей.

Инфекция ВГЕ у человека и экспериментальное заражение животных приводит к выработке антител и обеспечивает протективный иммунитет. Опыты с пассивной иммунопрофилактикой и челленджем на макаках показали, что наличие антител к ВГЕ предотвращает формирование ВГЕ-инфекции и развитие гепатита [14]. Более того, имеются эпидемиологические свидетельства того, что лица, ранее инфицированные ВГЕ, защищены от инфекции в ходе вспышек [1]. Было показано, что пост-инфекционные антитела к ВГЕ IgG сохраняются у людей вплоть до 14 лет [2]; после экспериментального заражения шимпанзе ГТ1 и 2 антитела выявлялись в течение 10 лет [3]. Все четыре генотипа ВГЕ объединены одним серотипом, что предположительно обеспечивает возможность создания универсальной вакцины [9].

В настоящее время в мире существует только одна вакцина против ГЕ, основанная на рекомбинантном капсидном белке ВГЕ, полученном в культуре *Escherichia coli*, и лицензированная для применения исключительно в Китае. Принимая во внимание невозможность импорта данной вакцины, а также отсутствие данных о ее эффективности в предотвращении инфицирования ГТ3 ВГЕ, представляется целесообразной разработка вакцины на основе штаммов ГТ3 ВГЕ — генотипа вируса, наиболее широко циркулирующего на территории РФ.

Ранее нами был разработан прототипный вариант вакцины против гепатита Е на основе экспрессии в культуре *E.coli* рекомбинантного капсидного белка ВГЕ, содержащего основные иммуногенные эпитопы. Целью данного исследования являлась оценка специфической иммуногенной активности разработанного прототипного варианта вакцины против гепатита Е.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы следующие материалы: прототипный вариант вакцины против гепатита Е. Доза — 0,5 мл. Содержание антигена ORF2 ВГЕ 20 мкг/доза; раствор алюминия гидроксида (Alhedrogel Brenntag Biosector) с концентрацией 10,45 мг/мл; глутоксим — иммуностимулирующее средство (ЗАО «ФАРМА ВАМ»). Международное непатентованное название: глутамил-цистеинил-глицин динатрия; полиоксидоний — иммуномодулятор широкого спектра действия, являющийся стимулятором антителообразования, разрешен к медицинскому применению в качестве адъюванта в составе вакцин, для которого продемонстрирована способность усиливать иммуногенные свойства разных видов вакцин.

Для оценки специфической иммуногенной активности прототипного варианта препарата «Вакцина против гепатита Е», применяемого в эквивалентной дозе (согласно общим рекомендациям для доклинического испытания препаратов), проводили однократную иммунизацию нелинейных мышей (самцов) массой 17 — 20 г. Оценивали показатели 5 (интактной, 3 опытных с различной дозой вакцины и контрольной) групп (в каждой — по 10 животных). Общее количество мышей, использованных в эксперименте — 170. В ходе эксперимента у животных брали образцы сыворотки крови на 7, 14, 21 и 28 дни после однократной иммунизации и определяли в них наличие анти-ВГЕ.

Для оптимизации условий иммуногенности вакцины 250 мышам, разделенным на 25 групп по 10 голов в каждой, вводили экспериментальные образцы вакцинного препарата, содержащие различные композиции адьювантов. В данном эксперименте у животных брали образцы сыворотки крови на 28 день после однократной иммунизации для определения анти-ВГЕ и расчета средней иммунизирующей дозы (ID_{50}) для каждой композиции вакцинного препарата.

Анти-ВГЕ определяли с помощью набора реагентов «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» производства НПО «Диагностические системы» (тест-система иммуноферментная для выявления антител к вирусу гепатита E IgG) по протоколу производителя, за исключением конъюгата: вместо входящего в состав набора применяли видоспецифичный конъюгат. В качестве антивидового конъюгата в постановке ИФА использовали антитела козы к IgG мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP) производства Pierce (кат. № PA184388) в разведении 1:10 000 в стерильном фосфатно-солевом буфере. Результаты постановки ИФА учитывали, если все образцы сывороток мышей интактной группы были идентифицированы как отрицательные (значение ОП должно быть ниже значения ОП крит.).

Расчет ID_{50} осуществляли по результатам, полученным в группах мышей, иммунизированных указанными разведениями испытуемых образцов по методу Кербера в соответствии с формулой: $\lg ID_{50} = \lg D_N - \delta (\sum L_i - 0,5) + \lg S$ $ID_{50} = \text{antilg} (-\lg ID_{50})$, где: D_N — минимальное разведение вакцины, используемое в опыте; δ — логарифм отношения каждой последующей дозы к предыдущей, т. е. логарифм кратности испытанных разведений; L_i — отношение числа иммунных животных к числу всех вакцинированных животных конкретными разведениями испытуемой вакцины и стандартным образцом; $\sum L_i$ — сумма всех значений L_i ; S — кратность разведения исследуемых сывороток; ID_{50} — доза вакцины, вызывающая выработку антител у 50 % вакцинированных животных.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Животных иммунизировали внутрибрюшинно дозами препарата, указанными в табл. 1. На протяжении 4 недель эксперимента у иммунизированных мышей не наблюдали видимых изменений внешнего вида и поведения. Образцы сывороток, полученные индивидуально от каждого животного, тестируют на наличие антител к вирусу гепатита E в течение первых 24 ч после забора образцов крови, используя коммерческую иммуноферментную тест-систему для выявления антител к вирусу гепатита E IgG. На основании выявления анти-ВГЕ в опытных группах были рассчитаны средние значения коэффициента позитивности КП ср. (отношение среднего для группы значе-

Таблица 1. Схема проведения эксперимента по оценке иммуногенности прототипного вакцинного препарата против гепатита E при однократном внутримышечном введении

День эксперимента	Группа 1, n=40	Группа 2, n=40	Группа 3, n=40	Группа 4, n=40	Группа 5, n=10
	Вакцинный препарат, 5 мкг	Вакцинный препарат, 10 мкг	Вакцинный препарат, 20 мкг	Адьювант, алюминия гидроксид, 0,5 мг/мл	Интактные животные
День 0	Иммунизация				Забор крови (n=10)
Дни 7, 14, 21, 28	Забор крови (n=10)	Забор крови (n=10)	Забор крови (n=10)	Забор крови (n=10)	—

ния ОП к ОП крит.). На рис. приведены полученные для каждой группы на 7, 14, 21 и 28 день средние показатели коэффициента позитивности при определении анти-ВГЕ.

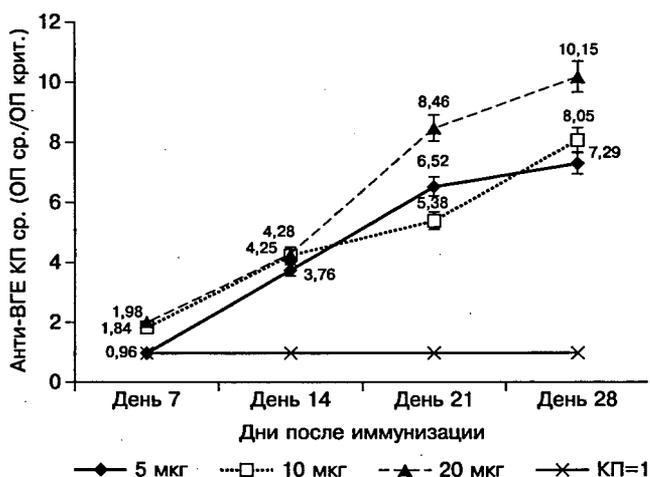
В контрольных группах (интактные и получавшие адьювант мыши) случаи выявления анти-ВГЕ не регистрировались, что указывает на отсутствие неспецифических реакций в эксперименте. Все дозы образца вакцины вызывали при экспериментальной иммунизации мышей выработку анти-ВГЕ. К 28 дню после иммунизации

во всех группах мышей, получавших вакцину, частота выявления анти-ВГЕ составила 100%. Однако в динамике на протяжении эксперимента частота выявления анти-ВГЕ и КП различались между группами иммунизированных животных. Различия, как правило, носили дозозависимый характер. При иммунизации дозой 5 мкг 100% частота выявления анти-ВГЕ происходила только на 28 день, тогда как при дозах 10 и 20 мкг — уже к 21 дню. Величина КП также возрастала с увеличением дозы вакцины в каждой из анализированных временных точек и достигала максимума при дозе 20 мкг.

С целью определения возможности повышения иммуногенности разработанного вакцинного препарата против ГЕ в состав вакцины вводили препараты, обладающие иммуномодулирующим эффектом. Для проведения исследования были выбраны три адьюванта, обладающие разными механизмами действия: 1. алюминия гидроксид, депонирующий антиген, сорбированный на нем, и вызывающий местную воспалительную реакцию, что в конечном итоге приводит к усилению гуморального иммунного ответа; 2. полиоксидоний — иммуномодулятор широкого спектра действия, являющийся стимулятором антителообразования, разрешен к медицинскому применению в качестве адьюванта в составе вакцин, для которого продемонстрирована способность усиливать иммуногенные свойства разных видов вакцин; 3. глутоксим — иммуностимулирующее средство. Данное соединение, помимо иммуномодулирующего действия, способно восстанавливать дисульфидные связи и, по-видимому, способствует восстановлению третичной структуры белков, в том числе конформационных эпитопов антигенов.

Метод контроля эффективности повышения иммуногенности при применении адьювантов основан на определении методом ИФА дозы препарата вакцины (ID_{50}), вызывающей образование антител к ВГЕ у 50 % мышей.

В табл. 2 приведены концентрации адьювантов, использовавшихся для приготовления разведений вакцинных препаратов с дозой антигена, равной 20 мкг. Из испытуемых образцов готовили ряд последовательных двукратных разведений от 1:2 до 1:64. Для разведения использовали плацебо, которое представляет собой раствор соответствующего адьюванта, использованного



Величина коэффициента позитивности при определении анти-ВГЕ. Планки погрешностей отображают величину относительной ошибки.

при приготовлении вакцинного препарата.

Методом случайной выборки сформировали опытные и контрольную группы по 10 животных в каждой. Количество опытных групп соответствовало количеству разведений. Мышам опытных групп внутрибрюшинно вводили по 0,5 мл полученных разведений образцов препаратов, используя одно разведение препарата на одну опытную группу. Мышам контрольной группы

тем же способом вводили плацебо. Через 28 суток животных обескровливали и готовили сыворотку в объеме не менее 0,1 мл. Образцы сывороток, полученные индивидуально от каждого животного, тестировали на наличие антител к вирусу гепатита Е в течение первых 24 часов.

На протяжении 4 недель эксперимента у иммунизированных мышей не наблюдали видимых изменений внешнего вида и поведения. Определение анти-ВГЕ проводили на 28 день после иммунизации в сыворотках крови мышей во всех группах. Результаты определения анти-ВГЕ в образцах сыворотки крови мышей через 28 дней после иммунизации приведены в табл. 3.

На основании выявления анти-ВГЕ в опытных группах были рассчитаны значения L_1 (отношение числа прореагировавших животных к числу всех иммунизированных животных конкретными разведениями препаратов вакцины) и ID_{50} на 28 день после иммунизации (табл. 3).

Полученные результаты свидетельствуют о достоверном увеличении иммуногенности вакцины против гепатита Е, определяемой как величина ID_{50} для каждой комбинации вакцины при использовании в качестве адьюванта глутоксима в концентрации 10 мг/мл в растворе алюминия гидроксида (0,5 мг/мл). Увеличение иммуногенности при одной и той же стандартной дозе антигена (20 мкг) составило 51,4%. Для композиции вакцины с полиоксидонием также наблюдали незначительное увеличение иммуногенности. Однако оно не было статистически значимым при сравнении с аналогичным показателем, полученным в группе мышей, иммунизированных вакциной с алюминия гидроксидом в качестве адьюванта.

ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимальными антигенами для создания вакцины против ГЕ являются производные ОРС2 ВГЕ, экспрессированные в клетках бактерий, млекопитающих или насекомых. Целый ряд пептидов, кодируемых как полноразмерной последовательностью ОРС2, так и ее фрагментами показал иммуногенность на мышях и приматах, а также эффективность в предотвращении развития инфекции и формирования гепатита после экспериментального заражения, однако при этом во многих случаях наблюдались различия в эффективности вакцин при проведении челленджа тем же генотипом, на основе последовательностей которого была приготовлена вакцина, или другим генотипом ВГЕ. К настоящему моменту только две кандидатные вакцины, осно-

Таблица 2. Состав вакцинных препаратов, использовавшихся для изучения повышения иммуногенности вакцин против гепатита Е

Препарат	Содержание антигена ВГЕ в дозе препарата	Содержание адьюванта в дозе препарата
Прототипный вариант вакцины против гепатита Е, алюминия гидроксид	20 мкг/0,5 мл	Алюминия гидроксид 0,5 мг/мл
Прототипный вариант вакцины против гепатита Е, полиоксидоний	20 мкг/0,5 мл	Алюминия гидроксид 0,5 мг/мл + полиоксидоний 1,0 мг/мл
Прототипный вариант вакцины против гепатита Е, глутоксим	20 мкг/0,5 мл	Алюминия гидроксид 0,5 мг/мл + глутоксим 10 мг/мл

Таблица 3. Результаты определения анти-ВГЕ в образцах сыворотки крови мышей на 28 день после иммунизации различными композициями вакцинного препарата

Группа	№ в группе	Композиция вакцины	Разведение вакцины	Количество прореагировавших животных по отношению к общему числу животных		ΣL ₄	ИД ₅₀
				Абсолютное число	Отношение L ₄		
1	10	ВГЕ PORF2/ 20 мкг/ алюминия гидроксид	цельная	6/10	0,6	1,6	4,26
2	10		1:2	3/10	0,3		
3	10		1:4	3/10	0,3		
4	10		1:8	2/10	0,2		
5	10		1:16	1/10	0,1		
6	10		1:32	1/10	0,1		
7	10		1:64	0/10	0		
8	10	ВГЕ PORF2/ 20 мкг/ алюминия гидроксид+полиоксидоний	цельная	7/10	0,7	1,7	4,57
9	10		1:2	4/10	0,4		
10	10		1:4	3/10	0,3		
11	10		1:8	2/10	0,2		
12	10		1:16	1/10	0,1		
13	10		1:32	0/10	0		
14	10		1:64	0/10	0		
15	10	ВГЕ PORF2/ 20 мкг/ алюминия гидроксид+глутоксим	цельная	7/10	0,7	2,3	6,92
16	9		1:2	3/9	0,3		
17	10		1:4	5/10	0,5		
18	10		1:8	2/10	0,2		
19	10		1:16	2/10	0,2		
20	10		1:32	2/10	0,2		
21	10		1:64	2/10	0,2		
22	10	Плацебо 1 (алюминия гидроксид)	—	0/10	0	0	0
23	10	Плацебо 2 (алюминия гидроксид + глутоксим)	—	0/10	0	0	0
24	10	Плацебо 3 (алюминия гидроксид + глутоксим)	—	0/10	0	0	0
25	10	Интактные	—	0/10	0	0	0

ванные на капсидном белке вируса — экспрессированный с помощью бакуловирусного вектора белок 56 кДа и экспрессированный в культуре *E.coli* пептид HEV 239, дошли до стадии клинических исследований [12, 15]. В 2007 г. M. Shrestha et al. провели исследования рекомбинантной вакцины против гепатита E в Непале. Эффективность данной вакцины после трехкратной иммунизации по результатам двухлетнего наблюдения составила ≈95% [12], однако в дальнейшем прогресса в разработке этой вакцины не наблюдалось.

Вестерн-блотт с другим рекомбинантным пептидом на основе капсидного белка ВГЕ, trpE-C2, продемонстрировал способность связываться с антителами к ВГЕ у пациентов с предполагаемой ВГЕ-инфекцией из Азии, Африки и Северной Америки, а также у экспериментально зараженных приматов. В дальнейшем было показано, что белок trpE-C2 обладает способностью абсорбировать анти-ВГЕ из сыворотки крови пациентов в конкурентном тесте с флуоресцентными антителами [10]. В небольшом доклиническом исследовании иммуногенности и эффективности вакцины четыре яванских макака были двукратно иммунизированы (0 и 34 сут.) двумя дозами (80 мкг) trpE-C2 с алюминиевыми квасцами в качестве адьюванта; двум животным через две недели после второй иммунизации была введена третья доза безадьювантной

вакцины. У всех четырех животных произошла выработка антител в высоких концентрациях, однако у животных, получивших две дозы вакцины, защиты против инфекции и развития заболевания при гомологическом (бирманский изолят ВГЕ, ГТ1) и негомологическом челлендже (мексиканский изолят ВГЕ, ГТ2) не наблюдалось. Из двух животных, получивших 3 дозы вакцины, у одного наблюдалась полная защита против гомологического челленджа, тогда как у второго животного после гетерологического челленджа наблюдалась защита от развития заболевания, но не от инфекции, что проявлялось присутствием РНК ВГЕ в фекалиях и антигена ВГЕ в печени [11]. Это было первое исследование, в котором была продемонстрирована иммуногенность рекомбинантного белка ОРС2 и его важность в защите от ВГЕ-инфекции.

Исследования другого вакцинного препарата, основанного на фрагменте капсидного белка ВГЕ, рЕ2 с алюминиевыми квасцами в качестве адъюванта, показали низкую иммуногенность у мышей, что сделало препарат неподходящим для дальнейших исследований [5].

В 2010 F.-C. Zhu et al. провели оценку иммунологической и эпидемиологической эффективности рекомбинантной вакцины HEV 239 на более чем 100 000 здоровых взрослых лиц из китайской провинции Цзянсу — региона, эндемичного по ГЕ. После введения третьей дозы вакцины у 100% вакцинированных наблюдалась выработка антител против ВГЕ, при этом у привитых лиц в течение года наблюдения не было зарегистрировано случаев гепатита [15]. В настоящее время данная вакцина одобрена китайской Государственной службой надзора за пищей и лекарствами — организацией, не получившей сертификат ВОЗ для регулирования и надзора за производством вакцин. Таким образом, использование данной вакцины за пределами КНР в настоящее время невозможно [Nelson K. E. et al., 2014].

Проведенные нами исследования на нелинейных мышах продемонстрировали, что отечественный прототипный вариант вакцинного препарата против ГЕ в эквитерапевтической дозе 20 мкг антигена/мл вызывает выработку специфических анти-ВГЕ IgG у 100% иммунизированных животных. Полученные данные свидетельствуют о высокой иммуногенности данного вакцинного препарата. Применение в композиции экспериментального вакцинного препарата иммуномодулятора глутоксима обеспечивало наибольшую иммуногенность вакцины против гепатита Е. При содержании антител ВГЕ в препарате вакцины, равном 20 мкг, концентрация глутоксима 10 мг/мл давала увеличение иммуногенности по сравнению со стандартной композицией вакцины с той же дозой АГ ВГЕ на 51,4% на 28 день после однократной иммунизации.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о перспективности дальнейшего изучения протективных свойств данного прототипного препарата на восприимчивых к ВГЕ животных — домашних свиньях и приматах.

Проект осуществлен при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60414X0064.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bryan J.P. et al. Epidemic hepatitis E in Pakistan: Patterns of serologic response and evidence that antibody to hepatitis E virus protects against disease. J. Infect. Dis. 1994, 170 (3): 517-521.
2. Khuroo M.S., Kamili S., Dar M.Y. Hepatitis E and long-term antibody status. Lancet. 1993, 341 (8856): 1355.

3. Krawczynski K., Meng X.-J., Rybczynska J. Pathogenetic elements of hepatitis E and animal models of HEV infection. *Virus Res.* 2011, 161 (1): 78–83.
4. Li T.-C. et al. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg. Infect. Dis.* 2005, 11 (12): 1958-1960.
5. Li S.W. et al. A bacterially expressed particulate hepatitis E vaccine: antigenicity, immunogenicity and protectivity on primates. *Vaccine.* 2005, 23 (22): 2893-2901.
6. Liu P. et al. Transmission of hepatitis E virus from rabbits to cynomolgus macaques. *Emerg. Infect. Dis.* 2013, 19 (4): 559-565.
7. Meng X.J. Recent advances in Hepatitis E virus. *J. Viral Hepat.* 2010b, 17 (3): 153-161.
8. Meng X.J. Hepatitis E virus: animal reservoirs and zoonotic risk. *Vet. Microbiol.* 2010a, 140 (3-4): 256-265.
9. Meng X.J. et al. Hepeviridae. *In: Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* A.M. King et al. (ed.). London: Elsevier Inc., 2012, 9: 1021-1028.
10. Purdy M.A. et al. Expression of a hepatitis E virus (HEV)-trpE fusion protein containing epitopes recognized by antibodies in sera from human cases and experimentally infected primates. *Arch. Virol.* 1992, 123 (3-4): 335-349.
11. Purdy M.A. et al. Preliminary evidence that atrpE-HEV fusion protein protects cynomolgus macaques against challenge with wild-type hepatitis e virus (HEV). *J. Med. Virol.* 1993, 41 (1): 90-94.
12. Shrestha M.P. et al. Safety and efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine. *New Engl. J. Med.* 2007, 356 (9): 895–903.
13. Tei S. et al. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet.* 2003, 362 (9381): 371-373.
14. Tsarev S.A. et al. Successful passive and active immunization of cynomolgus monkeys against hepatitis E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994, 91 (21): 10198-10202.
15. Zhu F.-C. et al. Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large-scale, randomised, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 2010, 376 (9744): 895-902.

Поступила 19.12.16

Контактная информация: Гуляев Станислав Анатольевич,
142782, Москва, поселение Московский, поселок Института полиомиелита,
27 км Киевского шоссе, р.т. (495)841-90-07

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

*Н.В.Соболева¹, А.А.Карлсен^{2,3}, О.В.Исаева^{2,3},
К.К.Кюрегян^{2,3}, О.Е.Троценко⁴, М.И.Михайлов^{2,3}*

ОСОБЕННОСТИ ЦИРКУЛЯЦИИ ВИРУСА ГЕПАТИТА С В ХАБАРОВСКОМ КРАЕ

¹Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П.Чумакова, ²Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, ³НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, Москва; ⁴Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии

Цель. Изучить интенсивность циркуляции ВГС на территории Хабаровского края и генетические варианты вируса, циркулирующие в регионе. *Материалы и методы.* Исследованы 940 образцов сыворотки крови, полученных от лиц с неустановленными факторами риска инфицирования ВГС в поликлинике Дальневосточного окружного Центра по профилактике и борьбе со СПИД (Хабаровск). В исследование были включены лица следующих возрастных групп: 1 — 4 лет, 5 — 9 лет, 10 — 14 лет, 15 — 19 лет, 20 — 29 лет, 30 — 39 лет, 40 — 49 лет, 50 — 59 лет, старше 60 лет; каждая группа включала около 100 человек. Во всех образцах определяли анти-ВГС, в положительных по анти-ВГС — определяли РНК ВГС. Для реконструкции истории распространения ВГС в Хабаровском крае был проведен филогенетический анализ с временной шкалой для выявленных геновариантов ВГС. Деревья были построены с помощью пакета программ BEAST v1.8.2 по двум

участкам генома — core (1043 п.о.) и NS5B (389 п.о.). *Результаты.* Средняя распространенность анти-ВГС среди обследованных лиц составила 9,3% (87/940). Доля лиц с текущей ВГС-инфекцией (с наличием РНК ВГС) составила 4,2% (39/940). Резкий подъем распространенности ВГС наблюдался, начиная с возрастной группы 20 — 29 лет, где частота выявления анти-ВГС составила 13,1% (13/99), что в 6 раз выше по сравнению с предыдущей возрастной группе 15 — 19 лет (2,2%, $p < 0,01$). Наибольшая частота выявления маркеров ВГС наблюдалась в возрастной группе 40 — 49 лет (20,8% и 9,4% для анти-ВГС и РНК ВГС соответственно). Частота выявления анти-ВГС и РНК ВГС в группе 30 — 39 лет составила 20,2% и 8,9% соответственно, среди лиц старше 60 лет — 16,8% и 7,4% соответственно. Генотип 1b был определен для 64,2% изолятов ВГС, 28,3% изолятов относились к генотипу 3a, и три изолята были единичными представителями генотипов 1a, 2a и 2c. Генотип 1b был занесен на территорию Хабаровского края порядка 55 — 65 лет назад из Японии и США, примерно на 15 лет позднее — генотип 3a. Импортное распространение новых штаммов ВГС генотипа 3a из Европы происходило многократно, эти штаммы встречаются на всей территории России. *Заключение.* Полученные результаты продемонстрировали широкое распространение ВГС в Хабаровском крае, сформировавшееся в результате длительной циркуляции вируса в регионе.

Журн. микробиол., 2017, № 3, С. 43—51

Ключевые слова: вирус гепатита С (ВГС), анти-ВГС, возрастные когорты, популяционные исследования, генотипы ВГС

*N.V.Soboleva*¹, *A.A.Karlsen*^{2,3}, *O.V.Isaeva*^{2,3},
K.K.Kyuregyan^{2,3}, *O.E.Trotsenko*⁴, *M.I.Mikhaylov*^{2,3}

FEATURES OF CIRCULATION OF HEPATITIS C VIRUS IN KHABAROVSK REGION

¹Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, ²Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, ³Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow; ⁴Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Russia

Aim. Study the intensity of circulation of HCV in Khabarovsk Region and genetic variants of the virus circulating in the region. *Materials and methods.* 940 sera samples obtained from individuals with unestablished risk factors for HCV infection in polyclinic of the Far-Eastern Regional Centre for Prophylaxis and Control of AIDS (Khabarovsk) were studied. Individuals of the following age groups were included into the study: 1 — 4, 5 — 9, 10 — 14, 15 — 19, 20 — 29, 30 — 39, 40 — 49, 50 — 59, older than 60 years; each group included approximately 100 individuals. Anti-HCV was determined in all the samples, HCV RNA was determined in samples positive for anti-HCV. Phylogenetic analysis with a time scale for the detected genovariants of HCV was carried out for reconstruction of the history of prevalence of HCV in Khabarovsk Region. Trees were constructed using BEAST v1.8.2 program by 2 genome sequences — core (1043 bp) and NS5B (389 bp). *Results.* The mean prevalence of anti-HCV among the examined individuals was 9.3% (87/940). The proportion of individuals with a current HCV-infection (presence of HCV RNA) was 4.2% (39/940). A sharp increase of HCV prevalence was observed beginning from the age group 20 — 29, where frequency of anti-HCV was 13.1% (13/99) that is 6 times higher compared with the previous age group of 15 — 19 (2.2%, $p < 0.01$). The highest frequency of detection of HCV markers was observed in the age group 40 — 49 (20.8 and 9.4% for anti-HCV and HCV RNA, respectively). The frequency of detection of anti-HCV and HCV RNA in the 30-39 group was 20.2 and 8.9%, respectively, and among individuals older than 60 — 16.8 and 7.4%, respectively. Genotype 1b was determined for 64.2% of HCV isolates, 28.3% of isolates belonged to genotype 3a, and 3 isolates were similar to genotype 1a, 2a and 2c members. Genotype 1b was introduced into Khabarovsk Region around 55 — 65 years ago from Japan and the USA, around 15 years later — genotype 3a. Importation of novel HCV genotype 3a strains from Europe took place many times, these strains are present across the whole Russia. *Conclusion.* The data obtained have demonstrated high prevalence of HCV in the Khabarovsk Region, that has formed due to a prolonged circulation of the virus in the region.

Key words: hepatitis C virus (HCV), anti-HCV, age cohorts, population studies, HCV genotypes

ВВЕДЕНИЕ

Гепатит С (ГС) остается одной из важнейших медико-социальных проблем здравоохранения во многих странах мира, в том числе и в Российской Федерации, что обусловлено значимым социально-экономическим ущербом, повсеместным распространением, тяжестью течения и активным вовлечением в эпидемический процесс лиц репродуктивного и трудоспособного возраста [2, 7]. Согласно оценкам ВОЗ, на данный момент количество инфицированных вирусом гепатита С (ВГС) достигает 130 — 200 миллионов человек. Около 350 000 человек ежегодно умирают от последствий гепатита С. ВГС является распространенной вирусной инфекцией в РФ, по материалам Государственного статистического наблюдения в 2015 году заболеваемость хроническим гепатитом С (ХГС) составила 39,9 на 100 тыс. нас., в 2015 году — 38 на 100 тыс. нас. Хабаровский край является одним из неблагоприятных по ВГС-инфекции регионов РФ, заболеваемость ХГС на этой территории на протяжении многих лет превышает среднероссийские показатели. Очевидно, что регистрируемая заболеваемость ХГС отражает только часть реальной картины распространенности ВГС в России и на ее отдельных территориях, в том числе в Хабаровском крае. Такое предположение основано на преимущественно бессимптомном и субклиническом характере течения ВГС-инфекции на протяжении многих лет, что приводит к ускользанию большого числа случаев инфекции от регистрации. Такая ситуация характерна не только для России, во многих странах мира, по разным оценкам, от 40 до 80% инфицированных ВГС лиц в настоящее время не выявлены и не знают о своем статусе [10]. Ранняя диагностика и своевременная терапия ХГС являются наиболее перспективной стратегией в борьбе с эпидемией данной инфекции [6]. Сероэпидемиологические популяционные исследования необходимы для оценки истинной распространенности ВГС и понимания эпидемиологических особенностей инфекции на разных территориях. Целью данного исследования являлось определение распространенности маркеров инфицирования ВГС среди условно здорового населения Хабаровского края и изучение генетических вариантов вируса, циркулирующих в регионе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследованы 940 образцов сыворотки крови, полученные от лиц с неустановленными факторами риска инфицирования, проживающими в Хабаровском крае и проходившими рутинное обследование в поликлинике Дальневосточного окружного Центра по профилактике и борьбе со СПИД (Хабаровск). В исследование были включены лица следующих возрастных групп: 1 — 4 лет, 5 — 9 лет, 10 — 14 лет, 15 — 19 лет, 20 — 29 лет, 30 — 39 лет, 40 — 49 лет, 50 — 59 лет, старше 60 лет; каждая группа включала около 100 человек. Соотношение мужчин и женщин составило 1:1,12 (47,1 и 52,9% соответственно). От всех участников было получено информированное согласие на проведение исследования.

Антитела к ВГС (анти-ВГС) определяли методом иммуноферментного анализа с использованием тест-системы «ИФА-АНТИ-НСV» (НПО «Диагностические системы»). Все положительные случаи выявления анти-ВГС

были подтверждены методом ИФА на наличие антител к структурным и неструктурным белкам ВГС с использованием тест-системы «ДС-ИФА-АНТИ-НСV-СПЕКТР-GM» (НПО «Диагностические системы»).

Во всех образцах сывороток крови, положительных по анти-ВГС, определяли РНК ВГС в полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с использованием праймеров к 5'-нетранслируемой области (5'-НТО). Праймеры для детекции представлены в табл. Выделение нуклеиновых кислот проводили с помощью набора «QIAamp Viral RNA Mini Kit», «QIAGEN GmbH» по протоколу производителя из образцов сыворотки крови объемом 140 мкл. Условия первого раунда ПЦР, совмещенного с обратной транскрипцией, были следующими: 42°C — 60 мин., 94°C — 2 мин, затем 35 циклов ПЦР: денатурация при 94°C — 30 сек., отжиг при 55°C — 30 сек. и удлинение цепи при 72°C — 45 сек.; финальная элонгация — 72°C — 7 мин. Условия второго раунда ПЦР были теми же. Детекцию продукта второй ПЦР величиной 207 п.н. проводили методом электрофореза в 2% агарозном геле.

Для определения генотипа ВГС амплифицировали и секвенировали два участка вирусного генома — core и фрагмент участка NS5B с праймерами (табл.). Обратную транскрипцию и амплификацию участков геномов core и NS5B проводили с помощью наборов Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit и Fast Start High Fidelity PCR System (Roche) согласно протоколу производителя. Для амплификации участка core условия обоих раундов ПЦР были следующими: 94°C — 5 мин, затем 35 циклов денатурации при 94°C — 45 мин, отжига при 55°C — 45 сек и удлинение цепи при 72°C — 90 сек, финальная элонгация — 72°C — 7 мин. Размер полученного фрагмента — 1043 п.н.

Условия одностадийной ПЦР для амплификации области NS5B генома ВГС были следующие: 94°C — 5 мин, затем 40 циклов денатурации 94°C — 30 сек., отжига при 55°C — 30 сек. И удлинение цепи при 72°C — 45 сек, финальная элонгация при 72°C — 7 мин. Размер полученного фрагмента 398 нт.

Продукты амплификации вырезали из геля и выделяли из агарозного геля с помощью набора «QIAquick Gel Extraction kit» (QIAGEN). Первичную нуклеотидную последовательность определяли на автоматическом секвенаторе 3130 Genetic Analyzer (ABI). На основании полученных последовательностей было построено филогенетическое дерево с временной шкалой. Для этого использовали пакет программ BEAST v1.8.2, алгоритм которых основан на Bayesian Markov chain Monte Carlo method. Деревья были построены для двух

Праймеры, использованные для амплификации фрагментов генома ВГС

Участок генома ВГС	Последовательность	Положение	Направление	Положение в геноме*
5'-НТО	5'- ctg tga gga act act gtc tt -3'	Внешний	Прямой	45-64
	5'- tat cag gca gta cca caa gg -3'	Внешний	Обратный	275-298
	5'- ttc acg cag aaa gcg tct ag -3'	Внутренний	Прямой	63-82
	5'- acc caa cac tac tcg gct ag -3'	Внутренний	Обратный	250-269
core	5'- gct agc cga gta gtg ttg gg -3'	Внешний	Прямой	249-268
	5'- acc agt tca tca tca tat ycc -3'	Внешний	Обратный	1300-1320
	5'- gaa agg cct tgt ggt act gc -3'	Внутренний	Прямой	273-292
	5'- ttc atc atc ata ttc cat gcc -3'	Внутренний	Обратный	1294-1315
NS5B	5'- ttc tcr tat gay acc cgc tgy ttt ga -3'	—	Прямой	8250-8275
	5'- tac ctv gtv ata gcc tcc gtg aa -3'	—	Обратный	8616-8638

Примечание. * Нумерация нуклеотидных позиций приведена по прототипному изоляту ВГС, штамм H77, генотип 1a (номер в базе данных GenBank AF011753).

фрагментов: core и NS5B. Скорость мутации в core — $6,5 \times 10^{-4}$ замен на сайт в год, NS5b — $1,3 \times 10^{-3}$ замен на сайт в год. Были использованы: модель SRD06 [11], Constant population size model и relaxed clock — для последовательностей участка core, и Exponential growth — для последовательностей участка NS5B. Запуск был сделан для 100 млн генераций. В Tracer v1.6 было оценено качество постановки (ESS>200). Все запуски были сделаны в двух повторах. Деревья были анатированы в TreeAnnotator v1.8.3, первые 10% были отброшены когда были построены Maximum Clade Credibility (MCC) деревья. Для визуализации использовались igTree v1.4.2. и CorelDRAW X7.

Статистическая обработка данных проведена с использованием вариационной статистики с помощью стандартной программы EXCEL 2010 и программы статистической обработки данных GraphPadPism 4. Статистическая обработка данных включала: выявление достоверности различий средних значений показателей в сравниваемых группах с использованием критерия Хи-квадрат (различия оценивались как достоверные при вероятности 95% — $p < 0,01$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

По данным официальной статистики, на момент сбора образцов сыворотки крови (2008 год) заболеваемость острым гепатитом С (ОГС), отражающая новые случаи заражения, в регионе не превышала среднероссийский показатель (1,5 и 2,8 на 100 тыс. нас. соответственно). Заболеваемость ХГС в Хабаровском крае в 2008 г. составила 59,1 на 100 тыс. нас., что в 1,5 раза выше среднего показателя по РФ в этом же году (39,1 на 100 тыс.). Анализ многолетней динамики показал, что, как и в РФ в целом, в Хабаровском крае наблюдается тенденция к снижению заболеваемости ОГС. Однако на протяжении 10 лет (с 2005 по 2015 гг.) в регионе отмечаются высокие показатели заболеваемости ХГС, превышающие в среднем в 1,5 раза заболеваемость ХГС в РФ. Наибольшая заболеваемость ХГС в Хабаровске была зарегистрирована в 2010 году и составила 62,7 на 100 тыс. нас. За последние пять лет наблюдается тенденция к некоторому снижению заболеваемости ХГС в Хабаровском крае, в 2015 году этот показатель составил 46,5 на 100 тыс. нас. (в РФ — 38 на 100 тыс. нас.).

По результатам проведенного серологического исследования общая распространенность анти-ВГС в обследованной когорте составила 9,3% (87/940). Наибольшая частота выявления анти-ВГС наблюдалась в возрастной группе 40 — 49 лет и составила 20,8 % (20/96), 30 — 39 лет — 20,2 % (18/89), лиц старше 60 лет — 16,8% (16/95). В возрастной группе 50 — 59 лет происходит статистически значимое снижение частоты выявления анти-ВГС по сравнению с предыдущей возрастной группой 40 — 49 лет (8,2% против 20,8%, $p < 0,01$), и подъем до 16,8% среди лиц старше 60 лет.

Обращает на себя внимание возрастная группа лиц 20 — 29 лет, где частота выявления анти-ВГС составила 13,1% (13/99), что в 6 раз выше по сравнению с частотой выявления анти-ВГС в предыдущей возрастной группе 15 — 19 лет (2,2%, 2/90). В детских и подростковых возрастных группах частота выявления анти-ВГС варьирует от 1,0 до 3,8%, что достоверно ниже по сравнению с взрослыми возрастными группами ($p < 0,01$).

Доля лиц с текущей ВГС-инфекцией (положительный результат выявления РНК ВГС) в обследованной когорте составила 4,2% (39/940). Наибольшая частота выявления РНК ВГС наблюдалась в возрастных группах 40 — 49 лет (9,4%, 9/96), 30 — 39 лет (8,9%, 8/89) и 20 — 29 лет (8,1%, 8/99). Также высокая

частота выявления РНК ВГС отмечена среди лиц старше 60 лет — 7,4% (7/95) и в группе 50 — 59 лет — 5,1% (5/98). Аналогично анти-ВГС, статистически достоверный подъем частоты выявления РНК ВГС происходит, начиная с возрастной группы 20 — 29 лет ($p < 0,01$).

Среди детей в возрасте 1 — 4 года большинство случаев анти-ВГС не сопровождалось выявлением РНК ВГС (3,8% против 0,5%), что свидетельствует о перенесенной инфекции или сохранившихся материнских антителах. В старших детских группах, до 14 лет включительно, не выявлено ни одного случая текущей ВГС-инфекции, подтвержденной обнаружением РНК ВГС. Среди подростков 15 — 19 лет и среди взрослых лиц около половины случаев выявления анти-ВГС сопровождалось детекцией РНК ВГС, что указывало на текущую инфекцию. Среди взрослого населения доля лиц с предполагаемой перенесенной инфекцией (наличие анти-ВГС при отсутствии выявляемой РНК ВГС) варьировала от 38 — 39% в группах 50 — 59 лет и 20 — 29 лет соответственно до 64 — 66% в группах старше 60 лет, 40 — 49 лет и 30 — 39 лет соответственно.

Анализ генотипического разнообразия выявленных изолятов ВГС продемонстрировал доминирование в Хабаровском крае генотипа 1b (64,1%, 25/39). Доля субтипа 3a составила 28,2% (11/39). Генотип 3a не был выявлен среди лиц старше 50 лет, тогда как генотип 1b был представлен во всех возрастных группах. Три изолята были единичными представителями генотипов 1a, 2a и 2c. Средний возраст лиц с субтипом 1b составил $42,3 \pm 3,3$ лет, лица с субтипом 3a были несколько моложе ($38,3 \pm 2,6$ лет), однако различия не были статистически достоверными.

Для реконструкции истории распространения ВГС в Хабаровском крае нами был проведен филогенетический анализ с временной шкалой выявленных геновариантов вируса. Для более точной реконструкции заносов в качестве референсных образцов были использованы как последовательности, взятые из GenBank, так и российские изоляты из 5 регионов РФ (Москва, Ростов, Тыва, Якутия, Свердловск), выделенные также в 2008 году. Деревья были для наибольшей информативности построены по двум участкам генома — core (1043 п.о.) и NS5B (389 п.о.). Результаты анализа двух фрагментов генома ВГС дали сходные результаты.

В результате было установлено, что генотип 2a был занесен в регион около 40 лет назад из Японии, 2c — 45 лет назад из Европы, 1a — из Европы около 35 лет назад. Наиболее распространенный генотип 1b был занесен на данную территорию порядка 55 — 65 лет назад из Японии и США. В дальнейшем ряд штаммов генотипа 1b закрепились на данной территории, а другие вышли за пределы края и распространяются в других регионах Российской Федерации.

Генотип 3a многократно заносился на данную территорию из различных регионов мира — Индии и Пакистана, Японии, Европы. Индийско-пакистанский штамм был занесен в Хабаровский край около 50 лет назад и сейчас, скорее, распространен в Республике Тыва. Японский штамм появился сравнительно недавно, порядка 25 лет назад. Он одновременно попал на территорию Якутии, Ростова и Хабаровска. Импортное происхождение новых штаммов ВГС генотипа 3a из Европы происходило многократно, эти штаммы встречаются на всей территории России.

ОБСУЖДЕНИЕ

Основной задачей исследования являлось определение распространенности ВГС среди населения Хабаровского края и выявление возрастных групп, наиболее пораженных этой инфекцией. Данная информация необходима для

уточнения когорт, в которых целесообразно сосредоточить скрининговые программы, направленные на наиболее полное выявление инфицированных ВГС лиц. Аналогичные исследования, проведенные в США, продемонстрировали наиболее высокую частоту выявления анти-ВГС (до 4,3%, что в 5 раз превышает показатель в общей популяции) в группе лиц, рожденных между 1945 и 1965 гг. [5]. Это в итоге привело к появлению рекомендаций по скринингу на анти-ВГС для данного поколения и смещению ориентированности скрининговых программ от групп риска к возрастным когортам [8, 12].

По данным официальной регистрации заболеваемости в РФ наиболее высокий показатель заболеваемости ГС в целом по стране регистрируется в возрастной группе 30 — 39 лет, на долю которой приходится 32% всех состоящих на учете больных ГС. Второе место по показателю заболеваемости ХГС в большей части округов занимают лица в возрасте 20 — 29 лет, на долю которых приходится около 24% от всех больных ХГС. Однако в Дальневосточном Федеральном округе второе место по заболеваемости ХГС занимает возрастная группа 40 — 49 лет, которая по всем остальным округам РФ занимает лишь третье место по распространенности и на ее долю приходится 17 — 23% от всех больных ХГС [1].

Результаты данного популяционного исследования указывают на наибольшую распространенность ВГС среди лиц в возрасте от 30 до 49 лет. В следующей возрастной группе 50 — 59 лет частота выявления маркеров ВГС снижается в два раза и снова возрастает среди лиц старше 60 лет. Такое распределение маркеров ВГС позволяет предполагать существование в регионе двух моделей передачи ВГС. Всего выделяют три модели передачи ВГС на основании данных по сероэпидемиологии ВГС. В странах, для которых характерна первая модель (США, Австралия), большинство случаев инфекции выявляют среди лиц в возрасте 30 — 49 лет, заразившихся в относительно недавнем прошлом (10 — 30 лет назад). В странах, для которых характерна вторая модель передачи ВГС (Япония, Италия), большинство случаев заражения регистрируют среди пожилых лиц, инфицированных, по-видимому, в отдаленном прошлом. В странах с третьей моделью распространения ВГС (Египет) высокие показатели инфицированности наблюдаются во всех возрастных группах, что указывает на сохраняющийся риск передачи ВГС. В странах с первой моделью передачи вируса инъекционная наркомания является доминирующим фактором риска, тогда как при второй и третьей моделях передачи ВГС основную роль в распространении вируса играют небезопасные инъекции и контаминированное оборудование, применяемое при медицинских манипуляциях [13]. Применительно к полученным в нашем исследовании данным такая классификация позволяет отнести Хабаровский край сразу к двум первым моделям передачи вируса.

Полученные в данном исследовании результаты выявления ВГС в различных возрастных когортах населения Хабаровского края свидетельствуют о высокой степени пораженности инфекцией практически всех возрастных групп в интервале от 20 лет до ≥ 60 лет. При этом, согласно данным анкетирования, никто из обследованных лиц, у которых были выявлены маркеры ГС, не знал о своем статусе. Разумеется, обследованную когорту нельзя рассматривать как репрезентативную для условно здорового населения Хабаровского края. Поскольку данная когорта формировалась из лиц, проходящих рутинное лабораторное обследование в поликлинике Дальневосточного окружного Центра по профилактике и борьбе со СПИД, наряду с беременными и пациентами, проходящими обследование перед плановыми хирургическими вме-

шатательствами, в нее могли войти и пациенты с хроническими заболеваниями печени неясной этиологии, а также пациенты различных групп риска (потребители наркотиков и лица, практикующие опасные сексуальные связи). Тем не менее, результаты, полученные в данной когорте среди взрослого населения Хабаровского края, в несколько раз превышают условный показатель, применяемый для дифференциации средней и высокой распространенности ВГС в мире, равный 3,5% [9].

Обращает на себя внимание относительно невысокая частота выявления маркеров ГС среди детей и подростков при столь широкой распространенности ВГС среди взрослого населения. Резкий подъем частоты выявления ВГС-инфекции происходит, начиная с лиц возрастной группы 20 — 29 лет. По-видимому, в распространение инфекции в регионе основной вклад дают факторы риска и пути передачи, характерные для взрослых лиц, в первую очередь, инъекционная наркомания. Так, в 2000 г. общая заболеваемость наркоманией в Хабаровском крае превышала общероссийский показатель на 40%, при этом в общей структуре заболеваемости наркоманией 76% приходится на опиоидную инъекционную наркоманию [4]. Косвенно на вклад инъекционной наркомании в распространении ВГС в регионе указывает распространенность инъекционной передачи ВИЧ. По данным Центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями Министерства здравоохранения Хабаровского края, в период с 1992 по 2006 годы показатель наркотической передачи ВИЧ-инфекции составлял в среднем 68,9%, к 2012 году данный показатель снизился и в среднем составляет 51,6%.

Для понимания причин столь широкого распространения ВГС в обследованной когорте и для реконструкции истории распространения ВГС в Хабаровском крае нами был проведен филогенетический анализ с временной шкалой для выявленных геновариантов вируса. Распределение генотипов ВГС среди выявленных в данном исследовании штаммов соответствовало описанному ранее в дальневосточном регионе [3] — доминировал генотип 1b, несколько реже встречался генотип 3a, генотипы 1a и 2 представлены единичными изолятами. Предположение о том, что в разных возрастных группах циркулируют разные генотипы ВГС не подтвердилось — генотипы 1b и 3a встречались во всех возрастных группах, и средний возраст лиц, инфицированных этими генотипами, достоверно не отличался.

Филогенетический анализ со временной шкалой, проведенный для выявленных в регионе штаммов ВГС, показал, что неоднократные заносы разных генотипов ВГС на территорию Хабаровского края происходили в XX веке в разные временные интервалы, первым в регион попал и распространился генотип 1b, примерно на 15 лет позднее — генотип 3a. В Хабаровском крае для обоих доминирующих в регионе генотипов ВГС (1b и 3a) характерно наличие родственных штаммов, эволюционировавших на одной территории на протяжении нескольких десятков лет, а также присутствие отдельных вариантов, связанных с циркулирующими в других регионах России и мира штаммами вируса. Формирование и распространение специфичных для Хабаровского края штаммов ВГС генотипов 1b и 3a указывает на длительный и интенсивный эпидемический процесс ВГС-инфекции в регионе, приведший к высокому уровню инфицированности населения региона.

Таким образом, полученные результаты продемонстрировали широкое распространение ВГС в Хабаровском крае, сформировавшееся в результате длительной циркуляции вируса в регионе. Для понимания эпидемиологиче-

ской ситуации по ГС в регионе необходимы сероэпидемиологические исследования, включающие в себя большие когорты условно здорового населения всех возрастных групп.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №15-15-30039).

ЛИТЕРАТУРА

1. Вирусные гепатиты в Российской Федерации. Под ред. В.И.Покровского, А.Б.Жебруна. СПб, ФБУН НИИЭМ им. Пастера, 2013.
2. Мукомолов С.Л., Левакова И.А., Сулягина Л.Г., Синайская Е.В., Болсун Д.Д., Иванова Н.В. Современная эпидемиология гепатита С в России. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2012, 6: 21-25
3. Пименов Н.Н., Чуланов В.П., Комарова С.В. и др. Гепатит С в России: эпидемиологическая характеристика и пути совершенствования диагностики и надзора. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2012, 3: 4-10.
4. Ракицкий Г.Ф., Плющенко В.Н., Дорожкина Л.И., Брылева И.Н., Песня С.В. О состоянии психиатрической и наркологической помощи населению края и мерах по ее совершенствованию. Здравоохранение Дальнего Востока. 2011, 4 (50): 25-34.
5. Armstrong G.L., Wasley A., Simard E.P. et al. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1999 through 2002. Ann. Intern. Med. 2006, 144: 705-714.
6. Durham D.P., Skrip L.A., Bruce R.D. et al. The impact of enhanced screening and treatment on hepatitis C in the United States. Clin. Infect. Dis. 2016, 62(3):298-304. doi: 10.1093/cid/civ894. Epub. 2015 Nov 30.
7. Global Burden of Disease Hepatitis C Working Group. Global burden of disease (GBD) for hepatitis C. J. Clin. Pharmacol. 2004, 44: 20-29.
8. McGarry L.J., Pawar V.S., Panchmatia H.R. et al. Economic model of a birth cohort screening program for hepatitis C virus. Hepatology. 2012, 55 (5): 1344-1355.
9. Mohd Hanafiah K., Groeger J., Flaxman A.D., Wiersma S.T. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. Hepatology. 2013, 57 (4): 1333-1342.
10. Shepard C.W., Finelli L., Alter M.J. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. Lancet Infect. Dis. 2005, 5: 558-567.
11. Shapiro B., Rambaut A., Drummond A.J. Choosing appropriate substitution models for the phylogenetic analysis of protein-coding sequences. Mol. Biol. Evol. 2006, 23 (1): 7-9.
12. Smith B.D., Morgan R.L., Beckett G.A. et al. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Recommendations for the identification of chronic hepatitis C virus infection among persons born during 1945-1965. MMWR Recom. Rep. 2012, 61 (No. RR-4): 1-32. Erratum in: MMWR Recom. Rep. 2012, 61: 886.
13. Wasley A., Alter M.J. Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. Semin Liver Dis. 2000, 20: 1-16.

Поступила 23.12.16

Контактная информация: Соболева Наталья Васильевна,
142782, Москва, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита,
27 км Киевского шоссе, р.т. (495)841-90-12

Н.А.Михайлова, Е.О.Калиниченко, А.В.Солдатенкова, Н.К.Ахматова

РЕКОМБИНАНТНЫЕ АНТИГЕНЫ PSEUDOMONAS AERUGINOSA: ВЛИЯНИЕ НА ИММУННЫЙ ОТВЕТ У МЫШЕЙ

НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова

Цель. Исследование влияния рекомбинантных антигенов *P. aeruginosa* на ключевые эффекторы иммунной системы. *Материалы и методы.* Мышам внутрибрюшинно вводили по 25 мкг OprF и 50 мкг анатоксина, сорбированных на геле гидроксида алюминия, с интервалом в 2 недели. Через 7 дней после последней иммунизации у животных оценивали субпопуляционную структуру лимфоцитов селезенки методом проточной цитометрии. Уровень цитокинов в сыворотках мышей после однократной иммунизации рекомбинантными антигенами OprF и анатоксином исследовали через 4, 8, 24 час и 14 суток методом проточной цитометрии при помощи тест-системы FlowCytomix Mouse Th1/Th2 10 plex. *Результаты.* Рекомбинантные антигены OprF и анатоксина оказывали влияние на молекулярно-клеточные механизмы иммунного ответа, приводящие к изменению уровня экспрессии дифференцировочных и активационных молекул, а также синтеза Th1/Th2/Th17/Th21/Th22 цитокинов у мышей, необходимых для эффективной презентации антигена. *Заключение.* Комплекс рекомбинантных OprF и анатоксина способствовал формированию полноценного иммунного ответа против синегнойной палочки.

Журн. микробиол., 2017, № 3, С. 52—58

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, белок F наружной мембраны (OprF), анатоксин, рекомбинантный белок, иммунофенотип, цитокины

N.A.Mikhaylova, E.O.Kalinichenko, A.V.Soldatenkova, N.K.Akhmatova

RECOMBINANT ANTIGENS OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA: EFFECT ON IMMUNE RESPONSE IN MICE

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Russia

Aim. Study the effect of recombinant antigens of *P. aeruginosa* on key effectors of the immune system. *Materials and methods.* Mice were immunized intraperitoneally with 25 µg of OprF and 50 µg of anatoxin sorbed on aluminium hydroxide gel with a 2 week interval. 7 days after the last immunization spleen lymphocyte subpopulation structure was evaluated by flow cytometry. Cytokine levels in mice sera were studied after a single immunization with recombinant OprF and anatoxin at 4, 8, 24 hours and 14 days by flow cytometry using FlowCytomix Mouse Th1/Th2 10 plex. *Results.* OprF recombinant antigens and anatoxin affect molecular-cell mechanisms of immune response resulting in alteration of expression of differentiating and activating molecules as well as synthesis of Th1/Th2/Th17/Th21/Th22 cytokines in mice that are necessary for effective presentation of the antigen. *Conclusion.* Complex of recombinant OprF and anatoxin facilitated formation of complete immune response against pseudomonas.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 3, P. 52—58

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, outer membrane protein F, anatoxin, recombinant protein, immune phenotype, cytokines

ВВЕДЕНИЕ

Бактерия *Pseudomonas aeruginosa* — грамотрицательная палочка, относящаяся к семейству Pseudomonadaceae, условный патоген, способный вызывать заболевания у людей, животных и растений. Она имеет важное медицинское

значение вследствие своей убиквитарности, широкой антибиотикорезистентности, а клиническое течение патологии, вызванной данным возбудителем, характеризуется полиорганностью поражения (кожа, подкожная клетчатка, мочевыводящие пути, ЖКТ, ЦНС и др.) [4].

Инфекции, вызванные синегнойной палочкой, зачастую встречаются у иммунокомпрометированных лиц либо осложняют течение предсуществующей острой (ожоговая болезнь) или хронической (муковисцидоз) болезни [7, 10].

В настоящее время проводятся исследования различных факторов вирулентности *P. aeruginosa*, изучаются новые пути введения вакцин (пероральный, назальный), разрабатываются модели рекомбинантных вакцин нового поколения [6]. Но результаты клинических испытаний вакцин против синегнойной инфекции, проводимых во всем мире, не подтверждают их высокую эффективность, которая могла бы обеспечить защиту от *P. aeruginosa* [11].

Причины неудач остаются не вполне ясными. Один из факторов, мешающих организму выработать эффективный иммунный ответ на вакцинацию — способность синегнойной палочки изменять фенотип при росте в организме. Так, положить начало колонизации дыхательных путей может бактерия немуюкоидного фенотипа с низкой продукцией альгината, а затем изменить фенотип в сторону его гиперпродукции с образованием биопленки, но скудным синтезом цепей О-антигена [12].

Белки наружной мембраны — одни из наиболее многообещающих в качестве компонентов кандидатных вакцин благодаря возможности получения их генно-инженерным методом и генетической либо химической модификацией [11]. Современная технология белков располагает методами конъюгирования между собой и с веществами отличной химической природы, например, полисахаридами. Методы генной инженерии позволяют синтезировать в клетках определенные антигены с заранее заданными свойствами, и в настоящее время с применением этих методов разрабатываются вакцины против *P. aeruginosa* и исследуются иммуногенные свойства кандидатных препаратов [2, 5, 6, 9].

Ранее получены и исследованы рекомбинантный белок наружной мембраны (OprF) [1] и рекомбинантная делеционная атоксическая форма экзотоксина А (анатоксин) [3], которые обладали протективной активностью, защищая животных от живой вирулентной культуры *P. aeruginosa*. При этом подобрана оптимальная схема введения препаратов и оптимальные иммунизирующие дозы, а также показано, что использование обоих рекомбинантных белков в комплексе приводило к аддитивному эффекту [2].

В настоящее время индукция иммунного ответа под воздействием *P. aeruginosa*, а также клеточные и молекулярные события, вызванные антигенными компонентами этого патогена, остаются мало охарактеризованными. Поэтому целью нашего исследования явилось изучение влияния рекомбинантных антигенов *P. aeruginosa* на ключевые эффекторы иммунной системы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве препарата исследования использовали комплекс очищенных рекомбинантных белков (рекомбинантный белок наружной мембраны и рекомбинантный анатоксин), получение и очистка которых описана в предыдущих исследованиях [2]. Для иммунизации препарат рекомбинантных белков смешивали в равных весовых долях с гелем гидроксида алюминия (НПО «Микроген»), разводили в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) и проводили

сорбцию в течение 12 часов при температуре 4°C. Вакцинный препарат вводили мышам-самкам линии BALB/c весом 14 — 16 г внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл.

Суспензию мононуклеарных лейкоцитов (МЛ) получали, гомогенизируя селезенку в 5 мл среды RPMI 1640 (ПанЭко, Россия). Клетки осаждали центрифугированием с ускорением 250 g при температуре 4°C в течение 10 минут. Осадок ресуспендировали и удаляли эритроциты гипотоническим шоком: к осадку добавляли 900 мкл дистиллированной воды и перемешивали 10 сек, затем добавляли 100 мкл 10-кратного раствора Хэнкса (МПБП, Россия). После лизиса эритроцитов спленоциты осаждали и дважды отмывали средой RPMI-1640. Подсчет живых и мертвых клеток проводили в камере Горяева, используя 0,1% раствор трипанового синего в 0,9% растворе NaCl.

Оценку субпопуляционной структуры лимфоцитов селезенки мышей осуществляли методом проточной цитометрии с применением моноклональных антител против соответствующих антигенов различных субпопуляций лимфоцитов. Через 7 дней после последней иммунизации у животных забирали селезенки в соответствии с «Правилами проведения работ с экспериментальными животными» для последующего получения лимфоцитов. Клетки отмывали холодным ФСБ с 1% фетальной телячьей сывороткой (ФТС) и окрашивали согласно инструкции производителя (Caltag Laboratories, США) мечеными флюорохромом моноклональными антителами к поверхностным клеточным маркерам (CD3, CD4, CD8, CD19, МНС II, меченные FITC; CD25, NK1.1 (CD16/CD32) — PE). Затем клетки отмывали 2 раза холодным ФСБ с 1% ФТС. Результаты учитывали на проточном цитометре FC-500 (Beckman Coulter, США). Гейт (окно) популяции клеток устанавливали на основе комбинации прямого и бокового светорассеяния и размера клеток. При учете результатов подсчитывали 5000 клеток в гейте. Статистическую обработку материала проводили при помощи программного пакета WinMDI 2.8.

Уровень цитокинов в сыворотках и супернатантах селезенки мышей определяли на проточном цитометре FC-500 (Beckman Coulter, США) при помощи тест-системы FlowCytomix Mouse Th1/Th2 10 plex с использованием шариков, сенсibiliзировавшихся моноклональными антителами к цитокинам (GM-CSF, INF- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α), eBioscience (США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Комплекс рекомбинантных OrgF и анатоксина в дозах 25 мкг и 50 мкг вводили самкам мышей BALB/c. Через 4 часа, 8 часов, 24 часа и 14 дней после иммунизации по десять мышей использовали для тотального забора крови с целью получения групповых пулов сыворотки крови. В качестве контрольной сыворотки использовали пул сывороток крови, отобранной у десяти мышей до иммунизации.

Уровень TNF- α в сыворотке крови мышей до введения рекомбинантных белков (0 ч) составлял 4,53 пг/мл. Введение препарата способствовало постепенному повышению уровня TNF- α , который достигал максимальных значений к 24 ч (38,5 пг/мл, $p < 0,05$). К концу второй недели после иммунизации данный показатель снижался до 7,5 пкг/мл. IL-1 β у мышей до введения белков составил 2,43 пг/мл, после введения препарата уровень его активно возрастал и к 8 часам достигал максимального значения (32,47 пкг/мл). Далее происходило его постепенное снижение до 10,4 пкг/мл к 24 часам и до 4,82 пкг/мл — на 14 сутки наблюдения. Аналогичная картина наблюдалась в отношении

IL-1 α : максимальный уровень выявлен на 8 ч исследования, который постепенно понижался к 24 часам (6,7 пкг/мл) и 14 суткам (7,84 пкг/мл). Уровень IFN- γ повышался только на 24 ч после введения препарата (с 1,4 до 15,23 пкг/мл, $p < 0,05$) и снижался до 5,9 пкг/мл через 14 суток. Содержание IL-12p70 значимо возрастало к 8 часам наблюдения (23,13 пкг/мл) и достигло максимальных значений через 24 часа (34,23 пкг/мл).

Изначально концентрация IL-2, обеспечивающего пролиферацию и дифференцировку Th1 клеток, соответствовала 2,8 пкг/мл. Использование комплекса приводило к некоторому повышению этого показателя у мышей уже через 4 часа, и он оставался на уровне нормальных значений весь период наблюдения. Уровень IL-4 незначительно повышался (с 4,99 до 7,1 пкг/мл) через 8 часов после введения препарата и достигал нормальных значений к 24 часам. Уровень IL-5 через 4 часа после иммунизации повышался приблизительно в 3 раза по сравнению с интактными мышами ($4,26 \pm 1,2$), в то время как уровень IL-10 нарастал только к концу 1 суток после введения препарата (в 4 раза) — с 5,7 до 21,13 пкг/мл. Положительная динамика на срок 8 и 24 часов отмечалась в отношении IL-6 (повышение с 3,42 до 7,46 и 18,43 пкг/мл соответственно). Только со стороны IL-6 (повышение с 3,42 до 7,46 и 18,43 пкг/мл соответственно). Только со стороны IL-6 (повышение с 3,42 до 7,46 и 18,43 пкг/мл соответственно). Только со стороны IL-6 (повышение с 3,42 до 7,46 и 18,43 пкг/мл соответственно). Только со стороны IL-6 (повышение с 3,42 до 7,46 и 18,43 пкг/мл соответственно).

Далее были изучены показатели Th17/Th21/Th22 цитокинов в сыворотках мышей под воздействием комплекса рекомбинантных белков. Значительное усиление продукции IL-17 происходило уже в первые часы после введения препарата, и его пик приходился на 8 часов (4801 пкг/мл). Через сутки происходило снижение уровня данного цитокина, но он все равно был выше исходных значений в 7,56 раза (146,3 пкг/мл против 19,33 пкг/мл). К 14 суткам данный показатель возвращался к исходному уровню (19,33 пкг/мл). Концентрация IL-21 также нарастала постепенно, начиная с 4 часов (с 0 пкг/мл до 3,66 — 11,77 пкг/мл), максимальные значения IL-21 (17,33 пкг/мл) отмечались через 8 часов после введения препарата. В отношении IL-22 выявлено значимое повышение концентрации только через 8 часов после иммунизации животных (15,03 пкг/мл). На 14 сутки уровень IL-21 и IL-22 соответствовали фоновым значениям.

Таким образом, в отношении IL-1 β , IL-1 α и TNF- α отмечалось повышение уровня на все сроки наблюдения с постепенным снижением к концу суток (кроме TNF- α). Концентрация IL-2 также возрастала в те же сроки, но не столь существенно. IFN- γ повышался только через 24 часа после иммунизации, а IL-12p70 — через 8 и 24 часа. Таким образом, комплекс рекомбинантных белков индуцировал синтез Th1 цитокинов у мышей. В отношении Th2 цитокинов наблюдали статистически значимый ответ со стороны IL-4, IL-5 и IL-10 (соответственно через 8,4 и 24 часа). Продукция IL-6 была более результативной на 8 и 24 часа определения. Исследование динамики Th17/Th21/Th22 цитокинов выявило повышение уровня IL-17A и IL-21 на все сроки наблюдения, а IL-22 — только через 8 часов (повышение в 3,2 раза).

Комплекс рекомбинантных OpgF и анатоксина у мышей BALB/c статистически значимо повышал уровень Th1/Th2/Th17/Th21/Th22 цитокинов в сыворотках крови в разные сроки после введения: через 4 часа IL-1 α , IL-5 (соответственно в 5,14; 1,9 раза); через 8 часов — IL-1 β , IL-2, IL-4 (соответственно в 13; 2,7; 1,4 раза), а также Th17/Th21/Th22 цитокинов — IL-17A и IL-22 (соответственно в 248 и 3,24 раза) и IL-21 (с неопределяемого значения до $17,13 \pm 1,59$ пкг/мл); через 24 часа — IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF- α и IFN- γ (соответственно, в 8,5; 10,8; 5,3; 3,7; 5,4 раза) по сравнению с исходным уровнем.

Таблица 1. Экспрессия цитокинов в культуре спленоцитов мышей BALB/c под воздействием комплекса рекомбинантных белков

Цитокин		Мыши			
Тип	Класс	Интактные	Интактные + ФГА	Иммунизированные	Иммунизированные + ФГА
Th1	IL-1 β	5,7 \pm 0,36	39,37 \pm 2,96	5,1 \pm 0,91	21,2 \pm 2,1*
	IL-1 α	5,3 \pm 0,75	58,65 \pm 1,94	4,23 \pm 0,51	10,6 \pm 2,19*
	IL-2	9,3 \pm 1,41	17,33 \pm 2,05	5,6 \pm 0,91	21,37 \pm 2,87
	TNF- α	3,3 \pm 0,65	11,8 \pm 7,43	3,23 \pm 0,8	16,2 \pm 2,1
	IFN- γ	31,97 \pm 3,32	107,9 \pm 13,47	48,57 \pm 6,23	164,7 \pm 7,37*
	IL-12p70	6,76 \pm 0,45	18,2 \pm 2	18,27 \pm 2,1	45,17 \pm 5*
Th2	IL-4	6,43 \pm 0,22	24,07 \pm 2,9	4,26 \pm 1,05	25,3 \pm 2,74
	IL-5	3,36 \pm 0,8	12,87 \pm 2,27	4,4 \pm 0,01	43,43 \pm 58,78*
	IL-6	4,66 \pm 0,85	21,37 \pm 2,75	3,76 \pm 0,35	15,4 \pm 2,95
	IL-10	12,43 \pm 2,27	45,77 \pm 3,65	28,33 \pm 2,96	67,73 \pm 5,98*
	IL-13	8,51 \pm 1	514,9 \pm 53,03	9,2 \pm 1,01	112,41 \pm 14,01*

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. * достоверность различий по сравнению со стимулированными спленоцитами неиммунизированных мышей, $P < 0,05$ (Тест Манна-Уитни).

Исходя из вышеприведенных данных, можно сделать заключение, что препарат активирует как клеточное, так и гуморальное звено иммунной системы. Учитывая, что в сыворотках на 14 сутки уровень практически всех цитокинов соответствовал референсным значениям, интерес представляло определение стимулированной активности лимфоцитов селезенки иммунизированных мышей. В качестве контроля использовали селезенки интактных мышей.

Данные табл. 1 показывают, что фитогемагглютинин (ФГА) в культуре интактных спленоцитов активнее индуцировал синтез IL-1 β , IL-1 α (соответственно в 1,86 и 5,53 раза), а в культуре клеток иммунизированных мышей — регуляторных цитокинов IFN- γ и IL-12p70 (соответственно в 1,52 и 2,5 раза). По экспрессии IL-2 и TNF- α эти группы значимо между собой не отличались. В отношении Th2 цитокинов спленоциты иммунизированных мышей при стимуляции их ФГА продуцировали большее количество IL-5 и IL-10 (в 3,4 и 1,5 раза) и значительно меньшее — IL-13 (в 4,6 раза) по сравнению с неиммунизированными.

Что касается Th17/Th21/Th22 цитокинов, то уровень IL-17A и IL-21 у иммунизированных мышей при стимуляции клеток ФГА статистически значимо не отличался от стимулированной культуры неиммунизированных животных, в отличие от IL-22, где активность спленоцитов у иммунизированных животных превышала значения у интактных в 1,64 раза (табл. 2).

Изучение субпопуляционной структуры лимфоцитов селезенки мышей (табл. 3) показало, что в опытной группе (иммунизированные мыши) повышалось содержание NK-клеток (CD16+/CD32+, в 1,64 раза), Т-хелперов (CD4+, в 1,25 раза), В1-лимфоцитов (CD5+, в 1,13 раза), В2-лимфоцитов (CD19+, в 2,3 раза) при снижении численности цитотоксических лимфоцитов (CD8+, в

Таблица 2. Экспрессия Th17/Th21/Th22 цитокинов в культуре спленоцитов мышей BALB/c под воздействием комплекса рекомбинантных белков

Мыши	IL-17A	IL-21	IL-22
Интактные	154 \pm 7,93	0	11,63 \pm 1,59
Интактные+ ФГА	2444 \pm 82,98	34,6 \pm 4,38	27,87 \pm 2,8
Иммунизир.	38,19 \pm 3,93	17,67 \pm 17,3	25,9 \pm 2,55
Иммунизир. + ФГА	2450 \pm 71,51	39,07 \pm 3,1	45,83 \pm 3,75*

1,47 раза) по сравнению с контролем (неиммунизированные мыши). В общей популяции клеток повышалось содержание типов, экспрессирующих маркеры ранней (CD25+) и поздней (MHCII+) активации клеток.

ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение экспрессии цитокинов при внутрибрюшинном введении мышам комплекса рекомбинантных OpgF и анатоксина позволяет сделать вывод о различной направленности иммунных процессов. Так, данный комплекс у мышей BALB/c в сыворотках крови статистически значимо повышал уровень Th1/Th2/Th17/Th21/Th22 цитокинов в разные сроки после введения: через 4 часа IL-1 α , IL-5; через 8 часов — IL-1 β , IL-2, IL-4, а также Th17/Th21/Th22 цитокинов — IL-17, IL-21; через 24 часа — IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF- α и IFN- γ по сравнению с исходным уровнем. К концу второй недели эти показатели возвращались к исходным значениям, что может свидетельствовать о закономерной нормализации цитокинового профиля мышей.

В культуре спленоцитов у иммунизированных мышей отмечено повышение индуцированной ФГА продукции регуляторных Th1 цитокинов IFN- γ и IL-12p70; Th2 цитокинов — IL-5 и IL-10; снижение уровня IL-13. В отношении Th22 цитокинов — выявлено повышение в 1,64 раза концентрации IL-22 в супернатантах селезенок мышей по сравнению с неиммунизированными животными.

У иммунизированных мышей по сравнению с интактными повышалась численность активированных NK-клеток, Т-хелперов, В1, В2-лимфоцитов при выявленном снижении численности цитотоксических Т-лимфоцитов.

Повышение содержания провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-6 в сыворотке иммунизированных животных должно стимулировать выработку INF- γ NK-клетками и Т-лимфоцитами. Согласно современным представлениям, INF- γ индуцирует дифференцировку CD4 + клеток в Th1-хелперы, обладающие способностью к продукции INF- γ , IL-2 и лимфотоксина- α . INF- α способен ингибировать дифференцировку CD4+ клеток в Th2 тип, синтезирующий IL-4, IL-5, и IL-10, которые являются мощными ингибиторами цитокинов Th1 типа.

В данном исследовании введение мышам комплекса рекомбинантных OpgF и анатоксина приводило к повышению уровня Th9/Th17/Th22 цитокинов. Известно, что IL-17A продуцируется уникальной субпопуляцией Т-хелперных клеток независимо от Th1/Th2 клеточного развития. Th17 клетки играют роль в защите организма от внеклеточных патогенов посредством рекрутирования нейтрофилов и макрофагов в инфицированные ткани [8].

Выявленное в данной работе повышение провоспалительных и противовоспалительных цитокинов свидетельствует о закономерности происходящих событий, поскольку продукция противовоспалительных цитокинов может оказывать сдерживающее действие на чрезмерный синтез провоспалительных цитокинов, способный оказывать повреждающий эффект на ткани и функции органов.

На тканевом уровне Th цитокины ответственны за развитие воспаления с

Таблица 3. Иммунофенотип лимфоцитов селезенок мышей BALB/c под воздействием комплекса рекомбинантных белков

Лимфоциты	Опыт	Контроль
CD3+	58,57 \pm 0,7	61,37 \pm 1,09
CD16+/CD32+	13,28 \pm 1,81*	8,06 \pm 0,68
CD3+/CD16/CD32	5,46 \pm 0,40	3,06 \pm 0,25
CD4 +	45,17 \pm 1,05*	36,04 \pm 0,88
CD25+	29,4 \pm 1,93*	5,33 \pm 0,85
CD5+	51,5 \pm 0,8*	45,3 \pm 0,96
CD19+	28,17 \pm 1,33*	12,17 \pm 1
CD8a+	14,7 \pm 1,03*	21,63 \pm 1,66
MHCII+	25,43 \pm 1,06*	14,3 \pm 0,91

последующей регенерацией тканей. При развитии системной воспалительной реакции цитокины влияют практически на все органы и системы организма, участвующие в регуляции гомеостаза.

Исследования выявили, что комплекс рекомбинантных ОпрF и анатоксина может способствовать формированию клеточного звена иммунного ответа, обеспечивая полноценный противомикробный иммунитет.

Резюмируя вышеизложенное, можно сделать следующее заключение: комплекс рекомбинантных ОпрF и анатоксина *P. aeruginosa* оказывает влияние на молекулярно-клеточные механизмы иммунного ответа, приводящее к изменению уровня экспрессии дифференцировочных молекул и молекул активации, а также синтеза цитокинов у мышей. Действие комплекса рекомбинантных ОпрF и анатоксина связано с регулирующим действием на иммунные механизмы, активацией эффекторов иммунной системы для эффективной презентации антигена и формирования полноценного иммунного ответа. Поэтому комплекс рекомбинантных ОпрF и анатоксина может рассматриваться в качестве кандидата в разработку вакцины против синегнойной палочки.

Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий» на 2016 год.

ЛИТЕРАТУРА

1. Калошин А.А., Гатыпова Е.В., Михайлова Н.А. Получение рекомбинантных форм белка F наружной мембраны *Pseudomonas aeruginosa* и исследование их иммуногенных свойств. Биотехнология. 2011, 2: 74-84.
2. Калошин А.А., Леонова Е.И., Солдатенкова А.В., Михайлова Н.А. Исследование протективных свойств комплекса рекомбинантного белка F наружной мембраны и рекомбинантного анатоксина *Pseudomonas aeruginosa*. Вестник РАМН. 2016, 71 (1): 117-122.
3. Калошин А.А., Исаков М.А., Михайлова Н.А., Вертиев Ю.В. Получение рекомбинантной атоксической формы экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa*. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2012, 9: 330-335.
4. Лазарева А.В., Чеботарь И.В., Крыжановская О.А., Чеботарь В.И., Маянский Н.А. *Pseudomonas aeruginosa*: патогенность, патогенез и патология. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2015, 17 (3): 170-186.
5. Baumann U., Mansouri E., von Specht B.U. Recombinant OprF-OprI as a vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* infections. Vaccine. 2004, 22 (7): 840-847.
6. Döring G., Pier G.B. Vaccines and immunotherapy against *Pseudomonas aeruginosa*. Vaccine. 2008, 26(8): 1011-1024.
7. Edwards-Jones V., Greenwood J.E. What's new in burn microbiology? James Laing Memorial Prize Essay 2000. Burns. 2003, 29: 15-24.
8. Hasan M., Neumann B., Hauptshofer S. et al. Activation of TGF- β -induced non-Smad signaling pathways during Th17 differentiation. Immunology Cell. Biology. 2015, 3: 216-223.
9. Hertle R., Mrsny R., Fitzgerald D.J. Dual-function vaccine for *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of chimeric exotoxin A-pilin protein. Barbieri J.T. (ed.). Infection Immunity. 2001, 69 (11): 6962-6969.
10. Lund-Palau H., Turnbull A.R., Bush A. et al. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: pathophysiological mechanisms and therapeutic approaches. Expert Rev. Respiratory Medicine. 2016, 10 (6): 685-697.
11. Pier G.B., Ramphal R. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. New York, 2010.
12. Worlitzsch D., Tarran R., Ulrich M. et al. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. J. Clinical Investigation. 2002, 109 (3): 317-325.

Поступила 03.02.17

Контактная информация: Михайлова Наталья Александровна, д.м.н., проф., 105064, Москва, М.Казенный пер., 5А, р.т. (495)917-56-30

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ МАРКЕРОВ ЭНТЕРАЛЬНЫХ ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТОВ СРЕДИ ТРУДОВЫХ МИГРАНТОВ, ПРИБЫВАЮЩИХ В РОССИЙСКУЮ ФЕДЕРАЦИЮ

¹Российский университет дружбы народов, Москва; ²Центр гигиены и эпидемиологии в Московской области, Мытищи; ³НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, ⁴Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва

Цель. Определение распространенности маркеров гепатитов А и Е среди трудовых мигрантов, недавно прибывших в РФ из стран с разной степенью эндемичности в отношении этих инфекций. *Материалы и методы.* Были исследованы образцы сыворотки крови от 1333 трудовых мигрантов, недавно прибывших в РФ из Узбекистана (n=464), Таджикистана (n=415), Украины (n=308) и Молдовы (n=146). Анти-ВГА IgG, анти-ВГЕ IgM и IgG определяли с помощью коммерческих ИФА-тестов. РНК ВГЕ определяли в образцах, положительных по анти-ВГЕ IgM, методом ОТ-ПЦР с вырожденными праймерами к участку генома ВГЕ, кодирующему капсидный белок. *Результаты.* Анти-ВГЕ IgG достоверно чаще выявлялись среди мигрантов из Узбекистана и Таджикистана по сравнению с мигрантами из Украины и Молдовы (25,4 и 43,1% против 7,8 и 12,3% соответственно, p<0,05), что отражает степень эндемичности в отношении гепатита Е регионов происхождения обследованных лиц. Частота выявления анти-ВГА IgG также зависела от страны происхождения — серопозитивные лица достоверно реже встречались среди мигрантов из Украины по сравнению с лицами, прибывшими из Молдовы, Узбекистана и Таджикистана (70,1% против 91,8; 98,7; 99,8% соответственно, p<0,05). Анти-ВГЕ IgM, свидетельствующие о текущей или недавно перенесенной инфекции, выявляли среди мигрантов из Узбекистана, Таджикистана, Украины и Молдовы с примерно одинаковой частотой — 3,9; 7,8; 5,8 и 6,8% соответственно. Ни в одном из образцов, положительных по анти-ВГЕ IgM, не была выявлена вирусная РНК, что, по-видимому, связано с коротким периодом вiremии при гепатите Е. *Заключение.* Значительная доля трудовых мигрантов, прибывающих в РФ, имеют анamnестические антитела к ВГА и ВГЕ, величина этого показателя отражает степень эндемичности страны происхождения мигрантов. Высокая частота выявления анти-ВГЕ IgM у трудовых мигрантов, свидетельствующая о текущей или недавно перенесенной инфекции, позволяет предполагать высокую вероятность завоза ВГЕ в РФ, что делает необходимым включение в алгоритм обследования маркеров острой ВГЕ-инфекции.

Журн. микробиол., 2017, № 3, С. 59—64

Ключевые слова: гепатит А, гепатит Е, трудовые мигранты, маркеры вирусных гепатитов

N.D.Alsalikh¹, D.A.Sychev², I.A.Potemkin^{3,4}, K.K.Kyuregyan^{3,4}, M.I.Mikhaylov^{1,3,4}

PREVALENCE OF MARKERS OF ENTERAL VIRAL HEPATITIS AMONG MIGRANT WORKERS ARRIVING IN RUSSIAN FEDERATION

¹Russian University of Peoples' Friendship, Moscow; ²Centre of Hygiene and Epidemiology in Moscow Region, Mytishi; ³Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, ⁴Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia

Aim. Determination of prevalence of markers of hepatitis A and E among migrant workers, who had recently arrived in Russian Federation from countries with various degree of endemicity regarding this infection. *Materials and methods.* Sera samples from 1333 migrant workers, who had recently arrived in Russian Federation from Uzbekistan (n=464), Tadjhikistan (n=415), Ukraine (n=308) and Moldova (n=146) were studied. Anti-HAV IgG, anti-HEV IgM and IgG were de-

terminated using commercial ELISA tests. HEV RNA was determined in samples positive for anti-HEV IgM by RT-PCR with degenerate primers to HEV genome sequence coding capsid protein. Anti-HEV IgG were detected significantly more frequently among migrants from Uzbekistan and Tajikistan compared with migrants from the Ukraine and Moldova (25,4 and 43,1% versus 7,8 and 12,3%, respectively, $p < 0,05$), that reflects the degree of endemicity regarding hepatitis E from regions of origin of the examined individuals. Frequency of detection of anti-HAV IgG also depended on the country of origin — seropositive individuals were present significantly less frequently among migrants from the Ukraine compared with individuals who had arrived from Moldova, Uzbekistan and Tajikistan (70,1% versus 91,8; 98,7; 99,8%, respectively, $p < 0,05$). Anti-HEV IgM that give evidence on the current or recent infection were detected among migrants from Uzbekistan, Tajikistan, Ukraine and Moldova with approximately the same frequency — 3,9; 7,8; 5,8 и 6,8%, respectively. Viral RNA was detected in none of the samples positive for anti-HEV IgM that could be related to the short period of viremia during hepatitis E. *Conclusion.* A significant portion of migrant workers arriving in Russian Federation have anamnestic antibodies against HAV and HEV, and this parameter reflects the degree of endemicity of the country of origin for migrants. High frequency of detection of anti-HEV IgM in migrant workers, that gives evidence on the current and recent infection, allows to assume high possibility of import of HEV into Russian Federation, and this necessitates introduction of acute HEV infection markers into algorithm of examination.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 3, P. 59—64

Key words: hepatitis A, hepatitis E, trade migrants, viral hepatitis markers

ВВЕДЕНИЕ

Миграция населения является одним из важных факторов, определяющих распространение многих инфекций. В настоящее время Россия занимает одно из ведущих мест в мире по притоку трудовых мигрантов. По данным Федеральной миграционной службы в настоящее время в России находятся свыше 10 миллионов иностранных граждан, из них граждан стран СНГ — около 8,7 миллиона человек. Большинство прибывших в Россию трудовых мигрантов составляют граждане Узбекистана, Таджикистана и Украины (42, 16 и 11% соответственно). Страны Средней Азии являются эндемичными в отношении гепатитов А и Е, при этом эпидемиология этих инфекций в регионе имеет свои особенности — если с вирусом гепатита А (ВГА) большинство населения встречается в раннем детстве, переносит бессимптомно и приобретает пожизненный иммунитет, то вирусом гепатита Е (ВГЕ), как правило, инфицируются молодые взрослые лица [13]. ВГЕ широко распространен в странах Средней Азии, где с ним связывают крупные вспышки с высокой летальностью среди беременных женщин [9]. Украина, как и Российская Федерация, относится к странам с переходной стадией эндемичности в отношении гепатита А (ГА), для которой характерно снижение циркуляции ВГА и увеличение неиммунных подростков и молодых взрослых при сохранении достаточно высокого риска инфицирования [2]. О распространенности ВГЕ на территории Украины данные отсутствуют.

В странах умеренного климата, в том числе в Российской Федерации, незавозные (автохтонные) случаи гепатита Е (ГЕ) регистрируется редко, и связаны они, как правило, с зоонозной передачей ВГЕ генотипа 3, способного инфицировать как людей, так и животных (свиней, оленей) [Wedemeyer H. et al., 2012]. В отличие от РФ, в эндемичных регионах, в том числе на территории стран Средней Азии, большинство случаев ГЕ связаны с 1 генотипом вируса, являющимся строгим антропонозом с фекально-оральным механизмом передачи [15]. Завозные случаи ГА и ГЕ в РФ описаны [1,4], однако потенциальный

вклад трудовой миграции в распространение этих инфекций остается неизученным. Целью данного исследования являлось определение распространенности маркеров ГА и GE среди трудовых мигрантов, недавно прибывших в РФ из стран с разной степенью эндемичности в отношении этих инфекций.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Были исследованы образцы сыворотки крови от 1333 трудовых мигрантов, недавно прибывших в РФ из Узбекистана ($n=464$), Таджикистана ($n=415$), Украины ($n=308$) и Молдовы ($n=146$) и проходивших обследование в Центре гигиены и эпидемиологии в Московской области. Образцы были собраны с августа 2015 г. по август 2016 г. и хранились в аликвотах при -70°C до последующего тестирования в ИФА на анти-ВГА IgG, анти-ВGE IgM и IgG и РНК ВGE методом обратной транскрипции — полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР).

Анти-ВГА IgG определили с помощью коммерческой тест-системы ДС-ИФА-АНТИ-NAV-G производства НПО «Диагностические системы». Анти-ВGE IgM и IgG определяли с помощью коммерческих ИФА-тестов ДС-ИФА-АНТИ-NEV-M и ДС-ИФА-АНТИ-NEV-G соответственно производства НПО «Диагностические системы». Все постановки ИФА проводили по протоколам производителя соответствующих тест-систем. РНК ВGE определяли в образцах, положительных по анти-ВGE IgM, методом ОТ-ПЦР с вырожденными праймерами к участку генома ВGE, кодирующему капсидный белок.

Выделение нуклеиновых кислот из сыворотки крови объемом 50 мкл проводили с помощью набора компании «Sileks» на магнитных частичках Sileks MagNa согласно инструкции производителя. Для детекции РНК ВGE в ОТ-ПЦР использовали следующие олигонуклеотиды: внешняя пара праймеров — $5'-aa\text{y}\text{t}\text{a}\text{t}\text{g}\text{c}\text{m}\text{c}\text{a}\text{g}\text{t}\text{a}\text{c}\text{c}\text{g}\text{g}\text{t}\text{t}\text{g}-3'$ (прямой) и $5'-\text{c}\text{c}\text{t}\text{t}\text{a}\text{t}\text{c}\text{t}\text{g}\text{c}\text{t}\text{g}\text{c}\text{t}\text{g}\text{a}\text{g}\text{c}\text{a}\text{t}\text{t}\text{c}\text{t}\text{c}-3'$ (обратный), внутренняя пара праймеров — $5'-\text{g}\text{t}\text{y}\text{a}\text{t}\text{g}\text{y}\text{t}\text{g}\text{c}\text{a}\text{t}\text{a}\text{c}\text{a}\text{t}\text{g}\text{g}\text{c}\text{t}-3'$ (прямой) и $5'-\text{a}\text{g}\text{c}\text{c}\text{g}\text{a}\text{c}\text{g}\text{a}\text{a}\text{t}\text{y}\text{a}\text{a}\text{t}\text{t}\text{c}\text{t}\text{g}\text{t}\text{c}-3'$ (обратный). Первый раунд ПЦР проводили совместно с ОТ, условия реакции были следующими: 42°C — 1 час, затем 5 мин. — 94°C (денатурация и инактивация фермента обратной транскриптазы), затем 35 циклов: 94°C — 30 сек., 45°C — 30 сек., 72°C — 45 сек., финальная элонгация — 72°C — 7 мин. Условия для второго раунда ПЦР — 35 циклов: 94°C — 30 сек., 45°C — 30 сек., 72°C — 45 сек., финальная элонгация — 72°C — 7 мин. Полученные продукты ПЦР, соответствующие ВGE, определяли в 1,5% агарозном геле в ТВЕ. Величина продукта амплификации для ВGE составляла 350 пар оснований.

Выявление достоверности различий значений показателей в сравниваемых группах оценивали с использованием критерия Фишера, различия оценивались как достоверные при вероятности 95% ($p<0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Частота выявления анти-ВГА IgG среди трудовых мигрантов составила в среднем 91,7% (1222/1333), при этом мужчины были анти-ВГА позитивными достоверно чаще по сравнению с женщинами (92,6% против 87,1%, $p<0,01$). Также отмечали различия по частоте выявления анти-ВГА IgG в зависимости от страны происхождения — серопозитивные лица достоверно реже встречались среди мигрантов из Украины (70,1%) по сравнению с лицами, прибывшими из Молдовы, Узбекистана и Таджикистана (91,8; 98,7 и 99,8% соответственно).

Образцы сыворотки от 1333 мигрантов подвергли скринингу на присутствие анти-ВГЕ IgM и IgG. В среднем, 5,93% (79/1333) мигрантов были серопозитивными по анти-ВГЕ IgM, 25,36% (338/1333) были положительными по анти-ВГЕ IgG, и 3% (40/1333) имели одновременно анти-ВГЕ IgM и IgG.

Анти-ВГЕ IgG достоверно чаще выявляли среди мигрантов из Узбекистана и Таджикистана, по сравнению с мигрантами из Украины и Молдовы (25,4 и 43,1% по сравнению с 7,8 и 12,3%, соответственно, $p < 0,01$). Наличие анти-ВГЕ IgM, указывающее на текущую или недавнюю инфекцию, было установлено среди мигрантов из Узбекистана, Таджикистана, Украины и Молдовы (3,9; 7,8; 5,8 и 6,8% соответственно. РНК ВГЕ не была обнаружена ни в одном из 79 образцов сыворотки крови, содержащем IgM или IgM и IgG.

При анализе распространенности анти-ВГЕ IgG, но не IgM, была отмечена связь серопозитивности с полом, возрастом и этническим происхождением. Случаи выявления анти-ВГЕ IgM были равномерно распределены среди мужчин и женщин, в разных возрастных группах и среди мигрантов из разных стран. В то же время, анти-ВГЕ IgG значительно чаще выявляли среди мужчин по сравнению с женщинами (26,7% против 18,8%, $p < 0,01$). Было отмечено постепенное возрастание доли лиц с анти-ВГЕ IgG с увеличением возраста (от 18,8% в возрастной группе 18 — 30 лет до 37,8% среди лиц в возрасте 41 — 50 лет). Однако в самой старшей возрастной группе, среди лиц старше 50 лет, число позитивных по анти-ВГЕ IgG несколько снижалось (до 19,8%).

Проведенное сероэпидемиологическое исследование энтеральных вирусных гепатитов А и Е среди трудовых мигрантов было направлено на решение двух вопросов. Во-первых, какая доля трудовых мигрантов, прибывающих в РФ, имеет анamnестические антитела к ВГА и соответственно является защищенной от инфицирования. Во-вторых, какая доля лиц, прибывающих в РФ из регионов с разной степенью в отношении ГЕ, имеет маркеры перенесенной и текущей ВГЕ-инфекции, и соответственно какова вероятность завоза ВГЕ в РФ.

Данные, полученные по распространенности анти-ВГА среди трудовых мигрантов, показали, что более 90% лиц, прибывающих из Узбекистана, Таджикистана и Молдовы, то есть эндемичных в отношении ГА стран, имеют анamnестические антитела. Столь широкая распространенность анти-ВГА IgG, с одной стороны, свидетельствует о минимальном риске завоза ВГА трудовыми мигрантами из этих стран, поскольку большинство из них уже невосприимчиво к заражению, а с другой стороны, указывает на отсутствие целесообразности вакцинопрофилактики ГА среди мигрантов из этих стран. Среди трудовых мигрантов из Украины того же возраста распространенность анти-ВГА достоверно ниже, в результате около 30% лиц в этой когорте остаются восприимчивыми к ВГА.

ВГЕ-инфекция человека имеет две различные эпидемиологические модели [5], [Pavio N. et al., 2010]. В развивающихся странах, в том числе странах Средней Азии, ГЕ вызывается вирусом 1 генотипа, проявляется в виде крупных вспышек со значительными показателями заболеваемости и смертности, а также sporadических случаев и представляет собой серьезную проблему общественному здравоохранению. При этом, в отличие от ГА, ГЕ болеют чаще молодые взрослые и соответственно ВГЕ-инфекция 1 генотипа может импортироваться из этих стран трудовыми мигрантами. В промышленно развитых странах, с другой стороны, ГЕ не является эндемическим заболеванием, как правило, ограничен среди путешественников, возвращающихся из эндемичных регионов, а также встречается в виде sporadической заболеваемости,

чаще пищевого зоонозного происхождения, чем водного, и ассоциирован преимущественно с генотипом 3 ВГЕ, реже — с генотипом 4 [16].

Полученные в данном исследовании результаты выявления анamnестических анти-ВГЕ IgG отражают степень эндемичности по ГЕ территорий происхождения обследованных лиц — стран Средней Азии и Восточной Европы. В России частота выявления анти-ВГЕ IgG в общей популяции составляет в среднем 5 — 10% [3], что сходно с показателями, выявленными среди мигрантов из Украины и Молдовы. Сероэпидемиологические исследования продемонстрировали также довольно широкую распространенность анти-ВГЕ IgG в развитых странах, от 5% в Японии до 15 — 22% во Франции, Германии и Дании, а также в Соединенных Штатах [10, 12, 14, 17, 18]. Несмотря на одинаковый механизм передачи и широкою распространенность ВГА и ВГЕ в странах Средней Азии частота выявления анти-ВГЕ IgG была значительно ниже по сравнению с распространенностью анти-ВГА IgG среди мигрантов из Узбекистана и Таджикистана. Такое различие совпадает с данными по сероэпидемиологии этих инфекций в других эндемичных по ГЕ странах, таких как Индия и Иран [6, 7]. Данное наблюдение подтверждает представление о том, что даже в гиперэндемичных регионах встреча с этими двумя вирусами происходит в разном возрасте, с ВГА — в детстве, с ВГЕ — гораздо позднее. На это же указывает и увеличение доли позитивных анти-ВГЕ IgG лиц с возрастом в обследованных когортах мигрантов, равно как и присутствие анти-ВГЕ IgM.

Заслуживает особого интереса относительно высокая частота выявления анти-ВГЕ IgM, свидетельствующая о текущей или недавней инфекции, среди обследованных лиц. В среднем около 5% мигрантов имели анти-ВГЕ IgM, независимо от степени эндемичности страны происхождения и возраста. Полученные данные подтверждают оценочные показатели для стран Восточной Европы и бывшего СССР, превышающие 2%, и сходны с частотой выявления анти-ВГЕ IgM среди первичных доноров в РФ, составляющей 2,8 — 4,5% [3]. Все обследованные нами лица не имели клинических проявлений острого гепатита и не имели вирусемии ВГЕ по результатам тестирования в ОТ-ПЦР.

Остается открытым вопрос о подтверждении диагноза ВГЕ-инфекция при отсутствии РНК в крови обследуемых и специфичности выявления IgM у значительной доли людей, не имеющих клинических проявлений заболевания. Тем не менее, тест-система, применявшаяся для выявления анти-ВГЕ IgM, является одной из наиболее чувствительных и специфичных в мире, что было подтверждено испытаниями [11]. Отсутствие РНК ВГЕ в анти-ВГЕ IgM-позитивных образцах, возможно, связано с кратким периодом вирусемии, закончившейся до взятия образцов крови для исследования. РНК ВГЕ, как правило, обнаруживается в течение 2 — 4 недель после появления симптомов, тогда как анти-ВГЕ IgM могут сохраняться от 2 до 6 месяцев после завершения инфекции [8].

Таким образом, результаты проведенного исследования продемонстрировали, что значительное число трудовых мигрантов, прибывающих в РФ, имеет анamnестические антитела к ВГА и ВГЕ, и величина этих показателей отражает степень эндемичности страны происхождения мигрантов. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии целесообразности вакцинопрофилактики ГА среди трудовых мигрантов, прибывающих в РФ, поскольку их подавляющее большинство уже имеет иммунитет к данной инфекции. Высокая частота выявления анти-ВГЕ IgM у трудовых мигрантов, свидетельствующая о текущей или недавно перенесенной инфекции, позволяет предполагать вы-

сокую вероятность завоза в РФ ВГЕ-инфекции, что делает необходимым включение в алгоритм обследования маркеров острой ВГЕ-инфекции.

Проект осуществлен при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60414X0064.

ЛИТЕРАТУРА

1. Михайлов М.И., Малинникова Е.Ю., Кюрегян К.К., Исаева О.В. Случай завоза вируса гепатита E 4 генотипа в Россию. Журн. микробиол. 2016, 3: 64-69.
2. Мукомолов С.Л., Михайлов М.И., Семенов Т.А. и др. Бремя гепатита A в Российской Федерации. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2014, 6 (79): 24-32.
3. Потемкин И.А., Кюрегян К.К., Исаева О.В., Белякова В.В., Майорова О.А., Щибрик Е.В., Поляков А.Д., Малинникова Е.Ю., Михайлов М.И. Распространенность маркеров гепатита E среди доноров крови в регионах российской федерации. Гематол. трансфуз. 2013, 8: 26-28.
4. Эсауленко Е.В., Малинникова Е.Ю., Перадзе Х.Д., Яковлев А.А., Михайлов М.И. Спорадические и групповые завозные случаи гепатита E в Санкт-Петербурге. Журн. микробиол. 2013, 1: 38-41.
5. Aggarwal R. Hepatitis E: historical, contemporary and future perspectives. J. Gastroenterol. Hepatol. 2011, 26 (Suppl. 1): 72-82.
6. Arankalle V.A., Chadha M.S., Chitambar S.D. et al. Changing epidemiology of hepatitis A and hepatitis E in urban and rural India (1982-98). J. Viral. Hepat. 2001, 8: 293-303.
7. Asaei S., Ziyaeyan M., Moeini M. et al. Seroprevalence of hepatitis A and E virus infections among healthy population in Shiraz, Southern Iran. Jundishapur. J. Microbiol. 2015, 8: e19311.
8. Aggarwal R., Kini D., Sofat S. et al. Duration of viraemia and faecal viral excretion in acute hepatitis E. Lancet. 2000, 356:1081-1082.
9. Balayan M.S., Zamyatina N.A., Mikhailov M.I. Serological survey on hepatitis E virus infection in an endemic area: diagnosis potential of enzyme immunoassay for detection of IgG antibody. Clin. Diagn. Virol. 1994, 2 (4-5): 297-304.
10. Christensen P.B., Engle R.E., Hjort C. et al. Time trend of the prevalence of hepatitis E antibodies among farmers and blood donors: a potential zoonosis in Denmark. Clin. Infect. Dis. 2008, 47: 1026-1031.
11. Drobeniuc J., Meng J., Reuter G. et al. Serologic assays specific to immunoglobulin M antibodies against hepatitis E virus: pangenotypic evaluation of performances. Clin. Infect. Dis. 2010, 1; 51 (3): e24-27.
12. Faber M.S., Wenzel J.J., Jilg W. et al. Hepatitis E virus seroprevalence among adults, Germany. Emerg. Infect. Dis. 2012, 18: 1654-1657.
13. Jacobsen K.H., Wiersma S.T. Hepatitis A virus seroprevalence by age and world region, 1990 and 2005. Vaccine. 2010, 28: 6653-6665.
14. Mansuy J.M., Legrand-Abravanel F., Calot J.P. et al. High prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in blood donors from South West France. J. Med. Virol. 2008, 80: 289-293.
15. Pischke S., Wedemeyer H. Hepatitis E virus infection: multiple faces of an underestimated problem. J. Hepatol. 2013, 58: 1045-1046.
16. Teo C. G. The two clinico-epidemiological forms of hepatitis E. J. Viral. Hepat. 2007, 14:295-297.
17. Takahashi M., Tamura K., Hoshino Y. et al. A nationwide survey of hepatitis E virus infection in the general population of Japan. J. Med. Virol. 2010, 82: 271-281.
18. Xu C., Wang R.Y., Schechterly C.A. et al. An assessment of hepatitis E virus (HEV) in US blood donors and recipients: no detectable HEV RNA in 1939 donors tested and no evidence for HEV transmission to 362 prospectively followed recipients. Transfusion. 2013, 53: 2505-2511.

Поступила 18.12.16

Контактная информация: Потемкин Илья Александрович.
125993, Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1, стр. 1, р.т. (495)946-70-82

Е.В.Отрашевская¹, М.В.Кулак², Е.К.Букин², М.А.Горбунов³, Г.М.Игнатьев¹

ГОРИЗОНТАЛЬНАЯ ТРАНСМИССИЯ ВАКЦИННОГО ШТАММА ВИРУСА ПАРОТИТА ОТ ВАКЦИНИРОВАННЫХ ИХ БЛИЗКИМ КОНТАКТАМ

¹НПО «Микроген», Москва; ²ГНЦ ВБ «Вектор», пос. Кольцово, Новосибирской области;

³Научный центр экспертизы средств медицинского применения, Москва

Цель. С целью изучения горизонтальной трансмиссии вакцинного штамма вируса паротита (ВП) было проведено контролируемое исследование. **Материалы и методы.** В исследовании приняли участие 20 супружеских пар. В течение 42 дней после однократной вакцинации одного из супругов проводили мониторинг состояния обоих супругов, изучали в динамике уровень специфических IgM и IgG в сыворотке крови, и вируснейтрализующих IgG в сыворотке крови и слюне, также определяли РНК ВП в образцах крови и слюны. Амплифицированные фрагменты генов F, SH, NP и HN ВП были секвенированы. **Результаты.** Передача вакцинного штамма ВП была зарегистрирована во всех супружеских парах, кроме одной. За исключением одного контактного супруга, все остальные продемонстрировали формирование специфического иммунного ответа. На 4 месяце наблюдения группа вакцинированных супругов статистически достоверно отличалась от группы контактных супругов только по показателям общего содержания специфических IgG и их avidности. **Заключение.** Таким образом, в нашем исследовании продемонстрирована горизонтальная трансмиссия штамма ВП в супружеских парах после вакцинации одного из супругов, которая привела к формированию специфического иммунитета у 95% контактных лиц.

Журн. микробиол., 2017, № 3, С. 65—71

Ключевые слова: трансмиссия вакцинного штамма, паротит

Е.В.Otrashevskaya¹, М.В.Kulak², Е.К.Bukin², М.А.Gorbunov³, G.M.Ignatyev¹

HORIZONTAL TRANSMISSION OF PAROTTIS VACCINE STRAIN FROM VACCINATED TO CLOSE CONTACTS

¹SPF «Microgen», Moscow; ²SSC VB «Vector», Koltsovo, Novosibirsk Region; ³Scientific Expert Centre for Means of Medical Use, Moscow, Russia

Aim. A controlled study was carried out regarding horizontal transmission of the vaccine strain of parotitic virus (PV). **Materials and methods.** 20 couples took part in the study. Monitoring of both spouses was carried out for 42 days after a single vaccination of one of them, levels of specific IgM and IgG in sera and virus-neutralizing IgG in sera and saliva were studied in dynamics, PV RNA was also determined in sera and saliva samples. Amplified fragments of F, SH, NP and HN genes of PV were sequenced. **Results.** Transfer of PV vaccine strain was registered in all the couples except for one. Except a single contact spouse, all the rest demonstrated formation of a specific immune response. At month 4 of the observation, group of vaccinated spouses differed significantly from a group of contact spouses only by total content of specific IgG and their avidity. **Conclusion.** Horizontal transmission of PV strain was demonstrated in couples after vaccination of one of the spouses and resulted in formation of specific immunity in 95% of contact individuals.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 3, P. 65—71

Key words: vaccine strain transmission, parotitis

ВВЕДЕНИЕ

Феномен горизонтальной трансмиссии вакцинных штаммов от вакцинированных их близким контактам отмечен при применении целого ряда живых вирусных вакцин [4 — 9, 11, 12, 14 — 18]. Описано выделение вакцинного

штамма вируса паротита (ВП) от лиц, иммунизированных паротитными вакцинами со штаммами ВП Urabe AM9, Ленинград-3 (Л-3) и Ленинград-Загреб (Л-Загреб), и от их близких контактов [4, 5, 8, 12, 16 — 18].

С целью изучения горизонтальной трансмиссии вакцинного штамма ВП Л-3 было проведено контролируемое исследование, в задачи которого входило выделение РНК штамма ВП Л-3 из образцов слюны и сыворотки крови вакцинированных лиц и их контактов в динамике, а также изучение в динамике уровня специфических антител в сыворотке крови и вируснейтрализующих IgG в сыворотке крови и слюне.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие супружеские пары, не имеющие детей или имеющие детей в возрасте старше 7 лет. Критериями включения в исследование было отсутствие в анамнезе хронических заболеваний, вакцинации паротитной вакциной и перенесенного эпидемического паротита (по данным медицинских карт). Все исследования были согласованы с локальным этическим комитетом (IRB00001360). Все добровольцы дали письменное согласие на участие в исследовании, и были предупреждены о необходимости немедленного информирования о контакте с лицами, вакцинированными паротитной вакциной, а также о контакте с больными эпидемическим паротитом или с подозрением на данное заболевание. Исследование проводилось в летний период, в отсутствие массовой вакцинации детей.

В исследование были включены супружеские пары, у которых отсутствовали специфические антитела к ВП (IgM и IgG), в том числе вируснейтрализующие IgG относительно вакцинного штамма ВП Л-3. После формирования группы из 20 супружеских пар в возрасте 22 — 45 лет мужа были иммунизированы одной серией паротитной вакцины (НПО «Микроген») с титром ВП в дозе 4,82 Ig ТПЦ50/доза. Супруги вакцинированных рассматривались как контроль трансмиссии вакцинного штамма ВП. В течение 21 суток после вакцинации проводилось ежедневное медицинское обследование, включающее осмотр места вакцинации у вакцинированных лиц, а также осмотр слизистых и термометрию обоих супругов.

Образцы сыворотки крови и слюны собирались у супружеских пар в течение 15 дней после вакцинации, а далее ежемесячно в течение 4 месяцев. Образцы сывороток крови были расфасованы по 200 мкл и хранились при температуре -80°C до одномоментного проведения исследования. Для получения образцов слюны использовали пробирки OraSure (OraSure Technologies, Inc., США). Каждый образец слюны (в объеме 3 мл) центрифугировался в течение 5 минут при 3000 оборотов/минуту, надосадок был профильтрован через стерилизующий фильтр с диаметром пор 0,45 мкм, после чего фильтрат был расфасован по 200 мкл и хранился при температуре -80°C до одномоментного проведения исследования.

В сыворотке крови определяли наличие специфических IgM, титр специфических IgG и их авидность с использованием коммерческих наборов ИФА (Enzygnost, Dade Behring). Использовали установленную производителем систему оценки результата: отрицательный $\leq 1:100$, положительный $\geq 1:200$, пороговый (равнозначный) $< 1:200$ и $> 1:100$. Оценка авидности специфических IgG проводили по ранее описанной методике [4, 14]. Индекс авидности (ИА) определяли как процентное соотношение абсорбции до и после обработки мочевиной. Использовали установленную систему оценки

ИА для противопаротитных IgG: $IA \leq 31\%$ — низкий, $IA \geq 32\%$ — высокий [4, 14].

Выделение РНК из клинических образцов крови и слюны проводили с использованием QIAGEN RNeasy mini kit (Qiagen, Германия). Полученные образцы РНК были использованы в реакции ОТ-ПЦР, как описано ранее [1]. Для изучения РНК штамма ВП, выделенного от вакцинированных или контактных участников исследования, использовались праймеры для амплификации фрагментов генов F, SH, NP и HN, описанные ранее для вакцинного штамма ВП Л-3 [1]. Амплифицированные фрагменты были секвенированы с использованием CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Beckman Coulter, USA) согласно инструкции производителя. Полученные последовательности указанных фрагментов генов ВП сравнивали с эталонной последовательностью РНК вакцинного штамма ВП Л-3, депонированного в GenBank под номером AY508995.

При проведении реакции нейтрализации (РН) с сывороткой крови и слюной вакцинированных и контактных лиц использовали штамм ВП Л-3. Реакцию нейтрализации проводили по ранее описанной методике [2, 4, 5]. Отрицательный контроль (неиммунную сыворотку) использовали при проведении каждой РН. Нейтрализующие титры (НТ) были трансформированы в $-\log_2$ для статистической обработки. Титр 1:4 ($2-\log_2$) был принят как минимальный уровень серопозитивности в РН.

Средние значения титров IgG, ИА и НТ в группах вакцинированных и контактных выражали как среднее арифметическое \pm стандартное отклонение. Статистический анализ проводили с вычислением Student's t-test. Статистическую достоверность определяли как $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

После проведенной вакцинации паротитной вакциной ни у одного из привитых супругов не было отмечено температурной реакции. Катаральные явления отмечены у 5 вакцинированных лиц (25%), начиная со 2 до 6 суток включительно. Реакция в виде покраснения и слабо выраженного отека на месте введения вакцины отмечалась у 7 привитых лиц (35%) с первых до третьих суток. Симптомы со стороны нервной системы (головная боль, тошнота, ригидность затылочных мышц) не отмечались ни у одного из привитых супругов.

На третьи сутки после проведенной вакцинации в группе контактных лиц отмечено повышение температуры тела до $37,3^\circ\text{C}$ у 2 контактных супругов, которое наблюдалось до 5 суток. Катаральные явления отмечались у 5 (25%) контактных супругов, включая двоих с субфебрилитетом, с 3 по 5 сутки относительно вакцинации супругов. Неврологическая симптоматика не отмечалась ни у одного из контактных лиц.

В сыворотке крови РНК ВП не определялась ни у одного участника на всем сроке наблюдения. При этом в слюне всех привитых супругов (100%), начиная со 2 суток после вакцинации, определялась РНК ВП: у 16 привитых (80%) РНК ВП определялась до 5 суток и у 4 привитых (20%) — до 6 суток. На 7 сутки после вакцинации вирусная РНК в слюне не определялась ни у одного привитого супруга. Начиная с 4 суток после вакцинации супругов, у 19 контактных лиц (95%) в слюне определялась РНК ВП: у 16 контактных лиц (80%) РНК ВП определялась до 6 суток и у 3 (15%) контактных супругов — до 7 суток.

Анализ последовательностей фрагментов генов F, SH, NP и HN РНК ВП

из образцов слюны привитых и контактных супругов подтвердил гомологичность этих фрагментов как между собой, так и относительно последовательности аналогичных фрагментов штамма ВП Л-3, выделенного из образца серии вакцины, использованной для иммунизации, а также относительно аналогичным последовательностям вакцинного штамма ВП Л-3 (GenBank AY508995).

Появление специфических IgM у вакцинированных супругов отмечалось с 3 суток. На 7 сутки после иммунизации специфические IgM отмечались у максимального количества вакцинированных супругов, у 18 (90%). С 12 суток IgM не выявлялись ни у одного привитого супруга. Появление специфических IgM у контактных супругов отмечалось с 5 суток после вакцинации супругов. На 7 сутки специфические IgM определялись у 14 контактных супругов (70%). С 12 суток после начала исследования IgM не выявлялись ни у одного контактного супруга.

Через месяц после вакцинации у 14 привитых супругов (70%) в сыворотке крови была выявлена сероконверсия в ИФА. Через 3 месяца сероконверсия была выявлена у 100% вакцинированных супругов. У 8 контактных супругов (40%) сероконверсия была отмечена также через один месяц; и через 3 месяца сероконверсия отмечена у 19 контактных супругов (95%). Отсутствие сероконверсии наблюдалось у одного контактного супруга, у которого в слюне не была выявлена РНК ВП.

На 4 месяце наблюдения титр специфических IgG составил $462,8 \pm 29,2$ и $369,7 \pm 24,8$ соответственно у группы вакцинированных супругов и у группы контактных лиц. Разница между титрами специфических IgG у группы привитых супругов и у группы контактных супругов была статистически достоверна ($p=0,0066$). У вакцинированных и контактных лиц, начиная со 2 месяца исследования, отмечался рост ИА, который к 4 месяцу составил $26,02 \pm 0,47\%$ и $20,3 \pm 0,65\%$ соответственно у привитых и контактных супругов. На 4 месяце наблюдения выявлена достоверная разница между ИА у группы привитых супругов и группы контактных супругов ($p=0,003$).

Начиная с 1 месяца после иммунизации как у вакцинированных лиц, так и у контактных лиц отмечалось появление вируснейтрализующих специфических антител в сыворотке крови и в слюне. Максимальный уровень НТ как сыворотки крови, так и слюны в обеих группах регистрировался на 4 месяце после проведенной вакцинации одного из супругов. Соответственно у группы привитых и у группы контактных супругов НТ сыворотки крови были следующими — $3,45 \pm 0,058 - \log_2$ и $3,2 \pm 0,23 - \log_2$ ($p=0,284$), а НТ слюны соответственно — $2,8 \pm 0,058 - \log_2$ и $2,75 \pm 0,17 - \log_2$ ($p=0,787$). Не выявлено статистически достоверной разницы между НТ сыворотки крови и слюны у группы вакцинированных супругов по сравнению с аналогичными показателями группы контактных супругов ($p>0,5$). На 4 месяце после вакцинации НТ сыворотки крови у вакцинированных супругов достоверно превосходил аналогичный показатель в слюне ($p=0,0078$). А у контактных супругов достоверной разницы между этими показателями выявлено не было ($p=0,087$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Впервые Sawada H. et al. в 1993 году описали передачу вакцинного штамма ВП Urabe от вакцинированного ребенка с развившимся после вакцинации паротитом здоровой младшей сестре [16]. За последние годы появился ряд публикаций о случаях горизонтальной трансмиссии вакцинных штаммов ВП Л-3 и

Л-Загреб от вакцинированных лиц близким контактам с последующим развитием острой паротитно-вирусной инфекции, в том числе осложненной менингитом [4, 17, 18]. Также описаны случаи горизонтальной симптоматической трансмиссии вакцинного штамма ВП ранее вакцинированным лицам [4, 5].

Возможность репликации и экскреции вирусных штаммов живых вакцин реципиентами была показана ранее [4, 5, 9, 11, 12]. Признано, что иммунизация аттенуированными вакцинами против кори и паротита сопровождается развитием субклинической формы инфекции у вакцинированных лиц [10].

Данное исследование является первым контролируемым исследованием горизонтальной трансмиссии вакцинного штамма ВП Л-3 от реципиента близкому неиммунному контакту.

В нашем исследовании наблюдалась реакция на иммунизацию паротитной вакциной, содержащей штамм ВП Л-3, у привитых супругов, которые не превосходили по выраженности и длительности таковые, описанные в инструкции по применению данной вакцины. В целом, можно сделать заключение, что иммунизация сопровождалась субклинической формой инфекции с катаральными явлениями у 5 (25%) привитых супругов. При этом у 5 (25%) контактных супругов также наблюдались признаки субклинической инфекции, в том числе с субфебрилитетом у 2 контактных супругов. Полного соответствия развития субклинической формы поствакцинальной инфекции в супружеских парах не наблюдалось. Только в 3 супружеских парах отмечалась субклиническая форма инфекции как у привитых, так и у контактных супругов (15% относительно всех супружеских пар).

РНК ВП была определена в слюне всех вакцинированных супругов и 19 (95%) контактных супругов. Только у одной супружеской пары, по сути, не наблюдалась трансмиссия вакцинного штамма ВП. У вакцинированных супругов РНК ВП в слюне определялась со 2 по 5 — 6 сутки после вакцинации, в среднем 4 — 5 суток. А у контактных лиц РНК ВП в слюне определялась с 4 по 6 — 7 сутки после вакцинации супругов, в среднем 3 — 4 суток. Таким образом, через 2 суток после вакцинации супругов РНК ВП уже определялась в слюне контактных супругов. В сыворотке крови вакцинированных и контактных супругов РНК ВП обнаружена не была.

Можно предположить, что аттенуированный вакцинный штамм ВП может претерпевать некоторые структурные изменения при пассажах через реципиента и близкий контакт. В нашем исследовании не выявлено замен ни в одном из исследованных локусов РНК ВП, выделенной из слюны вакцинированных и контактных супругов, по сравнению с референс-штаммом ВП Л-3 (GenBank AY508995). Таким образом, показана полная гомология между изученными нуклеотидными последовательностями локусов РНК ВП, выделенного из образцов слюны участников исследования, штаммом ВП Л-3 из серии вакцины, использованной для иммунизации. Несмотря на то, что фрагменты генов F, SH, NP и HN генома ВП, проанализированные в данном исследовании, были выбраны как наиболее вариабельные области среди всех генотипов ВП, суммарно они покрывают 32% генома вируса. Поэтому полностью исключить отсутствие структурных замен в геноме ВП Л-3 нельзя. До сих пор только для ВП Urabe AM9 была обнаружена разница в структуре гена HN между вакцинным штаммом и штаммом, выделенным от лиц с вакцин-ассоциированным менингитом [3].

Специфические IgM регистрировались в сыворотке крови у 90% привитых супругов с 3 по 12 сутки после вакцинации и у 70% контактных супругов со-

ответственно с 5 по 12 сутки. Сероконверсия отмечена у 100% вакцинированных и у 95% контактных супругов. Таким образом, специфические антитела в сыворотке крови, также, как и РНК ВП в слюне, не были выявлены лишь у одного контактного супруга.

ИА у всех участников исследования на 4 месяце наблюдения находился ниже 31%, т.е. был низким, что свидетельствует о первичном иммунном ответе на вакцинацию и соответственно на контакт с вакцинным штаммом ВП Л-3 [13]. Ранее нами было показано, что специфические антитела при первичном иммунном ответе достигают зрелости (ИА >32%) не ранее 6 месяца после иммунизации [2]. Поэтому можно предположить, что к 6 месяцу ИА достигнет уровня зрелости, прежде всего, у привитых супругов.

Формирование специфических нейтрализующих антител отмечено у всех привитых супругов и у 95% контактных супругов. Уровень нейтрализующих антител был выше в сыворотке крови, чем в слюне.

При сравнении иммунологических показателей между привитыми и контактными супругами статистически достоверная разница была обнаружена только в общем содержании специфических IgG и их avidности.

Таким образом, в нашем контролируемом исследовании продемонстрирована горизонтальная трансмиссия штамма ВП Л-3 в супружеских парах после вакцинации одного из супругов. Факт трансмиссии вакцинного штамма ВП Л-3 был подтвержден серологическими и молекулярно-биологическими методами. За исключением одного контактного лица, все контактные супруги продемонстрировали иммунный ответ с формированием вируснейтрализующих антител. У части контактных супругов трансмиссия вакцинного штамма ВП сопровождалась развитием субклинической формы инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Неверов А.А., Игнатъев Г.М., Юнасова Т.Н., Попов В.Ф., Бектемиров Т.А., Чумаков К.М. Изучение генетической стабильности и гомогенности вакцинного штамма Ленинград-3 вируса паротита. Биопрепараты. 2005, 4: 21-27.
2. Отрашевская Е.В., Букин Е.К., Красильников И.В., Игнатъев Г.М. Состояние специфического гуморального иммунитета после однократной иммунизации паротитной вакциной: данные 3-летнего наблюдения. Вопросы вирусологии. 2011, 3: 45-48.
3. Amexis G., Fineschi N., Chumakov K. Correlation of genetic variability with safety of mumps vaccine Urabe AM9 strain. *Virology*. 2001, 287 (1): 234-241.
4. Atrasheuskaya A., Kulak M., Fisenko E.G. et al. Horizontal transmission of the Leningrad-Zagreb mumps vaccine strain: a report of six symptomatic cases of parotitis and one case of meningitis. *Vaccine*. 2012, 30 (36): 5324-5326.
5. Atrasheuskaya A.V., Neverov A.A., Rubin S., Ignatyev G.M. Horizontal transmission of the Leningrad-3 live attenuated mumps vaccine virus. *Vaccine*. 2006, 24: 1530-1536.
6. Brunell Ph-A., Argaw T. Chickenpox attributable to a vaccine virus contracted from a vaccinee with zoster. *Pediatrics*. 2000, 106: 28.
7. Huang X., Cao Y., Tan S. Horizontal transmission of live attenuated hepatitis A vaccine virus. *Zhonghua Yi Xue Zhi*. 2001, 8: 465-467.
8. Kaic B., Gjenero-Margan I., Aleraj B. et al. Transmission of the L-Zagreb mumps vaccine virus, Croatia 2005-2008. *Euro Surveillance*. 2008, 13: 496.
9. Kaic B., Gjenero-Margan I., Aleraj B. et al. Spotlight on measles 2010: excretion of vaccine strain measles virus in urine and pharyngeal secretions of a child with vaccine associated febrile rash illness, Croatia, 2010. *Euro Surveill*. 2010, 15 (35): 1-2.
10. Measles, mumps, and rubella vaccine use and strategies for elimination of measles, rubella, and congenital rubella syndrome and control of mumps: Recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP). *MMWR. CDC*. 1998, 47: RR-8.

11. Morfin F., Beguin A., Lina B., Thouvenot D. Detection of measles vaccine in the throat of a vaccinated child. *Vaccine*. 2002, 20 (11-12): 1541-1543.
12. Nagai T., Nakayama T. Mumps vaccine virus genome is present in throat swabs obtained from uncomplicated healthy recipients. *Vaccine*. 2001, 19: 1353-1355.
13. Narita M., Matsuzono Y., Takekoshi Y. et al. Analysis of mumps vaccine failure by means of avidity testing for mumps virus-specific immunoglobulin G. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1998, 5: 799-803.
14. Said M.A., Haile C., Palabindala V. et al. Transmission of vaccinia virus, possibly through sexual contact, to a woman at high risk for adverse complications. *Mil. Med.* 2013, Dec; 178 (12): e1375-1378. doi: 10.7205/MILMED-D-13-00233.
15. Salzman M. B., Sharrar R. G., Steinberg S., LaRussa P. Transmission of varicella-vaccine virus from a healthy 12-month-old child to his pregnant mother. *J. Pediatr.* 1997, 131: 151-154.
16. Sawada H., Yano S., Oka Y., Togashi T. Transmission of Urabe mumps vaccine between siblings. *Lancet*. 1993, 342 (8867): 371.
17. Tesovic G., Poljak M., Kocjan B.J. et al. Horizontal transmission of the Leningrad-Zagreb mumps vaccine strain: a report of three cases. *Vaccine*. 2008, 26 (16): 1922-1925.
18. Vukić B.T., Pavić I., Milotić I., Slavuljica I. Aseptic meningitis after transmission of the Leningrad-Zagreb mumps vaccine from vaccinee to susceptible contact. *Vaccine*. 2008, 26 (38): 4879.

Поступила 25.11.16

Контактная информация: Отрашевская Елена Викторовна,
127473, Москва, 2 Волконский пер., 10

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

Ф.С.Флуер¹, А.В.Кудрявцева², С.И.Титарев¹, И.Б.Быкова³

СРЕДСТВО ДЛЯ ИНГИБИРОВАНИЯ ПРОДУКЦИИ СТАФИЛОКОККОВЫХ ЭНТЕРОТОКСИНОВ И УДАЛЕНИЯ ИХ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ

¹Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи, ²Первый московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова, ³ Федеральное исследовательское учреждение питания и биотехнологии, Москва

Цель. Расширение арсенала средств, способных ингибировать продукцию стафилококковых энтеротоксинов (СЭ) и обладающих способностью удалять их из биологических субстратов, а также снижающих рост стафилококков. *Материалы и методы.* В качестве продуцента СЭ типа А (СЭА) использовали референс-штамм *Staphylococcus aureus* FRI 722, в качестве продуцента СЭ типа В (СЭВ) — *S. aureus* S6 715H. Использовали полиметилсилоксана полигидрат (ПМС ПГ) в концентрациях 1,82; 9,09 и 18,2%. *Результаты.* С помощью метода двойной диффузии в геле и ИФА мы установили, что 18,2% раствор ПМС ПГ (энтеросгель; при содержании полиметилсилоксана полигидрата — 70 г, воды очищенной — 30 г на 100 г продукта) является оптимальной концентрацией, приводящей к ингибированию продукции стафилококкового энтеротоксина типа А в 100 и более раз, а продукции стафилококкового энтеротоксина типа В — более чем в 300 раз. *Заключение.* Полиметилсилоксана полигидрат обладает способностью удалять стафилококковые энтеротоксины типов А и В из биологических субстратов более чем на 50% и существенно уменьшать рост стафилококков.

Журн. микробиол., 2017, № 3, С. 71—77

Ключевые слова: стафилококки, стафилококковые энтеротоксины, полиметилсилоксана полигидрат, ингибирование, адсорбент

MEANS FOR INHIBITION OF PRODUCTION OF STAPHYLOCOCCUS ENTEROTOXINS AND THEIR ELIMINATION FROM BIOLOGICAL SUBSTRATES

¹Gamaleya Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology, ²Sechenov First Moscow State Medical University, ³Federal Research Centre of Nutrition and Biotechnology, Moscow, Russia

Aim. Expansion of arsenal of means capable of inhibiting production of staphylococci enterotoxins (SE) and having an ability to eliminate them from biological substrates, as well as reducing the growth of staphylococci. **Materials and methods.** Reference strain of *Staphylococcus aureus* FRI 722 was used as SE producer type A (SEA), *S. aureus* S6 715H — as SE type B producer (SEB). Polymethylsiloxane polyhydrate (PMSPH) was used at concentrations of 1.82, 9.09 and 18.2%. **Results.** By using gel double diffusion method and ELISA we have established that a 18.2% solution of PMSPH (enterosgel; PMSPH — 70 g, purified water — 30 g per 100 g of the product) is an optimal concentration for inhibition of production of staphylococcus enterotoxin type A by 100 and more times, and production of staphylococci enterotoxin type B — by more than 300 times. **Conclusion.** PMSPH is able to eliminate staphylococci enterotoxins type A and B from biological substrates for more than 50% and significantly reduce growth of staphylococci.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 3, P. 71—77

Key words: staphylococci, staphylococci enterotoxins, polymethylsiloxane polyhydrate, inhibition, adsorbent

ВВЕДЕНИЕ

Стафилококки продуцируют 23 иммунологически различных типов энтеротоксинов, имеющих большое значение как факторы патогенности более 100 различных заболеваний, вызываемых стафилококками [9, 17]. Энтеротоксины стафилококков (СЭ) обладают полифункциональными свойствами: рвотным действием, пирогенностью, способностью увеличивать токсичность эндотоксинов (липополисахаридов, продуктов грамотрицательных бактерий) в 100 000 раз [13, 14, 16].

Все СЭ являются суперантигенами и в концентрации от 1 пкг/мл до 1 мкг/мл могут вызывать активацию до 50% Т-лимфоцитов и выработку ряда интерлейкинов, которые вызывают интоксикацию и необратимое нарушение нормального функционирования разных систем организма вплоть до летального исхода [12]. СЭ в концентрации 100 нг могут вызывать пищевые отравления. Борьба с СЭ затруднена из-за невозможности создания анатоксинов и проведения вакцинопрофилактики. В связи с этим, основное внимание при борьбе с СЭ уделяется вопросам профилактики попадания энтеротоксигенных штаммов стафилококков и их энтеротоксинов в среду организма человека.

СЭ являются белками с молекулярной массой 25 000 — 30 000 дальтон, обладающими способностью выступать в качестве аллергенов и индуцировать продукцию специфических IgE. Такими свойствами обладают СЭ типов А (СЭА), В (СЭВ) и С (СЭС), эксфолиативный токсин и токсин синдрома токсического шока (ТСТШ-1) [12]. Доказано, что СЭ способны также приводить к выбросу макрофагами и клетками Лангенгарса IL-1, IL-12 и TNF α , являющихся провоспалительными цитокинами, которые способны поддерживать местное аллергическое воспаление при атопическом дерматите [15]. Из данных литературы известно об участии токсинов синдрома ТСТШ-1 и СЭВ в развитии тяжелым форм атопического дерматита [8, 13].

Одним из важных аспектов борьбы с энтеротоксигенными штаммами стафилококков является поиск благоприятных физиологичных способов удаления стафилококков и подавления продукции ими СЭ.

Известно средство для подавления продукции энтеротоксинов у стафилококков — применение 2,0% раствора свекловичного пектина [11], однако данное средство не обладает способностью удалять СЭ из биологических субстратов.

Кроме того, установлено, что в качестве детоксикационного средства применяется полиметилсилоксана полигидрат (полиметилсилоксана ПГ), представляющий собой продукт нелинейной поликонденсации 1,1,3,3-тетрагидрокси-1,3-диметилдисилоксана полигидрата в форме пасты для приема внутрь (Энтеросгель. Патент №2293744. Рег. № PN003719/02. Свидетельства на товарные знаки №219832 №269595).

Указанный препарат применяется в качестве детоксикационного средства у взрослых и детей при таких заболеваниях, как острые и хронические интоксикации различного происхождения; отравления сильнодействующими и ядовитыми веществами, в т.ч. лекарственными препаратами, алкоголем, алкалоидами, солями тяжелых металлов, и другие острые кишечные инфекции любого генеза в составе комплексной терапии (токсикоинфекции, сальмонеллез, дизентерия, диарейный синдром неинфекционного происхождения, дисбактериоз); гнойно-септические заболевания, сопровождающиеся выраженной интоксикацией, в составе комплексной терапии; пищевая и лекарственная аллергия; желтуха (в т.ч. после вирусного гепатита), гипербилирубинемия; хроническая почечная недостаточность (гиперазотемия); профилактика хронических интоксикаций у работников вредных производств.

Полиметилсилоксана ПГ обладает способностью сорбировать вещества с определенной молекулярной массой, но не способен вызывать дисбиотические нарушения в микрофлоре кишечника, не связывается и не повреждает слизистую оболочку кишечника.

Известно, что полиметилсилоксана ПГ широко используется в медицинской практике для профилактики и лечения различных заболеваний, вызванных микроорганизмами. Сведений о влиянии полиметилсилоксана ПГ на продукцию СЭ не обнаружено.

Целью исследования является расширение арсенала средств, способных ингибировать продукцию стафилококковых энтеротоксинов и обладающих способностью удалять их из биологических субстратов, а также снижающих рост стафилококков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве продуцента СЭА использовали референс-штамм *Staphylococcus aureus* FRI 722; в качестве продуцента СЭВ использовали референс-штамм *S. aureus* S6 715Н. Для изучения способности подавления энтеротоксинообразования у стафилококков нами исследовано влияние полиметилсилоксана ПГ на продукцию СЭ. Способность подавлять продукцию СЭ исследовали с помощью модельной микробиологической системы, состоящей из штаммов стафилококков, обладающих способностью продуцировать СЭ, питательной среды для культивирования стафилококков и полиметилсилоксана ПГ.

В работе использовали полиметилсилоксана ПГ различных концентраций. Концентрацию выражали, исходя из стандартного содержания: на 100 г продукта — 70 г сухого препарата полиметилсилоксана ПГ и 30 г воды очищенной. В исследовании мы использовали различные концентрации полиметилсилоксана

сана ПГ для того, чтобы выявить среди них оптимальную концентрацию этого вещества, обладающую максимально выраженной способностью подавлять рост стафилококков, продукцию СЭ и выведения СЭ из культуральной жидкости — 1,82; 9,09 и 18,2%.

Культивирование стафилококков, продуцирующих СЭ, проводили на специальной жидкой питательной среде с ферментативной казеиновой основой [Флуер Ф.С., 2007].

Содержание аминного азота в среде — 200 мг/%. В среду добавляли 1,0% сердечно-мозговую вытяжку (Difco, США).

Устанавливали pH среды 7,2. Затем среду разливали по 4,5 мл и стерилизовали 15 мин при 1 атм., 120°C, после чего в пробирки с питательной средой вносили по 0,5 мл суточной культуры стафилококков, содержащей 10⁷ КОЕ/мл, и асептически вносили полиметилсилоксан ПГ в конечных концентрациях в среде от 10,0% до 20,0%. Выращивание проводили на шуттель-аппарате при непрерывном встряхивании 210 об/мин в течение 24 часов при 37°C. Сразу после посева из каждой пробирки проводили количественные высевы на чашки Петри с плотной питательной средой Baird–Parker с теллуридом калия [5]. Плотность микробных клеток контроля и опытных образцов определяли на спектрофотометре при длине волны E₅₆₀ нм.

После окончания культивирования через 24 часа высев повторяли. Затем микробные клетки удаляли центрифугированием при 10 000 об/мин в течение 15 минут. Контролем служили те же штаммы стафилококков, культивируемые в тех же условиях, что и опытные образцы, но без добавления полиметилсилоксана ПГ.

СЭ в опытных и контрольных образцах определяли методом двойной диффузии в геле [4] с использованием моноспецифических антиэнтеротоксических сывороток типа А и В [3, 10] и иммуноферментным методом с использованием иммуноферментных тест-систем для определения стафилококковых энтеротоксинов типов А и В [1, 2].

В частности, нами был проведен сравнительный анализ определения дифференцированного регуляторного воздействия полиметилсилоксана ПГ на способность подавления продукции СЭА и СЭВ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Культуру *S. aureus* FRI 722 (референс, продуцирующий СЭА), *S. aureus* S6 715H (продуцент СЭВ) и клинический изолят *S. aureus* выращивали в питательной среде, содержащей полиметилсилоксана ПГ в концентрации 1,82; 9,09 и 18,2% (табл. 1). После культивирования на чашках Петри выявляли рост стафилококков при различных разведениях препарата. Особый интерес представляло сравнение возможностей ингибирования продукции СЭ, а также способностей выведения СЭ у полиметилсилоксана ПГ. Результаты представлены в табл. 1 и 2.

Таблица 1. Влияние различных концентраций ПМС ПГ на рост *S.aureus* FRI 722 и *S.aureus* S6 715H и удаление СЭА и СЭВ из культуральной среды

Исследуемые образцы	Реакция пресципитации в геле	ОП при E ₅₆₀ нм, разведение 1:30
<i>S.aureus</i> FRI 722 (контроль) Контрольный фильтрат культуры	+	0,3
<i>S.aureus</i> FRI 722 + 1,82% ПМС ПГ Культуральный фильтрат	+	0,3
<i>S.aureus</i> FRI 722 + 9,09% ПМС ПГ	—	0,21
<i>S.aureus</i> FRI 722 + 18,2% ПМС ПГ	—	0,19
<i>S.aureus</i> S6 715H (контроль)	+	0,45
<i>S.aureus</i> S6 715H + 1,82% ПМС ПГ	+	0,41
<i>S.aureus</i> S6 715H + 9,09% ПМС ПГ	+	0,4
<i>S.aureus</i> S6 715H + 18,2% ПМС ПГ	—	0,18

Таблица 2. Использование ИФА для исследования влияния различных концентраций ПМС ПГ на рост *S.aureus* FRI-722 на продукцию СЭА, *S.aureus* 715Н на продукцию СЭВ и удаление СЭА и СЭВ из культуральной среды

Среда культивирования, штамм-продуцент и концентрация ПМС ПГ	Оптическая плотность при E_{660} нм (1/30)	Средний положительный титр токсина в реакции ИФА
Контроль <i>S.aureus</i> FRI 722	0,3	СЭА — 1:200
Контроль <i>S.aureus</i> клинический штамм 30	0,3	СЭА — 1:100
9,09% ПМС ПГ + <i>S.aureus</i> FRI 722	0,21	СЭА — Без разведения — 1:10
9,09% ПМС ПГ + <i>S.aureus</i> клин. штамм 30	0,22	СЭА — Без разведения — 1:10
18,2% ПМС ПГ + <i>S.aureus</i> FRI 722	0,19	СЭА — Без разведения +
18,2% ПМС ПГ + <i>S.aureus</i> клин. штамм 30	0,18	СЭА — Без разведения +
Контроль <i>S. aureus</i> S6 715H(Без ПМС ПГ)	0,45	СЭВ — 1:6400
1,82% ПМС ПГ + <i>S. aureus</i> S6 715H	0,41	СЭВ — 1:6400
9,09% ПМС ПГ + <i>S.aureus</i> S6 715H	0,4	СЭВ — 1:3200
18,2% ПМС ПГ + <i>S.aureus</i> S6 715H	0,18	СЭВ — 1:10

Как видно из табл. 1, использование 1,82% полиметилсилоксана ПГ не обладает способностью подавлять рост стафилококков. При добавлении в питательную среду полиметилсилоксана ПГ происходило уменьшение количества микробных клеток, а СЭ в препарате не был обнаружен. При применении 18,2% полиметилсилоксана ПГ также наблюдалось уменьшение роста стафилококков и отсутствие СЭ в культуральной жидкости.

Нами также проводились исследования по ингибированию СЭ при использовании полиметилсилоксана ПГ различной концентрации методом ИФА (табл. 2).

Установлено, что в питательной среде с добавлением 9,09% полиметилсилоксана ПГ при выращивании *S. aureus* происходило частичное подавление роста стафилококков и значительное подавление продукции СЭ. При использовании 18,2% концентрации полиметилсилоксана ПГ в питательной среде как в случае референс-штамма, так и в случае клинического штамма происходило ингибирование продукции СЭА и СЭВ и сорбция СЭА и СЭВ на полиметилсилоксана ПГ; в результате концентрация СЭА в культуральном фильтрате снижалась в 200 раз, а концентрация СЭВ в культуральном фильтрате снижалась в 640 раз (табл. 2).

Нами была предпринята попытка элюировать энтеротоксин из полиметилсилоксана ПГ с помощью 0,1 М глицин-НСl-буфера (рН 3,0), который часто используется в аффинной хроматографии для выделения антител, однако добиться элюции энтеротоксина таким образом нам не удалось.

При исследовании возможности 18,2% концентрации полиметилсилоксана ПГ сорбировать и выводить СЭА и СЭВ из культуральной жидкости установлено, что полиметилсилоксан ПГ при концентрации в

Таблица 3. Исследование сорбции СЭ типа А и В из культуральных супернатантов с помощью ПМС ПГ

Исследуемые образцы	Энтеротоксигенная активность в ИФА в разведениях
Культуральный супернатант <i>S.aureus</i> FRI 722	1:200—1:400
Культуральный супернатант <i>S.aureus</i> FRI 722 + 18,2% ПМС ПГ (20 часов при $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$)	1:100—1:200
Культуральный супернатант <i>S.aureus</i> S6 715H	1:6400
Культуральный супернатант <i>S.aureus</i> S6 715H + 18,2 % ПМС ПГ (20 часов при $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$)	1:3200

среде 18,2% обладает способностью выводить из культуральной жидкости до 50,0% СЭА и СЭВ. Результаты представлены в табл. 3.

Показано, что 18,2 % концентрация полиметилсилоксана ПГ подавляет продукцию энтеротоксина типа В у штамма *S. aureus* S6 715H в 320 — 640 раз. Этот штамм при выращивании в питательной среде без добавления полиметилсилоксана ПГ образует энтеротоксин типа В, который выявляется иммуноферментным методом в разведении 1:3200 — 1:6400. В то же время, этот же штамм, выращиваемый в присутствии полиметилсилоксана ПГ, частично (по сравнению с контролем) продуцировал энтеротоксин, который выявляли иммуноферментным методом всего лишь в разведении 1:10.

Большой интерес отводится препаратам, которые обладают способностью ингибировать рост патогенной микрофлоры, продукцию энтеротоксинов и выведению их из биологических субстратов. Известно, что для ингибирования роста стафилококков и продукции СЭ можно использовать свекловичный пектин [11]. Однако свекловичный пектин не обладает способностью выводить СЭ из биотопов. Из литературы известно, что многие сорбенты (в том числе полиметилсилоксана ПГ), обладают широким спектром противобактериального действия. Их используют в медицине при различных заболеваниях [6, 7].

Полученные результаты показали, что полиметилсилоксан ПГ в концентрации 18,2% способен ингибировать продукцию СЭА более чем в 100 раз, продукцию СЭВ — более чем в 300 раз. Кроме того, этот препарат, снижая рост стафилококков, выводит из биологических субстратов более 50,0% СЭА и СЭВ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Акатов А.К., Флуер Ф.С., Михеева Г.В, Павлова И.П., Шаханина К.Л, Бобкова Е. В., Мельников Н.В. Тест-система иммуноферментная для определения стафилококкового энтеротоксина типа А. ВФС 42-235, ВС 89, 1989.
2. Акатов А.К., Флуер Ф.С., Михеева Г.В, Шаханина К.Л. Тест-система иммуноферментная для определения стафилококкового энтеротоксина типа В. ВФС 42-236, ВС 89, 1989.
3. Езепчук Ю.В., Флуер Ф.С., Бугрова В.И., Бобкова Е.В., Мельников Н.В., Новиков В.И. Сыворотка диагностическая к стафилококковому энтеротоксину типа А, сухая для РП в геле. ВФС 42-162, ВС 88, 1988.
4. Зильбер А. Реакция двойной диффузии в геле. Иммунохимический анализ. М., Медицина, 1968.
5. Мейнелл Дж., Мейнелл Э. Экспериментальная микробиология. Пер. с англ. Мир, 1967.
6. Николаева Л.Г. Микробиологические аспекты применения энтеросорбентов при острых кишечных инфекциях. Врачебное дело. 1993, 8: 81-82.
7. Осадчая О.И. Оптимизация оценки клинической эффективности применения детоксикационной терапии у больных с алкогольным поражением печени. Актуальные проблемы транспортной медицины. 2011, 2 (24): 131-135.
8. Флуер Ф.С., Кудрявцева А.В., Прохоров В.Я., Котосова Л.К., Лазарева А.В., Вертиева Е.Ю. Влияние энтеротоксинов *Staphylococcus aureus* и *epidermidis* на течение атопического дерматита у детей. Педиатрия. Журнал им. Г.Н.Сперанского. 2009, 87 (2): 43-48.
9. Флуер Ф.С. Стафилококковые энтеротоксины, их свойства и роль как факторов патогенности. Журн. микробиол. 2012, 2: 99.
10. Флуер Ф.С., Бугрова В.И. Получение стафилококковой антиэнтеротоксической сы-

- воротки типа В для серотипирования стафилококков. Вопросы питания. 1977, 1: 61-63.
11. Флуер Ф.С., Меньшиков Д.Д., Лазарева Е.Б., Прохоров В.Я. Влияние различных пектинов на продукцию стафилококковых энтеротоксинов типов А и В. Журн. микробиол. 2007, 6:11-16.
 12. Anderson A.L., Sporici R., Lambris J. et al. Pathogenesis of B-cell superantigen — induced immune complex-mediated inflammation. Infect. Immun. 2006; 74 (2): 1196-1203.
 13. Argudin M.A., Mendoza M.C., Rodicio M.R. Food poisoning and Staphylococcus aureus enterotoxins. Toxins. 2010, 2: 1751-1773.
 14. Bohach G.A., Fast D.J., Nelson R.D., Schlievert P.M. Staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxins involved in toxic shock syndrome and related illnesses Crit. Rev. Microbiol. 1990, 17: 251-272.
 15. Breuer K., Wittmann M., Bösche B. et al. Severe atopic dermatitis is associated with sensitization to staphylococcal enterotoxin B (SEB). Allergy. 2000, 55: 551-555.
 16. Kapsenberg M.L., Hilkens C.M.U., Jansen H.M. et al. Production and modulation of T-cell cytokines in atopic allergy. Inter.Archiv. All. Immun. 1996, 110 (2): 107-113.
 17. Marrack P., Kappler J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. Science. 1990, 248: 705-711.

Поступила 07.10.16

Контактная информация: Флуер Ф.С.,
123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

Е.Г.Симонова^{1,2}, С.Р.Раичич¹, С.А.Картавая¹, Н.Н.Филатов^{2,3}

НАДЗОР ЗА БЕШЕНСТВОМ В СОВРЕМЕННЫХ УСЛОВИЯХ

¹Центральный НИИ эпидемиологии, Москва; ²Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова; ³НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, Москва

Цель. Оценка действующей в Российской Федерации системы эпизоотолого-эпидемиологического надзора, которая демонстрировала свою высокую эффективность в конце прошлого века, а также определение направлений ее совершенствования в современных условиях. *Материалы и методы.* Данные официальной статистики, результаты эпидемиологической диагностики, данные зарубежных исследований. Для оценки ситуации по бешенству в Российской Федерации в 2000 — 2015 гг. применялись описательно-оценочные эпидемиологические методы, а также материалы проведенных ранее собственных исследований по изучению информированности населения. *Результаты.* Выявлен характер современной эпизоотолого-эпидемиологической ситуации по бешенству в Российской Федерации. Показано, что, несмотря на снижение числа регистрируемых случаев бешенства среди населения, риск инфицирования сохраняется. В связи с интенсивной миграцией населения, низкой его информированностью, широкомасштабной постэкспозиционной профилактикой меняются клиничко-эпидемиологические особенности бешенства, снижающие эффективность надзора. *Заключение.* Действующая система эпидемиологического надзора за бешенством нуждается в совершенствовании путем изменения организационной структуры, а также оптимизации ее диагностического компонента.

Журн. микробиол., 2017, № 3, С. 77—83

Ключевые слова: бешенство, пре- и постэкспозиционная профилактика, эпидемиологический надзор, диагностика бешенства, факторы риска

RABIES SURVEILLANCE IN CURRENT CONDITIONS

¹Central Research Institute of Epidemiology, Moscow; ²Sechenov First Moscow State Medical University; ³Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Aim. The aim of this study was to assess the current epizootic and epidemiological surveillance system in Russian Federation, which has demonstrated high effectiveness at the end of the last century, as well as determining the directions of its development in current conditions. *Materials and methods.* The following study materials were used: the official statistics, the results of epidemiological diagnosis and foreign research data. To assess the situation of rabies in the Russian Federation in 2000 — 2015 we used descriptive and evaluative epidemiological methods and data from our previously conducted research on the public awareness. *Results.* The nature of the modern epizootic and epidemiological situation of rabies in the Russian Federation has been revealed. It is shown that, despite the decrease in the number of reported cases of rabies in the population, infection risks remain high. In connection with the intensive migration of the population, low awareness and large-scale post-exposure prophylaxis, the clinical and epidemiological features of rabies are changing, reducing the effectiveness of supervision. *Conclusion.* The current system of epidemiological surveillance for rabies has to be improved by changing the organizational structure and optimize its diagnostic component.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No 3, P.

Key words: rabies, pre- and post-exposure prophylaxis, epidemiological surveillance, rabies diagnostics, risk factors

ВВЕДЕНИЕ

26 октября 2015 года исполнилось 130 лет со дня, когда Луи Пастер сообщил медицинскому сообществу о победе над бешенством. Создание первой в мире вакцины, которая была антирабической, дало человечеству надежду на спасение от этой древнейшей и единственной абсолютно летальной инфекции.

Несмотря на снижение заболеваемости людей, которое благодаря внедрению специфической профилактики особенно заметно в настоящее время в экономически развитых странах, бешенство по сей день остается актуальной проблемой. Так, в США и Канаде ежегодно регистрируется порядка 5 случаев бешенства, в Европе 1 — 3 случая [14]. В России средне-многолетний уровень заболеваемости населения составляет 12 случаев, а экономический ущерб от укусов, наносимых животными — потенциальными источниками возбудителя, достигает более 3,5 млрд рублей в год [2 — 4].

Накопленные в последние годы данные свидетельствуют об изменении эпизоотологических и эпидемиологических проявлений бешенства, которые должны своевременно улавливаться системой надзора, распознаваться еще на уровне изучения риска и учитываться при разработке профилактических мероприятий.

Цель настоящего исследования заключалась в оценке действующей в Российской Федерации системы эпизоотолого-эпидемиологического надзора, которая продемонстрировала свою высокую эффективность в конце прошлого века [5], а также в определении направлений ее совершенствования в современных условиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования явилась система надзора, а точнее, ее эпидемиолого-диагностические возможности, позволяющие вскрыть причины и условия формирования ситуации по бешенству, характерной для изучаемого периода. Оценены способности системы распознавать особенности распределения заболеваемости по территориям, группам, контингентам и времени риска, а также улавливать меняющиеся факторы риска на фоне таких глобальных процессов, как дальнейшая урбанизация территорий, рост миграционной активности и др.

Материалами исследования послужили данные эпизоотолого-эпидемиологического надзора за бешенством в Российской Федерации в период с 2000 по 2015 гг. С использованием описательно-оценочных эпидемиологических методов изучены уровень, структура и динамика заболеваемости людей, выявления случаев бешенства среди животных, а также существующие на территории Российской Федерации риски.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка эпизоотолого-эпидемиологической ситуации по бешенству в Российской Федерации в целом показала, что в динамике отмечается снижение заболеваемости населения. Число случаев бешенства, выявляемого среди животных, напротив, растет (табл.).

При существующих подходах к диагностике бешенства это свидетельствует об эпизоотическом неблагополучии, а следовательно, о сохраняющемся риске заражения населения. Следует учитывать, что максимально полно диагностика осуществляется только среди сельскохозяйственных животных, которые считаются индикатором бешенства и занимают в структуре заболеваемости животных третью позицию. Второе место практически на всех территориях страны по частоте выявления занимает бешенство собак и кошек, а первое — принадлежит бешенству диких животных.

При практически неизменном уровне проводимых ветеринарной службой лабораторных исследований выявляемость бешенства среди диких животных достоверно растет. Особым эпизоотологическим неблагополучием характеризуются регионы Центральной России и Поволжья. Именно здесь с 2014 года наблюдается максимальная интенсивность эпизоотий среди диких плотоядных животных, а основным резервуаром рабической инфекции является лисица [6]. За всю историю наблюдений в плотном кольце эпизоотий впервые оказалась Москва. И это не случайно, т.к. Центральная Россия и, прежде

Бешенство в России

Годы	Заболеваемость животных	Заболеваемость людей
2000	1406	8
2001	2440	22
2002	3951	17
2003	4293	15
2004	3268	17
2005	5253	16
2006	2264	4
2007	5503	8
2008	4637	17
2009	4442	12
2010	4437	16
2011	3188	13
2012	2802	4
2013	3507	6
2014	2315	3
2015	3371	6

всего Московский регион, являются наиболее урбанизированными территориями, на которых создаются особые условия для циркуляции возбудителя среди животных. Фактически, дикие животные находятся под воздействием жесточайшего стресса, вызванного все возрастающей антропогенной нагрузкой. Не в лучшую сторону меняется их среда обитания, а соответственно, и снижается иммунная защита, что подтверждают исследователи [8]. Это происходит на фоне отсутствия контроля численности популяций животных, имеющих эпидемиологическое значение, что способствует росту заболеваемости бешенством.

В результате, из 184 случаев гидрофобии, зарегистрированных в России с начала текущего столетия, большая часть выявлена на территориях Центрального федерального округа (40%). Так, в 2015 году 4 из 6 случаев заболеваний людей пришлось именно на эти регионы (Липецкая, Ярославская, Владимирская области). С начала века максимальное число заболевших в Центральной России было выявлено в Московской, Тверской, Воронежской и Тульской областях. Таким образом, эпидемиологический надзор дает ответ на вопрос, где болеет население и почему в настоящее время основная заболеваемость приходится именно на эти территории.

Также надзор позволяет определить группы риска, которые меняются в динамике. Так, если до 2006 года болели преимущественно школьники и взрослые в возрасте от 40 до 50 лет, то в последние годы заболеваемость сместилась на наиболее мобильные группы населения — 20 — 29 и 50 — 59 лет, которые в результате своей активности все чаще подвергаются риску заражения, в т.ч. находясь на территориях природных очагов.

Известен и портрет человека, входящего в группу максимального риска заражения — это мужчина, чаще неработающий (более 60%) и проживающий или длительно находящийся в сельской местности, или точнее, вне городской черты [2].

Случаи заболеваний, хотя и значительно реже, регистрируются и среди детей. Такие случаи наблюдались в 2012, 2014 и 2015 годах. В последние годы в России не регистрируются случаи, связанные с профессиональным заражением. Ежегодно вакцинируют и ревакцинируют от 16 до 24 тыс. человек, относящихся к данным группам риска.

Несмотря на то, что заражение людей происходит в течение всего года, большинство случаев приходится на летний период, что связано с максимальными контактами населения с источниками возбудителя.

Ответ на вопрос, почему население продолжает болеть, становится очевидным после анализа случаев заболеваний, а также оказываемой населению антирабической помощи. Во-первых, изучение локализации укусов свидетельствует о значительной доле, так называемых, спровоцированных укусов животными. Более 80% таких повреждений приходятся на кисти рук, а также других частей тела и относится к укусам опасной локализации. Во-вторых, население все реже обращается за антирабической помощью. Так, если до 2005 года на долю таких случаев приходилось менее половины от числа зарегистрированных, то в настоящее время их количество приблизилось к 70%. И в-третьих, даже в случаях обращения за медицинской помощью по вине самого населения она оказывается не всегда: процент отказов от антирабических прививок вырос в 3,6 раза.

Таким образом, основная причина заболеваемости кроется в низком уровне информированности населения о проблеме, что приводит к сохранению риска инфицирования. Это подтверждает динамика обращаемости населения

Российской Федерации за антирабической помощью по поводу укусов, оцарапываний и ослюнений животными. С начала века она снизилась практически на 100 тыс. случаев (450 тыс. в 2000 г. до 370 тыс. человек в 2014 г.).

Как показали результаты нашего исследования, посвященного оценке информированности и существующего риска среди жителей московского региона, у населения не просто отсутствует настороженность в отношении бешенства, оно практически ничего не знает о нем [2]. ВОЗ отнесла бешенство к группе забытых инфекций. Действительно, в нашей стране бешенство, регистрируемое у людей, является болезнью дефицита знаний.

Таким образом, действующая в Российской Федерации система надзора за бешенством позволяет выявить особенности территориального распределения заболеваемости населения, а также выявить группы, контингенты и время риска. Вместе с тем, есть проблемы, которые надзор пока не в состоянии обнаружить и соответственно оценить. К числу таких первоочередных проблем относится состояние диагностики.

Клиницистам хорошо известно, что бешенство — эта та из немногих инфекций, которую нельзя пропустить, поскольку имеются патогномичные признаки и ведущий из них — гидрофобия. Между тем, все большее число наблюдений свидетельствует о возможности атипичного клинического течения, которое возникает, прежде всего, на фоне вакцинации в анамнезе. Так, в 2014 году описан случай бешенства у 27-летнего мужчины в Иране, сопровождавшийся абдоминальным синдромом [7], а в 2015 году — клиника энцефалита без гидрофобии у 6-летнего тунисского мальчика [13].

Подтверждением названной тенденции служит и исследование, проведенное в нашей стране, в результате которого сотрудникам ЦНИИЭ и Омского института природно-очаговых инфекций удалось ретроспективно установить рабическую инфекцию у двух человек, умерших от энцефалита в Астраханской области в 2003 году [9].

Но даже при наличии в клинической картине гидрофобии и другой типичной неврологической симптоматики, развивающейся на финальной стадии болезни, все чаще выявляются ошибки в постановке первичного диагноза. Как показывает эпидемиологический анализ, основываясь только на клинических данных, заболевшим ставятся самые разнообразные первичные диагнозы — от банального ОРВИ до патологии различных органов и систем, что сопровождается соответствующими дополнительными, в т.ч. инструментальными исследованиями. Это приводит к существенной отсрочке в проведении противоэпидемических мероприятий среди населения, подвергшегося вместе с больных риску заражения, а дополнительной группой риска становятся еще и медицинские работники. Так, например, в 2011 году описан случай заболевания 9-летней девочки, проживающей в Подольском районе Московской области, возникший спустя 2 месяца после укуса одичавшей кошки [1]. Заболевание началось с появлений сыпи в области ягодиц и кожного зуда, и ребенку был поставлен диагноз «стрептодермия». Когда у больной появилась боль в горле и затрудненное дыхание, врач-оториноларинголог заподозрил заглоточный абсцесс, ребенку неоднократно проводилась ларингоскопия. Далее в процессе диагностики ребенок осматривался офтальмологом, кардиологом, детским хирургом, инфекционистами и неврологом. В результате риску заражения подверглись 14 человек, которые уже по результатам постмортальной диагностики получали антирабическую иммунизацию.

Приведенные данные свидетельствуют о недостаточной подготовке врачей-клиницистов, а также необходимости рассмотрения вопроса о про-

ведении, в т.ч. прижизненной, диагностики бешенства с использованием современных и эффективных методов. Принятый в качестве «золотого стандарта» диагностики метод флюорисцирующих антител, как показали исследования, имеет свои достоинства и недостатки. Последние связаны с необходимостью проведения его в кратчайшие сроки, а это не всегда удается в связи с организационными особенностями системы — в стране имеется всего одна лаборатория, выполняющая данные исследования. Внедрение ПЦР-РТ диагностики позволит не только расшифровывать атипичные случаи бешенства, но и будет способствовать изучению особенностей выявленных на территории Российской Федерации вариантов возбудителя. В результате сложится полная картина эпизоотолого-эпидемиологической ситуации не только по классическому бешенству, но и по всем лиссавирусным инфекциям. Согласно Девятому отчету международного комитета по таксономии вирусов, род *Lyssavirus*, кроме классического вируса бешенства — *Rabies virus (RABV)*, включает следующие виды возбудителей нейротропных инфекций, вызывающих необратимые поражения головного мозга человека и теплокровных животных: *Australian bat lyssavirus (ABLV)*, *European bat lyssavirus 1 and 2 (EBL1,2)*, *Khujand lyssavirus (KHUV)*, *Aravan lyssavirus (ARAV)*, *Irkut lyssavirus (IRKV)*, *Duvenhge lyssavirus (DUVV)*, *Lagos bat lyssavirus (LBV)*, *Mokola lyssavirus (MOKV)*, *West Caucasian bat lyssavirus (WCBV)*, *Shimoni bat virus (SHIBV)* [11].

Большая часть известных к настоящему времени лиссавирусов обнаружена за пределами нашей страны, и это значит, что возрастает риск заражения граждан России, выезжающих за рубеж. Начиная с 2001 года, системой надзора выявлено всего несколько таких завозных случаев у россиян. Между тем, с учетом набирающей темпы миграции населения таких случаев может быть значительно больше, что необходимо учитывать при разработке мероприятий по профилактике бешенства путешественников. Следует отметить, что за рубежом предусмотрены учреждения, оказывающие лечебно-профилактическую и диагностическую помощь таким гражданам [12, 15].

Другая проблема надзора связана со снижением качества эпидемиологической диагностики бешенства — растет число случаев с неизвестной причиной заболевания, т.е. без укуса животным в анамнезе. Это может быть обусловлено несколькими обстоятельствами. Во-первых, длительным инкубационным периодом, который, по нашим данным, в среднем составляет от 20 до 90 дней, но может значительно удлиняться в случаях заражения за рубежом, а также на фоне постэкспозиционной профилактики. Описаны случаи бешенства с инкубацией до 8 и более лет [10, 15]. Во-вторых, заражение человека может происходить вне связи с укусами животных посредством не прямой передачи вируса, например, при пересадке различных органов и тканей [16], а также контактно-бытовым путем от человека человеку [17].

Современная ситуация по бешенству в мире и в Российской Федерации, новые данные об изменении эпидемических проявлений диктуют необходимость изменения существующей системы надзора. Ее совершенствование должно предусматривать создание научно-исследовательского координационного центра с одной, а в перспективе — сетью референс-лабораторий, объединение усилий научных групп, занятых разработкой вопросов диагностики, надзора и контроля за бешенством, внедрение молекулярно-генетического мониторинга, а также создание благоприятных условий для межведомственного взаимодействия, в т.ч. эпидемиологов, клиницистов, ветеринаров, лабораторных и др. специалистов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гербергаген А.В. Бешенство, актуальные аспекты для оториноларинголога. Российская оториноларингология. 2012, 5 (60): 161-163.
2. Картавая С.А., Раичич С.Р., Симонова Е.Г. Бешенство в Российской Федерации: современная ситуация и эпидемиологические риски. Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2016, 4: 4-8.
3. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2015 году: Государственный доклад. М., Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2016.
4. Симонова Е.Г., Хадарцев О.С. Современные тенденции и особенности контроля за ситуацией по бешенству в Российской Федерации. Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2014, 2: 65-68.
5. Черкасский Б.Л. Эпидемиология и профилактика бешенства. М., Медицина, 1985.
6. Шабейкин А.А., Гулюкин А.М., Цареградский П.Ю., Паршикова А.В., Южаков А.Г., Зайкова О.Н. Анализ текущей эпизоотической ситуации по бешенству на территории Российской Федерации. Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. 2015, 4: 5-7.
7. Ayatollahi J., Sharifi M.R., Shahcheraghi S.H. Severe abdominal pain as the first manifestation of rabies. Jundishapur J. Microbiol. 2014, 7 (8): e11671. doi: 10.5812/jjm.11671.
8. Blokhin G.I., Gorbunova E.V. Fox (*Vulpes vulpes*) in urbanized landscape of Moscow region. Izvestia Timiryazev Agricultural Academy. Special Issue. М., 2012.
9. Dedkov V.G., Lukashev A.N., Deviatkin A.A., Kuleshov K.V., Safonova M.V., Poleshchuk E.M., Drexler J.F., Shipulin G.A. Retrospective diagnosis of two rabies cases in humans using NGS. J. Clinical Virology. 2016, 78: 74-81.
10. Gautret P., Carrara P., Parola P. Long incubation in imported human rabies. Ann. Neurol. 2014, 75 (2): 324-325. doi: 10.1002/ana.24092.
11. King A.M.Q., Adams M.J. et al. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press: Amsterdam, 2012.
12. Park J.H., Lee C.H., Won Y.K. et al. Rabies post-exposure prophylaxis of overseas travelers in the international travel clinic of the national medical center from 2006 to 2012, Korea. Infect. Chemother. 2014, 46 (1): 13-20.
13. Tinsa F., Borgi A., Jahouat I., Boussetta K. Rabies encephalitis in a child: a failure of rabies post exposure prophylaxis? BMJ Case Rep. 2015 Jan; 14; 2015. pii: bcr2014206191. doi: 10.1136/bcr-2014-206191.
14. WHO Expert Consultation on Rabies. Second report. WHO Technical Report. Geneva: WHO Press, 2013.
15. Wijaya L., Ford L., Laloo D. Rabies post exposure prophylaxis in a UK travel clinic: ten years' experience. J. Travel. Med. 2011, 18 (4): 257-261.
16. Zhou H., Zhu W., Zeng J. et al. Probable rabies virus transmission through organ transplantation, China, 2015. Emerg. Infect. Dis. 2016 Aug; 22 (8): 1348-1352. doi: 10.3201/eid2208.151993.
17. Zhu J., Pan J., Lu J. A case report on indirect transmission of human rabies. J. Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol). 2015, 16 (11): 969-970. doi:10.1631/jzus.B1500109.

Поступила 02.02.17

Контактная информация: Филатов Николай Николаевич, д.м.н., проф.,
105064, Москва, М.Казенный пер., 5а, р.т. (495)917-49-00

ВЛИЯНИЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *ESCHERICHIA COLI* НА ФАГОЦИТАРНУЮ И МЕТАБОЛИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ МЫШЕЙ С ИНДУЦИРОВАННЫМ ИММУНОДЕФИЦИТОМ

¹Башкирский государственный медицинский университет, ²Институт биохимии и генетики, ³Башкирский государственный университет, Уфа

Цель. Экспериментальная оценка влияния фракций ЛПС *E.coli* на фагоцитарную и метаболическую активность нейтрофилов крови лабораторных мышей с индуцированным иммунодефицитом. *Материалы и методы.* Фагоцитарную активность оценивали по фагоцитарному числу (ФЧ), фагоцитарному индексу (ФИ) и интегральному фагоцитарному индексу (ИФИ), интенсивность метаболизма и энергетических процессов ферментных систем — по тесту восстановления нитросинего тетразолия (НСТ), среднему цитохимическому коэффициенту (СЦК) в спонтанном и индуцированном тестах и индексу стимуляции (ИС). *Результаты.* При введении мышам с вторичным иммунодефицитом субстанции ЛПС-3 показано достоверно наибольшее для данного исследования повышение ФЧ (на 15,8%), ИФИ (на 17,7%), НСТ-ИН (на 10,3%), цитохимических коэффициентов СЦК-ИН (у.е.) и ИС (у.е.) — на 14,8 и 10,9% соответственно в сравнении с соответствующими показателями иммунодефицитных мышей, получавших ликолипид. *Заключение.* Некоторые фракции липополисахарида *E.coli* M17 обладают иммуностимулирующей активностью.

Журн. микробиол., 2017, № 3, С. 84—90

Ключевые слова: липополисахарид, *E.coli*, лабораторные мыши, иммунодефицит, циклофосфан, фагоцитарное число, фагоцитарный индекс, тест НСТ, средний цитохимический коэффициент, индекс стимуляции

A.R.Mavzyutov¹, O.A.Knyazeva¹, R.R.Garafutdinov², A.R.Gabdrakhmanova^{1,3}

EFFECT OF LIPOPOLYSACCHARIDE OF *ESCHERICHIA COLI* ON PHAGOCYTE AND METABOLIC ACTIVITY OF MICE BLOOD NEUTROPHILS WITH INDUCED IMMUNE DEFICIENCY

¹Bashkiria State Medical University, ²Institute of Biochemistry and Genetics, ³Bashkiria State University, Ufa, Russia

Aim. Experimental evaluation of effect of *E. coli* LPS fractions on phagocyte and metabolic activity of blood neutrophils of laboratory mice with induced immune deficiency. *Materials and methods.* Phagocyte activity was evaluated by phagocyte number (PN), phagocyte index (PI) and integral phagocyte index (IPI), intensity of metabolism and energetic processes of enzyme systems — by test of tetrazolium nitro blue (TNB), mean cytochemical coefficient (MCC) in spontaneous and induced tests and stimulation index (SI). *Results.* LPS-3 substance administration into mice with secondary immune deficiency has resulted in a significantly highest increase of PN (15.8%), IPI (17.7%), TNB-IN (10.3%), cytochemical coefficients MCC-IN (u.) and IS (u.) — 14.8 and 10.9%, respectively, compared with the parameters of immune deficient mice that had received lycopid. *Conclusion.* Some fractions of *E. coli* M17 polysaccharide have immune stimulating activity.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 3, P. 84—90

Key words: lipopolysaccharide, *E. coli*, laboratory mice, immune deficiency, cyclophosphane, phagocyte number, phagocyte index, TNB test, mean cytochemical coefficient, stimulation index

ВВЕДЕНИЕ

Липополисахариды (ЛПС), или бактериальные эндотоксины клеточных стенок грамотрицательных бактерий все чаще оказываются в зоне пристального внимания исследователей, что обусловлено их выраженным системным биологическим эффектом. В частности, показано, что высвобождение ЛПС сопровождается лихорадкой, падением артериального давления, мультиорганными поражениями, шоком и летальным исходом. В основе указанного находится ЛПС-ассоциированная эндотоксинемия — одна из наиболее существенных составляющих различных форм инфекционной патологии человека [5, 6].

Наряду с этим в литературе все больше появляется данных о том, что бактериальный компонент микробиоты человека — основной фактор формирования адаптивных иммунных реакций, в том числе обусловленных ЛПС [10]. Механизмы переключения направления эффектов ЛПС неизвестны, однако высока вероятность того, что они могут быть связаны с качественными и количественными различиями биологической активности отдельных структурных компонентов и/или фракций ЛПС [15]. Учитывая, что одно из ключевых звеньев иммунных реакций при бактериальных инфекциях TLR-опосредованная активация фагоцитоза [11], целью данного исследования явилась сравнительная экспериментальная оценка влияния трех различных фракций ЛПС *E.coli* на фагоцитарную и метаболическую активность нейтрофилов крови лабораторных мышей с индуцированным иммунодефицитом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве стандартного источника липополисахаридов использовали культуру (штамм М17, колибактерин). Субстанции различных фракций ЛПС для данного исследования получали в соответствии с разработанным нами способом [2].

При выполнении работы соблюдались правила проведения работ с использованием экспериментальных животных. В работе были задействованы беспородные мыши из вивария БГМУ. Было сформировано 6 групп по 12 особей весом 20 — 30 г: 1 группа — интактные и 2 — 6 группы — с индуцированным иммунодефицитом, вызванным однократной внутрибрюшинной инъекцией циклофосфида (50 мг/кг циклофосфан, ОАО «Киевмедпрепарат») [4]. Контрольным препаратом для сравнения иммуномодулирующей активности фракций ЛПС (ЛПС-1, ЛПС-2, ЛПС-3) служил (группа 3) ликолипид [4-О-(2-ацетиламино-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозил)-N-ацетилмурамил]-L-аланил-D-α-глутамиламид), являющийся синтетическим аналогом бактериальных гликопептидов и относящийся к фармакотерапевтической группе иммуностимулирующих средств. Разовую дозу рассчитали, исходя из инструкции по терапевтическому применению препарата для взрослых (0,14 — 0,28 мг/кг). Она составила 0,1 мл свежеприготовленного раствора препарата сравнения (0,05 мг/мл) для одного подопытного животного при среднем весе в 30 г — 0,17 мг/кг.

Препарат сравнения и исследуемые фракции ЛПС-1, ЛПС-2, ЛПС-3 вводили в рассчитанных дозировках внутрибрюшинно мышам 3, 4, 5 и 6 групп соответственно через сутки после индуцирования экспериментального иммунодефицитного состояния, ежедневно, в течение 21 дня. Для исследуемых фракций ЛПС разовая доза составляла 0,2 мл (10 пг/мл, обоснование далее по тексту).

На 22 сутки в каждой группе оценивали функциональную способность

нейтрофильных гранулоцитов, определяли фагоцитарное число, фагоцитарный индекс и интегральный фагоцитарный индекс. Функциональный резерв клеток оценивали в сравнительном двухвариантном НСТ-тесте (спонтанный/индуцированный) по проценту лейкоцитов с гранулами восстановленного НСТ (диформазама черного цвета), по среднему цитохимическому коэффициенту и индексу стимуляции [1].

Для статистической обработки данных применялись непараметрические методы, для описания количественных признаков в малых выборках — медиана (Me) и интерквартильный размах (Q1-Q3), для расчета статистической значимости различий количественных признаков между группами — непараметрический критерий Манна-Уитни для двух независимых групп. Отличия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для оценки иммуномодулирующих эффектов ЛПС *E.coli* нами с помощью жидкостной колоночной хроматографии было получено 5 условных фракций общей массой около 250 мг. Из них по результатам спектроскопии ЯМР ^1H три были идентифицированы как липополисахариды (ЛПС-1, ЛПС-2 и ЛПС-3) благодаря наличию в их спектрах характерных сигналов протонов жирнокислотных остатков при 1,3 м.д., углеводных остатков при 4,8 м.д. и CH_2 -групп, сопряженных с полярными фрагментами (3,2 м.д.). Две другие хроматографические фракции, судя по спектрам ЯМР ^1H , представляли собой фрагменты ЛПС — его липидную и олигосахаридную части и выходили на первой и третьей ступенях элюции соответственно. Фракции ЛПС-1, ЛПС-2 и ЛПС-3 выходили из колонки на этапе элюции смесью этанол-триэтиламин, хорошо растворялись в воде и имели спектры ЯМР ^1H , идентичные по сигналам, но различавшиеся по интегральной интенсивности пиков (табл. 1, группа протонов III). В результате наименее редуцированной по углеводному фрагменту, т.е. наименее разрушенной, была фракция ЛПС-3, однако для дальнейших сравнительных исследований были взяты все три фракции ЛПС.

Для наглядности сравнительной оценки иммуномодулирующей активности полученных субстанций ЛПС нами была выбрана модель экспериментального вторичного иммунодефицита, вызываемого циклофосфамидом [4]. Внутривенное введение цитостатика в экспериментально подобранной дозе 50 мг/кг обеспечивало равномерное поступление вещества в систему кровообращения и кровяные органы животного и формировало выраженное и стойкое иммунодефицитное состояние, не вызывая при этом непредсказуемой гибели лабораторных животных на протяжении всего периода наблюдения. Безусловно изменения иммунореактивности, возникающие при тех или иных воздействиях, не являются иммунодефицитами. Однако в результате экспериментального сравнения

Таблица 1. Соотношение количества атомов водорода в разных фракциях ЛПС

№	Группа протонов	Интенсивность сигнала		
		ЛПС-1	ЛПС-2	ЛПС-3
I	-CH (углеводные остатки)	35	39	52
II	-CH ₂ («полярные»)	23	24	24
III	-CH ₂ («неполярные»)	36	36	36

фагоцитарной активности нейтрофилов интактных мышей контрольной группы (группа 1) и мышей, подвергавшихся воздействию циклофосфамида (группа 2), было показано достоверное снижение ФЧ на 57,3%, ФИ — на 23,5%,

Таблица 2. Влияние ликопида, ЛПС-1, ЛПС-2 и ЛПС-3 на фагоцитарную активность нейтрофилов крови мышей с вторичным иммунодефицитом

Показатель	Группы мышей					
	1 (n=12)	2 (n=12)	3 (n=12)	4 (n=12)	5 (n=12)	6 (n=12)
	Контроль интактные	Контроль б/лечения	Ликопид	ЛПС-1	ЛПС-2	ЛПС-3
Фагоцитарное число						
M±σ	5,4±0,109	2,3±0,324	3,8±0,36	3,5±0,427	3,2±0,183	4,2±0,31
Me	5,4	2,305	3,67	3,62	3,145	4,25
[Q1-Q3]	[5,3—5,5]	[2,15—2,6] p ₁₋₂ =0,00003	[3,5—4,15] P ₂₋₃ =0,00003	[3,15—3,95] p ₂₋₄ =0,00004 p ₃₋₄ =0,29	[3,05—3,35] p ₂₋₅ =0,00004 p ₃₋₅ =0,0002	[4,05—4,5] p ₂₋₆ =0,00003 p ₃₋₆ =0,02
Фагоцитарный индекс						
M±σ	68±5,09	51,8±4,19	56,4±5,73	57,4±4,16	56±2,398	57,8±3,35
Me	68	52	57	56	56	59
[Q1-Q3]	[65—70,5]	[48,5—54,5] p ₁₋₂ =0,00003	[51,5—59,5] p ₂₋₃ =0,035	[55—60] p ₂₋₄ =0,003 p ₃₋₄ =0,6	[55,5—57] p ₂₋₅ =0,008 p ₃₋₅ =0,73	[55—60,5] p ₂₋₆ =0,001 p ₃₋₆ =0,26
Интегральный фагоцитирующий индекс						
НСТ-СП (%)	3,68±0,22 3,69 [3,53—3,88]	1,18±0,15 1,21 [1,11—1,25] p ₁₋₂ =0,00003	2,12±2,22 2,04 [1,95—2,24] p ₂₋₃ =0,00003	2,02±0,22 1,95 [1,83—2,24] p ₂₋₄ =0,00005 p ₃₋₄ =0,19	1,78±0,18 1,84 [1,69—1,92] p ₂₋₅ =0,00004 p ₃₋₅ =0,0017	2,42±0,04 2,4 [2,38—2,42] p ₂₋₆ =0,00003 p ₃₋₆ =0,004
НСТ-СП (%)						
M±σ	7,6±1,367	5±0,847	6,6±1,07	5,4±0,656	5,2±1,003	7±1
Me	7,5	5	6,5	6	5,5	7
[Q1-Q3]	[7—8,5]	[5—6] p ₁₋₂ =0,0001	[6—7] P ₂₋₃ =0,0015	[5—6] p ₂₋₄ =0,273 p ₃₋₄ =0,009	[5—6] p ₂₋₅ =0,622 p ₃₋₅ =0,005	[6—8] p ₂₋₆ =0,001 p ₃₋₆ =0,6
НСТ-ИН (%)						
M±σ	60±6,57	41,6±10,8	54±3,79	49,6±2,49	47,8±3,83	58,2±4,49
Me	59,5	46	53,5	49	48	59
[Q1-Q3]	[55—65]	[34,5—51] p ₁₋₂ =0,0001	[51,5—56] P ₂₋₃ =0,002	[48—51] p ₂₋₄ =0,126 p ₃₋₄ =0,001	[46—50,5] p ₂₋₅ =0,371 p ₃₋₅ =0,0005	[55—61,5] p ₂₋₆ =0,0002 p ₃₋₆ =0,023
СЦК-СП						
M±σ	0,27±0,04	0,2±0,03	0,3±0,03	0,3±0,02	0,3±0,03	0,31±0,04
Me	0,31	0,22	0,28	0,29	0,28	0,31
[Q1-Q3]	[0,28—0,34]	[0,2—0,24] p ₁₋₂ =0,0001	[0,27—0,31] P ₂₋₃ =0,00004	[0,26—0,305] p ₂₋₄ =0,0001 p ₃₋₄ =0,1	[0,27—0,305] p ₂₋₅ =0,0002 p ₃₋₅ =0,6	[0,28—0,35] p ₂₋₆ =0,00003 p ₃₋₆ =0,06
СЦК-ИН						
M±σ	0,7±0,04	0,5±0,06	0,61±0,04	0,62±0,07	0,59±0,02	0,68±0,03
Me	0,7	0,505	0,61	0,625	0,6	0,7
[Q1-Q3]	[0,68—0,72]	[0,475—0,54] p ₁₋₂ =0,00003	[0,57—0,75] p ₂₋₃ =0,0001	[0,56—0,66] p ₂₋₄ =0,004 p ₃₋₄ =0,6	[0,59—0,62] p ₂₋₅ =0,0001 p ₃₋₅ =0,9	[0,69—0,72] p ₂₋₆ =0,00003 p ₃₋₆ =0,0003
ИС						
M±σ	2,3±0,42	1,26±0,11	1,96±0,15	2,08±0,29	1,72±0,19	2,22±0,26
Me	2,385	1,255	1,97	2,06	1,725	2,185
[Q1-Q3]	[1,98—2,605]	[1,185—1,345] p ₁₋₂ =0,00003	[1,875—2,085] p ₂₋₃ =0,00003	[1,905—2,35] p ₂₋₄ =0,00003 p ₃₋₄ =0,27	[1,595—1,86] p ₂₋₅ =0,00004 p ₃₋₅ =0,006	[2,01—2,43] p ₂₋₆ =0,00003 p ₃₋₆ =0,006

ИФИ — на 67,2% в течение трех недель. Функциональные резервы клеток у мышей группы 2 также были ниже, чем соответствующие показатели у интактных мышей группы 1. В частности после введения циклофосамида значения НСТ-СП (%) и НСТ-ИН (%), цитохимических коэффициентов

СЦК-СП (у.е.), СЦК-ИН (у.е.) и ИС (у.е.) снижались на 33,3; 22,7; 29; 27,9 и 47,4% соответственно (табл. 2). Указанное, исходя из патогенетического принципа функциональной оценки иммунной системы, позволило нам трактовать индуцированное циклофосфамидом состояние в качестве вторичного иммунодефицитного [3].

При введении в качестве положительного контроля мышам с вторичным иммунодефицитом (группа 3) ликопида через 21 день была установлена достоверно значимая активация фагоцитоза: ФЧ повышалось на 59,2%, ФИ — на 9,6%, ИФИ — на 68,6%, НСТ-СП (%) — на 30%, НСТ-ИН — на 17%, цитохимические коэффициенты СЦК-СП (у.е.), СЦК-ИН (у.е.) и ИС (у.е.) — на 27,3%, 20,1% и 57% соответственно в сравнении с соответствующими показателями иммунодефицитных мышей, не получавших данный препарат (табл. 2).

Для сравнительной оценки иммуномодулирующей активности полученных нами субстанций ЛПС-1, ЛПС-2 и ЛПС-3 была рассчитана разовая доза. При этом мы руководствовались тем, что физиологический уровень ЛПС в системном кровотоке человека составляет 2 — 10 пкг/мл (0 — 1 ЕУ/мл) свободного эндотоксина [8], в среднем — 10 — 50 нг/организм человека. Это в норме при среднем весе человека 80 кг составит 125 — 625 пкг/кг веса, а экспериментально установленная летальная доза ЛПС (wЛПС *E.coli* O:55), вызывавшая у мышей эндотоксический шок — 3 мг/мышь (150 мг/кг) [7]. В наших исследованиях при ежедневном введении мышам в соответствующих группах по 2 пкг субстанций сравниваемых фракций ЛПС разовая доза составляла 67 — 100 пкг/кг, а с учетом возможного их аккумуляирования — 1,4 — 2,1 нг/кг веса одного лабораторного животного.

При введении иммунодефицитным мышам субстанций ЛПС-1 (группа 4), ЛПС-2 (группа 5) и ЛПС-3 (группа 6) в сравнении с мышами, не получавшими указанные препараты, были установлены достоверно более высокие значения ФЧ на 57,1; 36,5 и 84,4%, ФИ — на 7,7; 7,7 и 13,5%, ИФИ — на 61,2; 52,1 и 98,4%, НСТ-СП (%) — на 20; 10 и 40%, НСТ-ИН — на 6,5; 4,4 и 28,3%, цитохимических коэффициентов СЦК-СП (у.е.) — на 31,8; 27,3 и 40,9%, СЦК-ИН (у.е.) — 23,7; 18,8 и 38,6%, ИС (у.е.) — на 64,2; 37,5 и 74,1% соответственно (табл. 2).

При введении мышам с вторичным иммунодефицитом субстанции ЛПС-3 (группа 6) было показано достоверно наибольшее для данного исследования повышение ФЧ (на 15,8%), ИФИ (на 17,7%), НСТ-ИН (на 10,3%), цитохимических коэффициентов СЦК-ИН (у.е.) и ИС (у.е.) — на 14,8 и 10,9% соответственно в сравнении с соответствующими показателями иммунодефицитных мышей, получавших ликопид (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

В последние годы представления о роли иммунитета претерпели существенные изменения в связи с предложениями рассматривать систему микробиота-человек в качестве новой гармонизированной формы существования живых организмов, названной суперорганизмом. Микробиота суперорганизма может выполнять функции программной оболочки (прим. авт.: по аналогии со средой Windows по формальному признаку), поскольку количество микроорганизмов только в кишечнике человека (10^{14}) почти в 100 раз превышает количество всех клеток человека (10^{12}), количество видов — свыше 1000, количество генов микроорганизмов — порядка 10^6 , тогда как количество

генов организма-хозяина — приблизительно 2×10^4 . Еще теснее связи между микробиотой и макроорганизмом на метаболическом уровне, что сделало практически общепринятым понятие метаболом [14].

В связи с вышеизложенным, иммунная система представляется уже не только в качестве защитной, но и в качестве коммуникативно-регуляторной между макроорганизмом и микробиотой. Они взаимодействуют благодаря многоуровневым механизмам, среди которых наиболее интенсивно изучаются молекулярные, сопряженные с биологически активными соединениями, например с ЛПС. Однако исходно сложный химический состав ЛПС, конформационные и другие варианты этой молекулы в эксперименте определяют наглядность преимущественно крайней степени их биологических эффектов, например, таких, как сепсис, при которых как в мелодии сложно уловить на слух составляющие ее отдельные ноты. Тогда как показано, что системное воспаление и токсический эффект, связанный с активацией Toll-подобных рецепторов, могут обуславливать и относительно простые молекулы, например, внеклеточные гистоны [12]. Руководствуясь указанным, нам представилась целесообразной экспериментальная оценка эффектов не эндотоксина, не ЛПС в целом, а отдельных его фракций. Выбор механизма фагоцитоза в качестве системы для сравнительной оценки биологической активности ЛПС-1, ЛПС-2 и ЛПС-3 был связан с тем, что фагоцит являет собой, на наш взгляд, точку кристаллизации, начиная с которой различные межклеточные и межмолекулярные взаимодействия трансформируются в функционально единую систему иммунитета. В связи с этим, даже основываясь на относительно небольшом объеме полученных в ходе проведенного исследования данных, можно обозначить научную перспективу понимания целого ряда новых иммунных механизмов, инициируемых грамотрицательными бактериями микробиоты человека. В частности, показанная нами на гранулоцитах мышей иммуностимулирующая активность фракции ЛПС-3 предполагает возможность продолжения этих исследований для расшифровки следующих этапов этого процесса.

Исследования последних лет показали, что иммуностимуляция в дальнейшем для эндотоксина в целом опосредуется такими медиаторами иммунного ответа, как интерлейкин-22 (IL-22), ET-1, S1P, резистин, интерлейкин-17 (IL-17), висфатин, HMGB1, остеокальцин (OPN) и гистоны. Соответственно мишенями для фракций ЛПС могут быть продуцирующие вышеуказанные молекулы клетки — Т-лимфоциты, DCs, NKT-клетки, тучные клетки, эндотелиальные клетки, фибробласты, эритроциты, тромбоциты, адипоциты, макрофаги, Th-17, нейроны, остеокласты, эпителиальные и другие эукариоты [9].

Безусловно обозначенная на иммунодефицитных мышях иммуностимулирующая активность одной из фракций липополисахарида *E.coli* M17 не может в полной мере охарактеризовать ее эффект для человека. Однако, если исходить из установленной в эксперименте разницы в дозах эндотоксина, необходимых для инициирования воспалительного ответа у мышей линии C57BL/6 — 500 нг/кг и у человека — лишь 2 нг/кг [13], предположение об эффективности фракции ЛПС-3 применительно к людям не представляется преувеличенным.

Работа выполнена при поддержке Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 — 2013 гг., в рамках реализации мероприятия № 1.2.1. Государственный контракт №П385 от 30.07.2009.

ЛИТЕРАТУРА

1. Виксман М.Е., Маянский А.Н. Способ оценки функциональной активности нейтрофилов человека по реакции восстановления нитросинего тетразолия: Методические рекомендации. Казань, Казанский НИИЭМ, 1979.
2. Гарафутдинов Р.Р., Машков О.И., Мавзютов А.Р. Способ получения липополисахаридов грамотрицательных бактерий. Заявка на патент РФ №2016108563, приоритет от 09.03.2016.
3. Ковальчук Л.В., Чередеев А.Н. Патогенетический принцип оценки иммунной системы человека: дальнейшее развитие. Клиническая лабораторная диагностика. 1995; 6: 78-80.
4. Конкина И.Г., Иванов С.П., Князева О.А., Давыдова В.А., Васильева Е.В., Карачурина Л.М. и др. Физико-химические свойства и фармакологическая активность глюконатов Mn (II), Fe (II), Co (II), Cu (II) и Zn (II). Химико-фармацевтический журнал. 2002; 36 (1): 18-21.
5. Лиходед В.Г., Юшук Н.Д., Яковлев М.Ю. Роль эндотоксина грамотрицательных бактерий в инфекционной и неинфекционной патологии. Архив патологии. 1996; 58 (2): 8-13.
6. Мавзютов А.Р., Бондаренко К.Р., Еникеев А.Н., Бондаренко В.М. Системная эндотоксинемия как патогенетический фактор осложнения беременности. Журн. микробиол. 2012; 5: 16-21.
7. Маркина А.А. Комплексное экспериментальное моделирование шоковых состояний. Иммунология. 2012; 5: 250-254.
8. Яковенко А.В., Яковенко Э.П. Цирроз печени: вопросы терапии. Consilium medicum. 2006; 8 (7): 13-17.
9. Aziz M., Jacob A., Yang W.-L. et al. Current trends in inflammatory and immunomodulatory mediators in sepsis. J. Leucocyte Biology. 2013; 93: 329-342.
10. Bengmark S. Gut microbiota, immune development and function. Pharmacological Res. 2013; 69 (1): 87-113.
11. Blander J.M., Medzhitov R. Regulation of phagosome maturation by signals from Toll-like receptors. Science. 2004; 304 (5673): 1014-1018.
12. Chen R., Kang R., Fan X.-G. et al. Release and activity of histone in diseases. Cell Death Disease. 2014; 5(e1370); doi:10.1038/cddis.2014.337.
13. Copeland S., Warren H.S., Lowry S.F. et al. Acute inflammatory response to endotoxin in mice and humans. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2005; 12 (1): 60-67.
14. Eberl G. A new vision of immunity: homeostasis of the superorganism. Nature publishing group: Mucosal Immunology; online publication 5 May 2010. doi: 10.1038/mi.2010.20.
15. Kato N., Sugiyama T., Naito S. et al. Molecular structure of bacterial endotoxin (Escherichia coli Re lipopolysaccharide): implications for formation of a novel heterogeneous lattice structure. Mol. Microbiol. 2000; 36 (4): 796-805.

Поступила 10.12.16

Контактная информация: Мавзютов Айрат Радикович, д.м.н., проф.,
450008, Уфа, ул. Ленина, 3, р.т. (347)276-19-60

ОЦЕНКА НАПРЯЖЕННОСТИ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА К КОРИ И КРАСНУХЕ У БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН В МОСКВЕ

¹Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи, Москва; ²Государственный гуманитарно-технологический университет, Орехово-Зуево; ³Российская медицинская академия последиplomного образования, Москва

Цель. Качественная и количественная оценка гуморального иммунитета в отношении возбудителей управляемых инфекций у беременных женщин в Москве. *Материалы и методы.* Исследованы сыворотки крови 559 беременных и 201 небеременных женщин на наличие антител к вирусам кори и краснухи методом ИФА. *Результаты.* Выявлена значительная доля серонегативных к кори лиц среди беременных (21,5%) и небеременных (29,1%) женщин в возрасте 18 — 45 лет, что превышает уровень, допустимый действующими нормативными требованиями, в 3,1 и 4,2 раза соответственно. С возрастом этот показатель увеличивался, и среди серопозитивных лиц отмечалась высокая концентрация IgG к вирусу кори. Это свидетельствует о том, что лица старшего возраста недостаточно охвачены вакцинацией против кори, при этом значительная их часть имеет постинфекционный иммунитет, более высокий и стойкий по сравнению с поствакцинальным. В отношении краснушной инфекции установлена более благоприятная ситуация: доля серонегативных лиц среди обследуемых составила 8,9 и 10,5% соответственно. С возрастом доля серонегативных лиц уменьшалась и к 36 — 45 годам достигла минимума — 4,7%. В возрастной группе 26 — 30 лет выявлено как максимальное количество серонегативных к краснухе лиц — 12,5%, так и максимальная доля лиц, имеющих высокие значения концентрации специфических IgG. С увеличением срока гестации наблюдали увеличение доли серонегативных результатов в отношении обеих инфекций. Коррелятивная связь между напряженностью иммунитета к кори и краснухе у обследованных женщин отсутствовала. *Заключение.* Предложено разработать меры по дополнительной вакцинации взрослого населения и проводить лабораторное обследование беременных и женщин, планирующих беременность, не только в отношении краснухи, но и кори.

Журн. микробиол., 2017, № 3, С. 91—98

Ключевые слова: корь, краснуха, беременность, гуморальный иммунитет

A.V.Nozdacheva¹, T.A.Semenko¹, S.G.Mardanly², S.V.Rotantov³

EVALUATION OF INTENSITY OF HUMORAL IMMUNITY TO MEASLES AND RUBELLA IN PREGNANT WOMEN IN MOSCOW

¹Gamaleya Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow; ²State Humanitarian-Technological University, Orekhovo-Zuevo; ³Russian Medical Academy of Post-Graduate Education, Moscow, Russia

Aim. Qualitative and quantitative evaluation of humoral immunity regarding causative agents of controllable infections in pregnant women in Moscow. *Materials and methods.* Sera of 559 pregnant and 201 non-pregnant women were studied for the presence of antibodies against measles and rubella virus by ELISA. *Results.* A significant proportion of individuals seronegative to measles was detected among pregnant (21.5%) and non-pregnant (29.1%) women aged 18 — 45, that exceeds the level acceptable by regulatory requirements by 3.1 and 4.2 times, respectively. The parameter increased with age and among seropositive individuals a high concentration of IgG against measles was noted. This gives evidence, that older individuals are not covered by measles vaccination enough, and a significant part of them has post-infection immunity that is higher and more robust compared with post-vaccination. Regarding rubella infection, a more favorable situation was established: proportion of seronegative individuals among the examined was 8.9 and

10.5%, respectively. The proportion of seronegative individuals decreased with age, and by age 36 — 45 reached the minimal 4.7%. A maximum amount of rubella seronegative individuals was detected in the 26-30 age group — 12.5%, as well as maximum proportion of individuals who have high concentration of specific IgG. An increase of the amount of seronegative results was observed with the increase of gestation period for both infections. Correlation between intensity of immunity against measles and rubella in the examined women was not present. *Conclusion.* Means for development of extra vaccination of the adult population and execution of laboratory examination of pregnant and women planning pregnancy are proposed regarding not only rubella, but also measles.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 3, P. 91—98

Key words: measles, rubella, pregnancy, humoral immunity

ВВЕДЕНИЕ

В структуре заболеваемости детей в Российской Федерации инфекционная патология традиционно занимает первое место. Из группы управляемых инфекций наиболее актуальными для детей являются корь и краснуха. Это обусловлено тем фактом, что Национальный календарь прививок в России предусматривает начало вакцинации детей в отношении указанных инфекций только с возраста 12 месяцев. При этом трансплацентарные материнские антитела (в случае если они присутствовали в кровотоке беременной женщины на достаточно высоком уровне), циркулирующие в кровотоке новорожденного, способны защищать ребенка до возраста около 6 месяцев, после этого срока материнские антитела постепенно элиминируют и дети становятся более уязвимыми в отношении указанных инфекций [1]. Источником получения инфекции для данного контингента являются, прежде всего, близкие родственники и родители.

В случае заболевания корью невакцинированные дети раннего возраста в силу возрастного несовершенства иммунной защиты подвергаются самому высокому риску развития осложнений, включая пневмонию, энцефалит, подострый склерозирующий панэнцефалит (развивается, в среднем, через 4 — 10 лет после перенесенной инфекции в 4 — 11 случаях на 100 тыс. переболевших корью) [18]. По данным ВОЗ корь остается одной из основных причин смерти у детей раннего возраста во всем мире [3, 4]. Риску развития тяжелых осложнений подвергаются также инфицированные женщины во время беременности, а сама беременность может закончиться самопроизвольным абортом, преждевременными родами, рождением ребенка с низкой массой тела [4, 18]. Кроме того, описаны случаи внутриутробного заражения корью плода, что повышает риск мертворождения и развития у ребенка в будущем подострого склерозирующего панэнцефалита с более коротким латентным периодом и прогрессивным течением, чем у детей, которые заразились корью после рождения [18].

Краснуха характеризуется более легким течением у взрослых и детей, чем корь, и сопровождается меньшим риском развития осложнений у заболевшего. Однако эпидемиологическая значимость этой инфекции определяется опасностью появления врожденных аномалий развития плода (синдром врожденной краснухи (СВК) при инфицировании краснухой беременной женщины. По оценкам ВОЗ, ежегодно в мире рождается более 100 000 детей с СВК [3], в связи с чем программа «Инициатива ВОЗ по борьбе с внутриутробными и детскими инфекциями» стремится обеспечить условия, при которых ни один ребенок не умирает бы от кори или не рождался с СВК.

Довакцинальный период развития медицины характеризовался высокой заболеваемостью перечисленными инфекциями преимущественно среди детского населения и повсеместным их распространением. В настоящее время заболеваемость в России находится на спорадическом уровне, что является следствием проведения масштабной вакцинации. В то же время, накопление в популяции прослойки неиммунных лиц в отношении указанных инфекций (не болевших, не привитых по каким-либо причинам или привитых, но не выработавших иммунитет — так называемые «первичные и вторичные вакцинные неудачи») может явиться причиной подъема заболеваемости. Примером такого осложнения эпидемической ситуации явилась эпидемия кори, случившаяся в 2011 — 2014 годах. В России был зафиксирован рост интенсивного показателя заболеваемости корью с 0,09 на 100 тыс. населения в 2010 году до 3,23 — в 2014 году (129 и 4 711 случаев соответственно) [9, 10]. Одновременно наблюдали эпидемию и в США, где в 2000 году была зарегистрирована элиминация кори. Так, по данным литературных источников в 2004 году в США было зарегистрировано всего 37 случаев кори (что было оценено авторами, как низкий уровень заболеваемости), а в 2014 году — 668 случаев (высокий уровень) [18].

В настоящее время эпидемическая ситуация по кори относительно стабилизировалась. Показатель заболеваемости в Российской Федерации в 2015 году составил 0,58 на 100 тыс. населения, в то время как в Москве — 1,9 на 100 тыс. населения. Заболеваемость корью в России за январь—май 2016 года по сравнению с тем же периодом 2015 года понизилась в 14,8 раза и составила 0,03 на 100 тыс. населения (против 0,46 случаев на 100 тыс. населения в 2015 году). Всего за 5 месяцев 2016 года в 13 субъектах Российской Федерации было зарегистрировано 46 случаев кори [2], а в Москве — только два завозных случая кори [Фомкина Н.Н., 2016].

В январе—мае 2016 года в России было зарегистрировано 38 случаев краснухи (что составило 0,03 случая на 100 тыс. населения), в том числе 3 случая — у детей до 14 лет. При этом интенсивный показатель заболеваемости населения этой инфекцией по стране в целом вырос в 2,9 раза по сравнению с аналогичным периодом 2015 года, когда было зарегистрировано 13 случаев, в том числе у ребенка до 14 лет [2]. В Москве случаев краснухи за истекший период 2016 года зарегистрировано не было [Фомкина Н.Н., 2016].

Согласно действующим нормативным документам [7, 8] критерием эпидемиологического благополучия при кори и краснухе принято считать выявление в каждой «индикаторной» группе не более 7% лиц с отрицательными результатами серологических лабораторных тестов. Однако многие авторы не только в России [1, 9], но и за рубежом [15, 16] в последние годы отмечают превышение указанного уровня при проведении серологического скрининга. Исследователями также был отмечен низкий уровень иммунологической защищенности против кори у беременных женщин.

Вышеизложенное определяет актуальность изучения иммунологической защищенности против кори и краснухи у беременных женщин, входящих в группу риска.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании использованы 559 образцов из коллекции Банка сывороток крови ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, которые были получены в 2013 — 2014 годах от беременных женщин разных сроков гестации (опытная группа) в возрасте 18 — 45 лет (средний возраст составил 31,7 лет). В качестве группы срав-

нения была исследована кровь, полученная в 2013 — 2014 годах от небеременных женщин (контрольная группа; $n=201$) в возрасте 18 — 60 лет, включая 182 женщину в возрасте 18 — 45 лет (средний возраст — 31,9 лет) и 19 — в возрасте от 45 до 60 лет (средний возраст 51,8 лет). Все обследованные лица проживали в Москве, указанный фактор являлся одним из основных критериев отбора в настоящее исследование.

Исследование было организовано и проведено в соответствии с МУ 3.1.2943-11 [7]. Изучение напряженности иммунитета к вирусам кори и краснухи в сыворотках крови осуществляли методом количественного ИФА с использованием отечественных тест-систем, разрешенных к применению в медицинских целях в России. Полученные результаты интерпретировали согласно инструкциям по применению соответствующих диагностических наборов: положительные считали образцы сыворотки крови, в которых специфические IgG определялись в концентрации 0,18 МЕ/мл к вирусу кори и 10 МЕ/мл к вирусу краснухи.

Полученные в исследовании данные были подвергнуты статистической обработке: рассчитаны средние значения (M) концентрации противокоревых и противокраснушных IgG в соответствующих возрастных группах, стандартное отклонение и ошибка средней арифметической (m). Достоверность различий полученных количественных показателей оценивали с помощью t -критерия Стьюдента для несвязанных выборок (для вероятности прогноза 95,5%). Для оценки наличия связи явлений использовали коэффициент корреляции Спирмена (r).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного обследования была выявлена значительная доля серонегативных к кори лиц в возрасте 18 — 45 лет как в основной, так и в контрольной группах, составившая 21,5 и 29,1 % соответственно (табл. 1). Полученные в обеих группах результаты превышали допустимый действующими нормативными документами уровень (7%) в 3,1 и 4,2 раза соответственно. При этом средняя концентрация IgG к вирусу кори в сыворотке крови женщин контрольной группы более старшего возраста (от 45 до 60 лет) была достоверно выше, чем у беременных и небеременных женщин в возрасте 18 — 45 лет ($t=3,49$; $p=0,0005$).

В отношении краснушной инфекции была выявлена более благоприятная ситуация: доля серонегативных лиц в группах беременных и доноров составила в среднем 8,9% и 10,5% соответственно (табл. 2). При этом статистически достоверных различий средних значений концентрации IgG к вирусу краснухи в сыворотке крови обследованных лиц не было выявлено ($t=1,84$; $p>0,05$).

Полученные нами результаты соответствуют данным зарубежной литературы, где неоднократно обсуждалось выявление значимой доли восприимчивых к кори и краснухе лиц среди беременных. Так, результатами исследований в Иране среди беременных в возрасте 16 — 42 лет (средний возраст — $27,3\pm 5$ лет) серонегативными к кори были 18,3% обследованных, а к вирусу краснухи — 4,2% [12]. По данным других источников в 2004 — 2010 годах в Японии в результате проведения аналогичного исследования было выявлено 28% серонегативных лиц или лиц, имевших низкий уровень коревых IgG, которые, по мнению исследователей, нуждались в дополнительной вакцинации [15].

Превышение нормативного уровня фактической защищенности населения против указанных инфекций (особенно в индикаторных группах и группах

Таблица 1. Результаты определения специфических IgG к возбудителю кори методом ИФА в крови у беременных и небеременных женщин

Сравниваемые показатели	Основная группа (беременные)	Группа сравнения (небеременные женщины)	
		18–45 лет	от 45 до 60 лет
Количество серонегативных результатов к возбудителю кори	120 (21,5%)	53 (29,1%)	4 (21,1%)
Максимальная концентрация IgG к возбудителю кори (МЕ/мл)	7,3±1,29	5,3±0,08	4,3±0,42
Средняя концентрация IgG к возбудителю кори (МЕ/мл)	0,98±0,06	0,77±0,075	2,05±0,42
Доля лиц с низким уровнем коревых IgG	74,3%	76,7%	40,7%
Доля лиц со средним уровнем коревых IgG	15,5%	14,7%	6,7%
Доля лиц с высоким уровнем коревых IgG	10,3%	8,5%	53,7%

Таблица 2. Результаты определения специфических IgG к возбудителю краснухи методом ИФА в крови у беременных и небеременных женщин

Сравниваемые показатели	Основная группа (беременные)	Группа сравнения (небеременные женщины)	
		18–45 лет	от 45 до 60 лет
Количество серонегативных результатов к возбудителю краснухи	50 (8,9%)	21 (10,5%)	3 (15,8%)
Средняя концентрация IgG к вирусу краснухи (МЕ/мл)	579,25±15,87	605,4±33,4	561,7±128,2
Максимальная концентрация IgG к вирусу краснухи (МЕ/мл)	1499±15,9	1482±33,4	1508±128,2

риска) при проведении серологического скрининга было описано в отечественной литературе неоднократно [5, 6, 9]. По данным исследования сывороток крови, полученных от женщин, проживавших в городе Москва и Московской области, было выявлено в среднем до 20,1% серонегативных лиц [11]. Современная эпидемиологическая ситуация делает актуальным вопрос организации дополнительной вакцинации против указанных инфекций не только отдельных групп, но и всего взрослого населения, а также организацию проведения серологического скрининга у женщин, планирующих беременность.

В литературе имеются работы по изучению напряженности гуморального иммунитета к управляемым инфекциям у привитых и переболевших лиц. Так, в работе А.П. Топтыгиной приведены данные о средней концентрации специфических противокоревых антител в крови здоровых людей [10]. У привитых лиц концентрация указанных антител составила 1,248±0,156 МЕ/мл, у переболевших корью ранее — 2,923±0,137 МЕ/мл. В нашей работе указанный уровень мы использовали как ориентировочный при определении пороговых значений концентрации коревых IgG (1,5 и 3,3 МЕ/мл) в качестве критериев для оценки интенсивности гуморального иммунитета у беременных женщин: низкая концентрация — 0,18 — 1,49 МЕ/мл — наиболее характерна для лиц, привитых против кори; средняя концентрация — 1,50 — 3,29 МЕ/мл — отмечается с равной вероятностью как у привитых, так и переболевших корью; высокая концентрация — более 3,3 МЕ/мл — чаще встречается у лиц, переболевших корью ранее.

Как видно из табл. 1, частота выявления разного уровня антикоревых антител у лиц основной и контрольной группы в возрасте до 45 лет не имела статистически достоверных различий: наибольший удельный вес (74,3 — 76,7%) имели лица, вакцинированные против кори, отнесенные нами к первой группе с низкой концентрацией IgG в крови, наиболее редко встречались женщины, по всей видимости, переболевшие корью ранее и имевшие высокую концентрацию IgG (10,3 и 8,5% соответственно).

Выявленная тенденция служит дополнительным подтверждением ведущей роли вакцинации в создании невосприимчивости населения к управляемым инфекциям, в частности к кори.

По данным литературных источников у жителей развивающихся стран, где отсутствуют программы массовой вакцинации населения, доля лиц, имеющих IgG к вирусу краснухи на защитном уровне, меньше, чем в европейском регионе, она варьирует в пределах от 52,9 до 97,9%, при этом количество восприимчивых к инфекции беременных женщин колеблется от 2,1 до 47,1% [17].

В нашей работе проведен анализ возрастной структуры серонегативных к кори и краснухе лиц в группе беременных женщин.

Установлено, что у беременных женщин с возрастом отмечается тенденция к увеличению количества серонегативных лиц в отношении коревой инфекции (18 — 25 лет: 8,5%; 26 — 30 лет: 20,8%; 31 — 35 лет: 16,7%). В возрасте 36 — 45 лет их доля была максимальной и составила 29,7%. Результаты, аналогичные нашим, были получены в Иране, где среди обследованных беременных серонегативными к вирусу кори были 26,7% женщин в возрасте старше 35 лет, а среди лиц в возрасте 34 года и моложе — только 17,5% [12].

Противоположная тенденция была нами выявлена в отношении краснушной инфекции: с возрастом доля серонегативных лиц уменьшалась, и в возрасте 36 — 45 лет она достигла минимума в 4,7%. При оценке среднего и максимального значений концентрации IgG в каждой возрастной группе было установлено следующее. Максимальные значения указанных показателей были определены у лиц в возрасте 26 — 30 лет ($635 \pm 28,7$ МЕ/мл и $1499 \pm 28,7$ МЕ/мл соответственно), при этом, как было указано выше, именно в этой группе была максимальной доля лиц, серонегативных к вирусу краснухи.

При анализе возрастного состава серопревалентных к кори лиц установлено, что среди лиц с высокой концентрацией коревых IgG преобладают женщины старшей возрастной группы (36 — 45 лет), в которой доля серонегативных к кори лиц была максимальной (29,7%). Выявленная тенденция подтверждается данными обследования группы сравнения, женщин в возрасте 45 — 60 лет (табл. 1): концентрация IgG к вирусу кори в сыворотке крови в этой группе достоверно выше, чем у всех обследованных лиц в возрасте до 45 лет.

Такие разнонаправленные тенденции, с нашей точки зрения, могли быть обусловлены спецификой обследованного контингента: в соответствии с действующим законодательством женщины, планирующие беременность, и беременные на ранних сроках должны быть обследованы с использованием лабораторных методов на наличие гуморального иммунитета к краснухе. Кроме того, беременные женщины более старшего возраста могли быть привиты против краснухи дополнительно во время предыдущих беременностей.

Суммируя изложенное выше, можно заключить, что лица старшего возраста недостаточно охвачены вакцинацией против кори, и значительная часть их имеет постинфекционный иммунитет более высокий и стойкий по сравнению с поствакцинальным. В отношении краснухи наиболее уязвимыми являются женщины в возрасте 26 — 30 лет. Полученные данные служат дополнительным подтверждением необходимости проведения дополнительной вакцинопрофилактики в указанных возрастных группах, а также увеличения возраста иммунизации взрослого населения против кори (в соответствии с действующим Национальным календарем профилактических прививок от 2011 года этот возраст составляет 35 лет).

Все обследованные беременные находились на разных сроках гестации, в соответствии с этим они были разделены на три подгруппы с общепринятыми подходами к срокам наблюдения. Средний возраст женщин в каждой из полученных подгрупп составил: на 1 триместре (тр.) — $31,9 \pm 5,2$ лет, на 2 триместре — $31,3 \pm 5,1$ лет, на 3 триместре — $33 \pm 4,7$ лет.

Установлено, что доля серонегативных и восприимчивых к обеим инфекциям лиц с увеличением срока беременности нарастает (1 тр. — 1,35%; 2 тр. — 1,8%; 3 тр. — 9,5%), что косвенно свидетельствует о постепенном снижении иммунологической защищенности в период беременности и, по всей видимости, обусловлено особенностями гормональной перестройки в организме женщины.

При сравнении средних значений концентрации IgG к вирусу кори у женщин на разных сроках беременности не было выявлено статистически значимых различий.

Было установлено, что у женщин, находящихся в третьем триместре беременности, среднее значение концентрации IgG к вирусу краснухи достоверно ниже таковой у женщин в первом и втором триместрах ($t=2,2$ при $p=0,03$), что указывает на то, что женщины, находящиеся на последних сроках беременности, наиболее уязвимы в отношении коревой и краснушной инфекций.

Другим важным аспектом нашей работы явилось установление взаимосвязи между напряженностью иммунитета к кори и краснухе. Ввиду того, что в нашей стране женщинам при планировании беременности рекомендуется обследования на напряженность иммунитета только к краснухе, открытым остается вопрос: как защитный уровень антител к краснухе соотносится с иммунологической восприимчивостью к кори?

Для ответа на этот вопрос нами обработаны полученные в исследовании данные (концентрация IgG к вирусам кори и краснухи) с использованием корреляционной статистики Спирмена (r). В результате проведенного анализа было получены показатели, свидетельствующие об отсутствии у обследованных лиц корреляции между напряженностью иммунитета к кори и краснухе: $r=0,127$; $p=0,05$.

Таким образом, наличие защитного и даже высокого уровня антител к вирусу кори не свидетельствует о восприимчивости или ее отсутствии к вирусу краснухи. Аналогичные результаты были получены исследователями из США при обследовании условно здоровых женщин (коэффициент Каппа= $0,1366$) [13].

Для повышения эффективности профилактических мероприятий в отношении кори нами рекомендуется проведение исследований на напряженность иммунитета не только к краснухе, но и к кори, в том числе, и при планировании и на ранних сроках беременности для последующего решения вопроса о назначении дополнительной вакцинации. По данным исследований, проведенных в 6 странах Америки [14], а также в Бразилии было установлено, что практически отсутствует риск развития СВК у новорожденных, матери которых были привиты живой краснушной вакциной в период менее 30 дней беременности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Голева О.В., Самойлова И.Г., Мурина Е.А., Мундруева А.А. Особенности противокорьевого иммунитета. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2012, 6:25-29.
2. Инфекционная заболеваемость в Российской Федерации за январь-май 2016 г. (по данным формы №1 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях»). <http://>

- gospotrebnadzor.ru/activities/statistical_materials/statistic_details.php? ELEMENT_ID=6643, опубликовано 17.06.2016.
3. Информационный бюллетень ВОЗ № 366 Ноябрь 2015 г. <http://www.who.int>.
 4. Корь. Информационный бюллетень № 286. Февраль 2015 г. <http://www.who.int>.
 5. Лыткина И.Н. Создание унифицированной системы управления эпидемическим процессом кори, краснухи и эпидемического паротита. Автореф. дис. д-ра мед. наук. М., 2011.
 6. Онищенко Г.Г., Ежлова Е.Б., Лазикова Г.Ф., Мельникова А.А., Ватолина А.А., Тихонова Н.Т., Герасимова А.Г. Реализация программы ликвидации кори в Российской Федерации. Журн. микробиол. 2011, 4: 51-56.
 7. Организация и проведение серологического мониторинга состояния коллективного иммунитета к инфекциям, управляемым средствами специфической профилактики (дифтерия, столбняк, коклюш, корь, краснуха, эпидемический паротит, полиомиелит, гепатит В). Методические указания. МУ 3.1.2943-11. <http://36.gospotrebnadzor.ru/documents/rekdoc1/9396>.
 8. Профилактика кори, краснухи, эпидемического паротита. Санитарные правила. СП 3.1-2952-11. http://snipov.net/database/c_4163967195_doc_4293851299.html.
 9. Семененко Т.А., Ежлова Е.Б., Ноздрачева А.В., Русакова Е.В. Особенности проявления эпидемического процесса кори в 1992-2014 годах в Москве. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2015, 6 (85): 16-23.
 10. Топтыгина А.П. Комплексная оценка процессов формирования и поддержания иммунологической памяти на примере вакцинации против кори, краснухи и эпидемического паротита: Автореф. дисс. д-ра мед. наук. М., 2015.
 11. Шмитько А.Д., Костинов М.П., Бочарова И.И., Сависько А.А., Магаршак О.О., Полищук В.Б. Трансплацентарные IgG к вирусу кори в пуповинной крови у новорожденных разных регионов Российской Федерации. Журн. микробиол. 2015, 1: 52-57.
 12. Behnam Honarvar, Mohsen Moghadami, Afagh Moattari et al. Seroprevalence of anti-rubella and anti-measles IgG antibodies in pregnant women in Shiraz, Southern Iran: Outcomes of a nationwide measles-rubella mass vaccination. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/PMC3561451>.
 13. Colleen M. Kennedy, Barbara A. Burns, Kevin A. Ault. Does rubella immunity predict measles immunity? A serosurvey of pregnant. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/doi:10.1155/IDOG/2006/13890>.
 14. Castillo-Solórzano C., Reef S.E., Morice A. et al. Rubella vaccination of unknowingly pregnant women during mass campaigns for rubella and congenital rubella syndrome elimination, the Americas 2001-2008. J. Infect. Dis. 2011 (Sep); 1; 204 Suppl. 2: S713-7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/doi:10.1093/infdis/jir489>.
 15. Kanda E., Yamaguchi K., Hanaoka M. et al. Low titers of measles antibodies in Japanese pregnant women: a single-center study. J. Obstet. Gynaecol. Res. 2013 (Feb); 39 (2): 500-503. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/doi:10.1111/j.1447-0756.2012.01997.x>.
 16. Miller E.M. Changes in serum immunity during pregnancy. Am. J. Hum. Biol. 2009 (May-Jun); 21 (3): 401-403. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/doi:10.1002/ajhb.20882>.
 17. Mirambo M.M., Majigo M., Aboud S. et al. Serological markers of rubella infection in Africa in the pre vaccination era: a systematic review. BMC Res. Notes. 2015, 8: 716. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/doi:10.1186/s13104-015-1711-x>.
 18. Rasmussen S.A. Jamieson D.J. What obstetric health care providers need to know about measles and pregnancy. Obstet Gynecol. 2015 (Jul); 126 (1): 163-170. doi: 10.1097/AOG.0000000000000903.

Поступила 10.12.16

Контактная информация: Ноздрачева Анна Валерьевна,
123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

*Н.В.Соболева¹, А.А.Карлсен^{2,3}, Т.В.Кожанова^{1,4}, В.С.Кичатова^{2,3},
В.В.Клушкина⁵, О.В.Исаева^{2,3}, М.Е.Игнатьева⁶, В.В.Романенко⁷,
Н.Д.Ооржак⁸, Е.Ю.Малинникова^{2,3}, К.К.Кюреган^{2,3}, М.И.Михайлов^{2,3}*

ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ГЕПАТИТА С СРЕДИ УСЛОВНО ЗДОРОВОГО НАСЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

¹Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П.Чумакова, ²Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, ³НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, ⁴НПЦ медицинской помощи детям с пороками развития челюстно-лицевой области и врожденными заболеваниями нервной системы ДЗМ, Москва; ⁵Первый московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова; ⁶Управление Роспотребнадзора по Республике Саха (Якутия), Якутск; ⁷Центр гигиены и эпидемиологии Свердловской области, Екатеринбург; ⁸Инфекционная больница, Кызыл, Республика Тыва

Цель. Определить распространенность антител к вирусу гепатита С (анти-ВГС) среди условно здорового населения РФ. *Материалы и методы.* Исследованы образцы сыворотки крови, полученные от условно здорового населения РФ из пяти географически удаленных регионов с разным уровнем заболеваемости гепатитом С: Свердловской, Ростовской, Московской областей, Республики Тыва и Республики Саха (Якутия). Всего исследовано 4764 образцов, полученных от лиц из 10 возрастных групп: меньше 1 года, 1 — 4 лет, 5 — 9 лет, 10 — 14 лет, 15 — 19 лет, 20 — 29 лет, 30 — 39 лет, 40 — 49 лет, 50 — 59 лет, старше 60 лет. Анти-ВГС определяли методом иммуноферментного анализа с коммерческими тест-системами. *Результаты.* Общая распространенность анти-ВГС в 5 регионах РФ составила 2,6% (126/4764). Наибольшая частота выявления анти-ВГС была выявлена в Республиках Тыва и Якутия и составила 3,3%, в остальных регионах данный показатель варьировал от 1,7% (Московская область) до 3% в Свердловской области. Пиковые показатели выявления анти-ВГС среди населения в разных регионах были приурочены к разным возрастным группам: ≥60 лет в Республиках Тыва и Якутия (11% и 9,9% соответственно), 40 — 49 лет в Московской области (6,2%), 1 — 4 года и 30 — 39 лет в Свердловской области (5,9 и 4,9% соответственно) и 20 — 39 лет в Ростовской области (3,9%). *Заключение.* Результаты выявления анти-ВГС в различных возрастных когортах условно здорового населения РФ свидетельствуют о высокой степени пораженности ВГС практически всех возрастных групп в интервале от 20 лет до ≥60 лет. В каждом из обследованных регионов выявлены возрастные когорты, для которых целесообразно включение в региональные скрининговые программы.

Журн. микробиол., 2017, № 3, С. 99—106

Ключевые слова: гепатит С, анти-ВГС, возрастные когорты, диагностика, скрининг

*N.V.Soboleva¹, A.A.Karlsen^{2,3}, T.V.Kozhanova^{1,4}, V.S.Kichatova^{2,3},
V.V.Klushkina⁵, O.V.Isaeva^{2,3}, M.E.Ignatyeva⁶, V.V.Romanenko⁷,
N.D.Oorzhak⁸, E.Yu.Malinnikova^{2,3}, K.K.Kyuregan^{2,3}, M.I.Mikhaylov^{2,3}*

FREQUENCY OF DETECTION OF ANTIBODIES TO HEPATITIS C VIRUS AMONG CONVENTIONALLY HEALTHY POPULATION OF RUSSIAN FEDERATION

¹Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalites, ²Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, ³Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, ⁴Scientific-Practical Centre of Medical Aid to Children with Development Diseases of Maxillofacial Region and Congenital Diseases of the Nervous System, Moscow; ⁵Sechenov First Moscow State Medical University; ⁶Administration of Rosпотребнадзор for the Sakha (Yakutia) Republic, Yakutsk; ⁷Centre for Hygiene and Prophylaxis for Sverdlovsk Region, Ekaterinburg; ⁸Infectious Hospital, Kyzyl, Republic Tyva, Russia

Aim. Determine the prevalence of antibodies to hepatitis C virus (anti-HCV) among conditionally healthy population of Russian Federation. *Materials and methods.* Sera samples obtained from conditionally healthy population of the Russian Federation from 5 geographically distant regions with different levels of morbidity for hepatitis C were studied: Sverdlovsk, Rostov, Moscow regions, Tyva and Sakha (Yakutia) Republics. 4764 samples were studied in total obtained from individuals of 10 age groups: younger than 1, 1 – 4, 5 – 9, 10 – 14, 15 – 19, 20 – 29, 30 – 39, 40 – 49, 50 – 59, older than 60 years. Anti-HCV were determined by commercial ELISA. *Results.* The total prevalence of anti-HCV in 5 regions of Russian Federation was 2.6% (126/4764). The highest frequency of detection of anti-HCV was detected in Tyva and Yakutia Republics and was 3.3%, in other regions this parameter varied from 1,7 (Moscow region) to 3% in Sverdlovsk region. Peak parameters of anti-HCV detection among population in various regions were connected with various age groups: older than 60 years in Tyva and Yakutia Republics (11 and 9.9%, respectively), 40 – 49 in Moscow region (6.2%), 1 – 4 and 30 – 39 years in Sverdlovsk region (5.9 and 4.9%, respectively) and 20 – 39 in Rostov region (3.9%). *Conclusion.* Results of anti-HCV detection in various age cohorts of conditionally healthy population of Russian Federation give evidence regarding high morbidity with HCV of almost all the age groups in the interval from 20 to older than 60 years. Age cohorts were detected in each of the studied regions for which inclusion into regional screening programs is feasible.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 3, P. 99–106

Key words: hepatitis C, anti-HCV, age cohorts, diagnostics, screening

ВВЕДЕНИЕ

Гепатит С (ГС) является одной из важнейших медико-социальных проблем здравоохранения во многих странах мира, в том числе и в Российской Федерации. Фундаментальные научные исследования молекулярной биологии вируса гепатита С (ВГС) позволили расшифровать различные аспекты его репликации и создать высокоэффективные (более 95%) безинтерфероновые лекарственные препараты [6]. Наличие таких лекарств сделало реальным разработку и осуществление программ по контролю за гепатитом С [4]. Современный арсенал профилактических (вакцины против гепатитов А и В, противоэпидемические мероприятия) и лечебных средств, препараты для лечения хронических гепатитов В и С позволили ВОЗ поставить цель – снизить к 2030 г. заболеваемость гепатитами в мире на 90% [7]. Достижение такой цели требует решения многих научных задач, получения объективных знаний о значимости вирусных гепатитов для здравоохранения, смертности и распространения как среди популяции в целом, так и в различных группах населения.

Анализ заболеваемости и смертности от вирусных гепатитов, проведенный в 2016 году, установил, что ранее полученные показатели не соответствовали истинному распространению вирусных гепатитов [8]. Сегодня считают, что более 1/3 населения Земли были ранее инфицированы вызывающими гепатит вирусами, а более 300 миллионов человек умирают от этой инфекции. Значительная доля заболеваемости и смертности принадлежит гепатиту С.

В разрабатываемых глобальных и региональных программах контроля за вирусными гепатитами существенное место отводится определению широты распространения гепатита С при помощи определения частоты обнаружения антител к вирусу гепатита С (анти-ВГС) в различных группах населения. Обязательным условием проведения таких работ является строго контролируемое исследование с использованием диагностических препаратов высокой чувствительности и специфичности. Изменение интенсивности циркуляции ВГС находит свое отражение в частоте обнаружения анти-ВГС, что делает

актуальным проведение новых скрининговых исследований [Kandeel A. et al., 2016]. Учитывая необходимость разработки российской программы по контролю над гепатитом С, такие работы являются актуальными.

Цель исследования — определение доли серопозитивных по анти-ВГС лиц в различных возрастных группах условно здорового населения, проживающих в регионах России с разным уровнем заболеваемости гепатитом С.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследованы образцы сыворотки крови, полученные от условно здорового населения РФ из пяти географически удаленных регионов с разным уровнем заболеваемости ГС: Свердловской, Ростовской, Московской областей, Республики Тыва и Республики Саха (Якутия).

Всего было исследовано 4764 образца сыворотки крови, отобранных методом случайной выборки: 1047 — из Московской области, 954 — из Ростовской области, 871 — из Свердловской области, 910 — из Республики Тыва, 982 — из Республики Саха (Якутия). В исследование были включены лица 10 возрастных групп: меньше 1 года, 1 — 4 лет, 5 — 9 лет, 10 — 14 лет, 15 — 19 лет, 20 — 29 лет, 30 — 39 лет, 40 — 49 лет, 50 — 59 лет, старше 60 лет; каждая группа включала около 100 человек. Соотношение мужчин и женщин составило 1:1,4 (42,5%, 2023/4764 и 57,5%, 2741/4764 соответственно).

От всех пациентов было получено информированное согласие на проведение исследования, а также данные анкеты о факторах риска инфицирования ВГС (наличие татуировок, переливаний крови и хирургических вмешательств в анамнезе).

Анти-ВГС определяли методом иммуноферментного анализа с использованием тест-системы «ИФА-АНТИ-НСV» (НПО «Диагностические системы»). Все анти-ВГС позитивные образцы были подтверждены методом ИФА на наличие антител к структурным и неструктурным белкам ВГС с использованием тест-системы «ДС-ИФА-АНТИ-НСV-СПЕКТР-GM» (НПО «Диагностические системы»). Также все образцы, реактивные в первом скрининговом тесте на анти-ВГС, повторно тестировали в тесте на анти-ВГС другого производителя («MONOLISA Anti-HCV PLUS Assay Version 2», BioRad). Положительными признавали образцы, реактивные в двух тестах на анти-ВГС и в подтверждающем тесте на антитела к структурным и неструктурным белкам ВГС.

Статистическая обработка данных проведена с использованием вариационной статистики с помощью стандартной программы EXCEL 2010 и программы статистической обработки данных GraphPadPism 4. Статистическая обработка данных включала: выявление достоверности различий средних значений показателей в сравниваемых группах с использованием точного теста Хи-квадрат (различия оценивались как достоверные при вероятности 95% — $p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

На момент сбора образцов сыворотки крови от условно здорового населения (2008 г.) наибольшие показатели заболеваемости ОГС (выше среднего показателя по РФ — 2,8 на 100 тыс. населения) отмечены в Московской области — 5,4 на 100 тыс. населения и Свердловской области — 4,4 на 100 тыс. населения. В отношении ХГС заболеваемость не превышала средний показатель по РФ (39,1 на 100 тыс. нас.), а в Республике Тыва была зарегистрирована самая низкая заболеваемость ХГС в сравнении с другими регионами (9,3

на 100 тыс. населения). В 2015 г. соотношение уровня заболеваемости ХГС в данных регионах оставалось таким же – в Московской, Ростовской, Свердловской областях и Республике Тыва заболеваемость ХГС (18; 17,3; 28 и 20,3 на 100 тыс. нас. соответственно) была ниже среднего показателя по РФ (38 на 100 тыс. нас.), в Республике Саха (Якутия) значительно превышала среднероссийский показатель (54,5 на 100 тыс. нас.).

Проведенное серологическое исследование установило, что общая распространенность анти-ВГС в 6 регионах РФ составила 2,6% (126/4764). При этом частота обнаружения анти-ВГС в Свердловской области составила 3,0% (26/871), в Республике Тыва – 3,3% (30/910), в Республике Саха (Якутия) – 3,3% (32/982), в Ростовской области – 2,1% (20/954). Самые низкие – в Московской области (1,7%; 18/1047, $p < 0,01$ при сравнении с показателями в республиках Тыва и Якутия).

Анализ возрастной структуры обнаружения анти-ВГС установил различия в исследуемых регионах РФ. В Республике Тыва самые высокие показатели распространенности анти-ВГС наблюдались в возрастных группах 40 – 49 лет и ≥ 60 лет и составили 9,1% (5/55) и 11% (12/110) соответственно ($p < 0,05$ при сравнении с остальными возрастными группами в регионе). В Якутии наибольшая частота выявления анти-ВГС зарегистрирована у лиц 30 – 39 лет – 8,1% (11/136) и ≥ 60 лет – 9,9% (9/91), что достоверно превышало показатель в остальных возрастных группах в регионе, составлявший не более 5,1% ($p < 0,05$). В Свердловской области высокие показатели выявления анти-ВГС наблюдались у детей в возрасте 1 – 4 лет – 5,9% (9/152) и в возрастной группе 30 – 39 лет – 4,9% (4/82), при этом анти-ВГС не были выявлены у детей до 1 года и в группе обследованных в возрасте 10 – 14 лет. В Ростовской области показатели распространенности анти-ВГС были выше у лиц в возрасте 20 – 29 лет и 30 – 39 лет и составили 3,9% в обеих группах. В возрастной группе лиц до 1 года, 5 – 9 лет и 15 – 19 лет анти-ВГС в образцах сыворотки крови не были обнаружены. В Московской области частота выявления анти-ВГС у лиц 20 – 29 лет составила 4,8% (5/103) и 40 – 49 лет – 6,2% (4/65) ($p < 0,05$ при сравнении с остальными возрастными группами в регионе).

В целом в 5 регионах РФ наиболее высокие показатели частоты выявления анти-ВГС отмечены в возрастных группах лиц старше 60 лет – 5,2% (28/537), 30 – 39 лет – 4,9% (22/452), 40 – 49 лет, 50 – 59 лет – 3,8% (16/424; 15/396 соответственно). Данные показатели достоверно отличаются от уровня выявления анти-ВГС в остальных возрастных группах ($p < 0,05$).

Проведенный анализ анкетных данных среди анти-ВГС позитивных лиц установил, что обследованные лица ранее не были осведомлены о своем ВГС-статусе. Результаты позволили выделить три основных фактора риска инфицирования ВГС: наличие хирургических операций в анамнезе и переливание крови, а также татуировок. Анализ распространенности факторов риска установил, что эти факторы регистрируются у анти-ВГС позитивных по сравнению с анти-ВГС-негативными лицами в возрастных группах 15 – 19 лет, 20 – 29 лет, 30 – 39 лет и 40 – 49 лет. В возрастной группе 50 – 59 лет факторы риска инфицирования ВГС регистрировались со сходной частотой как среди анти-ВГС позитивных, так и среди анти-ВГС негативных лиц (53,3 и 52% соответственно).

Доля лиц, имеющих, согласно анкетным данным, факторы риска инфицирования ВГС, составила 32,3% в возрастной группе 20 – 29 лет, независимо от статуса по анти-ВГС, что в 2,3 раза выше по сравнению с аналогичным показателем в возрастной группе 15 – 19 лет – 13,9%. В более старших возраст-

ных группах этот показатель еще более увеличивается и составляет в возрастных группах 30 — 39 лет, 40 — 49 лет, 50 — 59 лет и ≥ 60 лет 37,2; 46,6; 52 и 69% соответственно. Таким образом, начиная с возрастной группы 20 — 29 лет наблюдается резкое увеличение доли лиц, имеющих в анамнезе факторы риска инфицирования ВГС.

ОБСУЖДЕНИЕ

Наиболее адекватным методом оценки уровня распространения вирусного гепатита С в стране в целом и ее регионах является анализ регистрируемой заболеваемости в сочетании с определением процента обнаружения антител в различных группах населения. Особую важность при этом представляет собой возрастное распределение, так как полученные знания позволяют сосредоточить внимание на наиболее пораженных группах населения, что определяет дальнейшее принятие практических решений по профилактике гепатита С.

Так, исследования, проведенные в США, продемонстрировали наиболее высокую частоту выявления анти-ВГС (до 4,3%), в 5 раз превышающую показатель в общей популяции, в группе лиц, рожденных между 1945 и 1965 гг. [3]. Это в итоге привело к появлению рекомендаций по обязательному проведению скрининга на анти-ВГС для этого поколения и смещению ориентированности программ от групп риска к возрастным когортам [10, 12].

По данным официальной регистрации заболеваемости в РФ, наиболее высокий показатель заболеваемости ХГС регистрируется в возрастной группе 30 — 39 лет, на долю которой приходится 32% всех состоящих на учете больных ГС. Второе место по показателю заболеваемости ХГС в большей части округов занимают лица в возрасте 20 — 29 лет, доля которых составляет около 24% от всех больных ХГС. Однако в Дальневосточном Федеральном и Северокавказском Федеральном округах второе место по заболеваемости ХГС занимает возрастная группа 40 — 49 лет, которая по всем остальным округам РФ занимает лишь третье место по распространенности и на ее долю приходится 17 — 23% от всех больных ХГС [1].

Для исследования распространенности анти-ВГС как маркера встречи с вирусом в разных возрастных когортах нами были выбраны пять регионов РФ с разными уровнями заболеваемости ХГС: высоким (Республика Саха — Якутия), средним (Ростовская и Свердловская области), низким (Московская область и Республика Тыва). Полученные результаты продемонстрировали, что наибольшая частота выявления анти-ВГС пришлась на возрастную группу старше 60 лет (5,2%), далее следуют возрастные группы 30 — 39 лет (4,9%) и 40 — 49 лет, 50 — 59 лет (по 3,8%). Средний показатель, рассчитанный для всех обследованных возрастных групп — 2,6% (126/4764), представляется средним, поскольку не превышает условный показатель 3,5%, применяемый для дифференциации средней и высокой распространенности ВГС в мире [11].

В пяти обследованных регионах наибольшая распространенность анти-ВГС была приурочена к разным возрастным группам. Так, среди лиц старше 60 лет высокие показатели выявления анти-ВГС были отмечены в Республиках Тыва и Саха (Якутия). В средних возрастных группах также наблюдались отличия — группа 30 — 39 лет была наиболее пораженной в Свердловской области и Республике Саха (Якутия), тогда как в Московской области и Республике Тыва пик выявления анти-ВГС смещался в следующую возрастную группу — 40 — 49 лет. Кроме того, в Московской и Ростовской областях также высокая частота выявления была отмечена в возрастных группе 20 — 29 лет.

Выявленные различия между регионами в возрастной динамике распространности анти-ВГС могут отражать региональные различия эпидемиологии ГС. На основании анализа данных по выявлению анти-ВГС выделяют три модели передачи ВГС. В странах, для которых характерна первая модель (США, Австралия), большинство случаев инфекции выявляют среди лиц в возрасте 30 — 49 лет, заразившихся в относительно недавнем прошлом (10 — 30 лет назад). В странах, для которых характерна вторая модель передачи ВГС (Япония, Италия), большинство случаев заражения регистрируют среди пожилых лиц, инфицированных, по-видимому, в отдаленном прошлом. В странах с третьей моделью распространения ВГС (Египет) высокие показатели инфицированности наблюдаются во всех возрастных группах, что указывает на сохраняющийся риск передачи ВГС. В странах с первой моделью передачи вируса инъекционная наркомания является доминирующим фактором риска, тогда как при второй и третьей моделях передачи ВГС основную роль в распространении вируса играют небезопасные инъекции и контаминированное оборудование, применяемое при медицинских манипуляциях [13]. Применительно к полученным в нашем исследовании данным о распространности анти-ВГС в разных возрастных группах такая классификация позволяет отнести Московскую область к первому типу передачи ВГС. В остальных регионах, наряду с высокой пораженностью лиц в возрасте 30 — 49 лет, характерной для первого типа передачи вируса, присутствует второй пик выявления анти-ВГС среди лиц старше 60 лет, характерный для второго типа распространения ВГС. Таким образом, по-видимому, для РФ характерно сочетание двух моделей распространения ВГС, при котором среди молодых взрослых инфицирование происходит преимущественно в результате инъекционной наркомании, а среди пожилых лиц имела место нозокомиальная передача вируса. Для подтверждения данного предположения необходим генетический анализ штаммов ВГС, выделенных в данном исследовании, для оценки распределения генотипов ВГС в разных возрастных группах и установления филогенетических связей между выявленными изолятами вируса. Это является целью дальнейшей работы в данном направлении.

Важным фактом является то, что никто из обследованных лиц, у которых были выявлены анти-ВГС, не знал о своем статусе. По данным литературы, около 65 — 75% людей, инфицированных ВГС, не знают о своем статусе, при этом такая ситуация характерна и для развитых стран [5, 9]. Это свидетельствует о том, что существующие рекомендации по скринингу на основании факторов риска недостаточны эффективны. В РФ разработаны «Рекомендации по диагностике и лечению взрослых больных гепатитом С» под ред. В.Т.Ивашкина, Н.Д.Ющука (2014 г.), согласно которым скрининг на маркеры инфицирования ВГС необходимо проводить следующим группам лиц: беременные женщины; реципиенты крови и ее компонентов, органов и тканей; персонал медицинских организаций; пациенты центров и отделений гемодиализа, пересадки почки, сердечно-сосудистой и легочной хирургии, гематологии; пациенты перед поступлением на плановые хирургические вмешательства, перед проведением химиотерапии; больные с хроническими заболеваниями, в том числе с поражением печени; пациенты наркологических и кожно-венерологических диспансеров; опекаемые и персонал учреждений с круглосуточным пребыванием детей или взрослых; контактные лица в очагах острого и хронического гепатита С; лица, относящиеся к группам риска по заражению ВГС (потребители инъекционных наркотиков и их половые партнеры, лица, оказывающие услуги сексуального характера, и их половые

партнеры, мужчины, практикующие секс с мужчинами, лица с большим количеством случайных половых партнеров); лица, находящиеся в местах лишения свободы; доноры крови (ее компонентов), органов и тканей, спермы; дети в возрасте до 12 месяцев, рожденные от инфицированных ВГС матерей; больные с иммунодефицитом (больные онкологическими заболеваниями, пациенты на гемодиализе, пациенты на лечении иммунодепрессантами и др.); больные, имеющие заболевание печени неясной этиологии [2].

Полученные в нашем исследовании результаты выявления анти-ВГС в различных возрастных когортах условно здорового населения РФ свидетельствуют о высокой степени пораженности ВГС практически всех возрастных групп в интервале от 20 лет до ≥ 60 лет. Такие результаты не позволяют рекомендовать в масштабах страны скрининг на анти-ВГС какой-либо одной возрастной когорты как имеющий преимущество перед скринингом групп риска. Однако в каждом из обследованных регионов были выявлены возрастные когорты, для которых целесообразно включение в региональные скрининговые программы. Так, для Республики Тыва — это возрастные группы 40 — 49 лет и ≥ 60 лет, для Республики Саха (Якутия) и Свердловской области — 30 — 39 лет и ≥ 60 лет, для Московской области — 20 — 29 и 40 — 49 лет, для Ростовской области — 20 — 39 лет. В заключение необходимо отметить, что скрининговые программы приобретают экономическую эффективность в случае, когда сочетаются с программами доступного эффективного лечения ГС. Дальнейшие исследования необходимы для оценки величины охвата противовирусной терапией, требующейся для значимого снижения ВГС-ассоциированной смертности и предотвращения дальнейшего распространения инфекции с учетом текущей эпидемиологической ситуации.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №15-15-30039).

ЛИТЕРАТУРА

1. Вирусные гепатиты в Российской Федерации. Под ред. В.И.Покровского, А.Б.Жебруна. СПб, ФБУН НИИЭМ им. Пастера, 2013.
2. Рекомендации по диагностике и лечению взрослых больных гепатитом С. Министерство здравоохранения Российской Федерации. 2013 год. http://gepatit-c.ru/treatment/pdf/hcv_rek_2013.pdf.
3. Armstrong G.L., Wasley A., Simard E.P. et al. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1999 through 2002. *Ann. Intern. Med.* 2006, 144: 705-714.
4. Durham D.P., Skrip L.A., Bruce R.D. et al. The impact of enhanced screening and treatment on hepatitis C in the United States. *Clin. Infect. Dis.* 2016, 62 (3): 298-304. doi: 10.1093/cid/civ894.
5. Deuffic-Burban S., Deltenre P., Buti M. et al. Predicted effects of treatment for HCV infection vary among European countries. *Gastroenterology.* 2012, 143 (4): 974-985.
6. González-Grande R., Jiménez-Pérez M., González Arjona C., Mostazo Torres J. New approaches in the treatment of hepatitis C. *World J. Gastroenterol.* 2016, 22 (4): 1421-32. doi: 10.3748/wjg.v22.i4.1421.
7. Global health sector strategy on viral hepatitis 2016-2021. World Health Organization, 2016. <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/246177/1/WHO-HIV-2016.06-eng.pdf>.
8. Lanini S., Easterbrook P.J., Zumla A., Ippolito G. hepatitis c: global epidemiology and strategies for control. *Clin. Microbiol. Infect.* 2016, Aug 10. pii: S1198-743X(16)30300-7. doi: 10.1016/j.cmi.2016.07.035.
9. Lemoine M., Nayagam S., Thursz M. Viral hepatitis in resource-limited countries and access to antiviral therapies: current and future challenges. *Future Virol.* 2013, 8 (4): 371-380.
10. McGarry L.J., Pawar V.S., Panchmatia H.R. et al. Economic model of a birth cohort screening program for hepatitis C virus. *Hepatology.* 2012, 55 (5): 1344-1355.
11. Mohd Hanafiah K., Groeger J., Flaxman A.D., Wiersma S.T. Global epidemiology of hepati-

tis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology*. 2013, 57(4): 1333-1342.

12. Smith B.D., Morgan R.L., Beckett G.A. et al. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Recommendations for the identification of chronic hepatitis C virus infection among persons born during 1945-1965. *MMWR Recomm. Rep.* 2012, 61 (No. RR-4): 1-32. Erratum in: *MMWR Recomm Rep.* 2012, 61: 886.
13. Wasley A., Alter M.J. Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Semin Liver Dis.* 2000, 20: 1-16.

Поступила 18.12.16

Контактная информация: Соболева Наталья Васильевна,
142782, Москва, поселение Московский, поселок Института полиомиелита,
27 км Киевского шоссе, р.т. (495)841-90-12

ОБЗОРЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

О.В.Борисова¹, Е.Б.Файзулов¹, А.А.Марова¹, В.И.Кукушкин², В.В.Зверев¹

ПЕРСПЕКТИВЫ И ПРОБЛЕМЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЭФФЕКТА ГИГАНТ-СКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА В ДИАГНОСТИКЕ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, Москва; ²Институт физики твердого тела, Черноголовка

Представлены последние достижения в использовании иммунохимических методов с детекцией методом гигантского комбинационного рассеяния света (ГКР), которые могут найти применение для выявления вирусных маркеров. Как и в случае традиционных иммунохимических анализов, эти методы часто базируются на твердофазном иммунохимическом анализе «сэндвич-типа». Необходимым составляющим иммунохимических методов с ГКР-детекцией являются ГКР-активные субстраты, для создания которых в последние годы было разработано множество подходов. Несмотря на сложность достижения высокой чувствительности и специфичности при анализе многокомпонентных клинических образцов продемонстрирован ряд успешных примеров с многообещающими результатами.

Журн. микробиол., 2017, № 3, С. 106—114

Ключевые слова: диагностика вирусных инфекций, эффект гигантского комбинационного рассеяния света, ГКР-репортер, иммунохимические методы, антиген, антитело

O.V.Borisova¹, E.B.Fayzuloev¹, A.A.Marova¹, V.I.Kukushkin², V.V.Zverev¹

PROSPECTS AND PROBLEMS OF USING THE EFFECT OF SURFACE-ENHANCED RAMAN SCATTERING IN THE DIAGNOSIS OF VIRAL INFECTIONS

¹Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow; ²Institute of Solid State Physics, Chernogolovka, Russia

This review presents the latest advances in the use of surface-enhanced Raman scattering (SERS) immunoassay, which can be used to detect viral markers. As in the case of conventional immunoassays, these methods are often based on «sandwich-type» solid phase immunoassay. In

recent years the necessary components of the immunochemical methods with SERS detection is SERS-active substrates to create a variety of approaches have been developed. Despite the difficulty of achieving high sensitivity and specificity in the analysis of clinical samples, a number of successful examples with promising results have been demonstrated.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 3, P. 106—114

Key words: diagnosis of viral infections, surface-enhanced Raman scattering, SERS reporter molecules, immunochemical techniques, antigen, antibody

Разработка быстрых, чувствительных и селективных методов выявления и идентификации патогенных вирусов, особенно в случаях, требующих неотложной медицинской помощи, остается актуальной задачей здравоохранения. Существующие на сегодняшний день экспресс тест-системы для диагностики вирусных заболеваний доступны только для выявления ограниченного количества возбудителей и основаны преимущественно на реакциях антиген-антитело с визуальной детекцией результата, таких как реакции иммунохроматографии и латекс-агглютинации. Невысокая аналитическая чувствительность этих методов не позволяет их использовать в случаях, когда маркеры инфекции присутствуют в клиническом образце в низкой концентрации, что сильно ограничивает сферу их применения. Высокочувствительное выявление возбудителя возможно с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) и полимеразной цепной реакции (ПЦР), которые однако не являются экспресс-методами и выполняются только в специально оборудованной лаборатории.

В последнее время наблюдается устойчивый интерес к разработке диагностических тестов с детекцией методом гигантского комбинационного рассеяния света (ГКР). Развитие аналитического приборостроения, включая разработку портативных ГКР-анализаторов [5], способствует развитию методов ГКР-диагностики инфекционных заболеваний, в том числе на месте оказания медицинской помощи. Детекция конкретных маркеров вирусных инфекций представлена в небольшом количестве работ, при этом далеко не все предложенные методы пригодны для выявления биомаркеров в клинических образцах, имеющих сложный состав. Вместе с тем, анализ литературы позволяет выделить подходы, основанные на ГКР-детекции результатов иммунохимического анализа, которые, на наш взгляд, могут найти применение в этиологической диагностике вирусных инфекций.

Эффект гигантского комбинационного рассеяния света. Явление неупругого (рамановского или, как его называют в русскоязычной литературе, комбинационного) рассеяния (сокращенно КР) света заключается в том, что при взаимодействии лазерного излучения фиксированной частоты ω_L с веществом происходят процессы рассеяния света, которые сопровождаются рождением в этом веществе различных мод колебательных или вращательных возбуждений с характерными частотами Ω_i , что приводит к появлению новых линий в спектре рассеянного света, которые сдвинуты от лазерной линии ω_L на частоты $+\Omega_i$ (антистоксовская компонента) и $-\Omega_i$ (стоксовская компонента). Из набора возбужденных состояний Ω_i , измеренного по спектру рассеянного света, можно однозначно сделать заключение о природе молекул, из которых состоит исследуемое вещество. Этот факт и обеспечивает ценность метода комбинационного рассеяния света. Однако вероятность процесса КР (отношение числа фотонов, испытавших рассеяние, к числу налетающих фотонов) чрезвычайно мала. Именно поэтому детектирование спектров КР от малого

количества анализируемых молекул является очень трудной задачей. Однако после открытия явления гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) света [8] появилась возможность экспресс-детектирования следового количества биологических молекул [27, 32], осажденных на наноструктурированные металлические подложки. Высокая чувствительность ГКР-методов достигается за счет резонансного усиления электромагнитного поля вблизи поверхности нано-островковых металлических пленок. Согласно современным представлениям, эффект ГКР объясняется комбинацией причин, среди которых доминирующим является электродинамический вклад, связанный с гигантским увеличением локального электрического поля вблизи острых краев шероховатой поверхности металла.

Общие схемы ГКР-иммуноанализа белковых молекул. Методы выявления биомакромолекул с применением принципов ГКР часто базируются на твердофазном иммунохимическом анализе «сэндвич-типа», включающем иммобилизацию антител для иммунного захвата на твердой фазе, инкубацию с исследуемым образцом и детектирующими антителами и отделение от несвязавшихся детектирующих антител [12, 21, 26, 30, 34]. Детектирующие антитела связаны с ГКР-репортером, позволяющим произвести индикацию сигнала. Также может использоваться схема, соответствующая «половинке сэндвича» и реализующая иммунный захват антигена [15].

Мультиплексные иммунохимические методы, в которых одновременно выявляются несколько биомаркеров, обладают такими преимуществами, как высокая пропускная способность, малые объемы анализируемых образцов, относительно низкая цена исследования. Рамановские полосы обычно в 10 — 100 раз уже, чем большинство флуоресцентных, что минимизирует возможное перекрывание спектров различных репортеров в выбранном спектральном диапазоне. Спектральное положение рамановских линий не зависит от длины волны возбуждающего излучения, взаимодействующего с молекулой, что делает возможным использовать один и тот же источник лазерного излучения для различных репортерных молекул. Эти особенности делают ГКР-спектроскопию наиболее совместимой с концепцией мультиплексности по сравнению с другими спектроскопическими методами. Для мультиплексного анализа решающее значение имеет подбор спектрально отличающихся репортерных молекул, а также оптимизация их концентрации.

Заслуживает внимания использование пористых мембран для выделения иммунного комплекса и последующей его индикации, в том числе мембран, полученных методом ионно-трековой технологии с нанесенным на их поверхность тонким слоем золота. Проведение иммунохимического анализа базируется как на полном «сэндвич-методе», так и на концентрировании и выделении на поверхности пористой мембраны иммунных комплексов детектируемых антигенов с золотыми наночастицами, одновременно модифицированными антителами к выявляемому аналиту и ГКР-репортером. Применение пористых трековых мембран позволяет повысить чувствительность анализа при уменьшении времени проведения анализа по сравнению с ИФА [26, 30]. Дополнительным преимуществом пористых мембран является возможность использования простых устройств для активного транспорта анализируемого образца и реагентов [26].

Распространенным способом сепарации иммунных комплексов и несвязавшихся детектирующих антител является применение принципов иммуномагнитной сепарации. Проведение реакции антиген-антитело во взвешенном состоянии с применением сенсibiliзованных антителами магнитных микрочастиц позволяет не только обеспечить эффективную сепарацию, но и ускорить реакцию.

Типы субстратов для иммунохимического ГКР-анализа. Необходимым составляющим иммунохимического метода с ГКР-детекцией является ГКР-активный субстрат, обеспечивающий не только высокую чувствительность анализа, но и сепарацию иммунных комплексов. Используемые ГКР-активные субстраты могут использоваться в различных формах: в виде пластинок с комбинацией диэлектрических и металлических слоев (ГКР-подложки); димеризованные наночастицы; наночастицы строения «ядро-оболочка»; трехмерные наночастицы; наноструктуры, полученные с помощью литографии [1, 23]. У всех ГКР-активных субстратов наружный слой представлен наноструктурами благородных металлов, преимущественно серебра (Ag) и золота (Au) (наносферы, нанокубы, треугольные и шестиугольные нанопирамиды, нанопроволоки, частицы грибовидной формы) [3, 16, 23, 36] и т.д. ГКР-подложки изготавливаются в виде непористых и пористых субстратов на основе кремния (Si), стекла, поликарбоната и других материалов. Зачастую кроме наружного металлического наноструктурированного слоя при изготовлении ГКР-подложек используются диэлектрические спейсеры, диэлектрические свойства которых играют важную роль в плазмонном резонансе.

Плазмонные и ГКР-свойства золота и серебра сильно зависят от формы, размера, состава частиц и их диэлектрического окружения. С точки зрения сенсорной чувствительности важно, чтобы мнимая часть диэлектрической проницаемости, которая отвечает за потери в среде, была минимальной. Среди всех металлов в оптическом диапазоне наилучшими характеристиками обладает серебро, на втором месте идет золото. Однако субстраты на основе наноструктурированного серебра очень нестабильны, поэтому на практике широкое применение получили более устойчивые золотые или специально приготовленные стабилизированные серебряные субстраты [10, 24].

В ГКР-иммуноанализе широкое применение получили золотые наносферы, меченные ГКР-репортерами и ковалентно связанные с антителами к выявляемому антигену. После образования иммунного комплекса и отмывки от несвязавшихся компонентов, при облучении лазером образующийся иммунный комплекс детектируется ГКР-анализатором [31]. В качестве ГКР-репортеров часто используют флуоресцентные красители, такие как Cy5, R6G, FITC, а также 4-меркаптобензойная кислота, пиридин, 5,5'-дитиобис(2-нитробензойная кислота), 4,4'-дипиридил, толуидиновый голубой, малахитовый зеленый [2, 4, 9, 22, 24, 29].

Важное значение имеют работы по увеличению стабильности не только серебряных, но и золотых наночастиц. Широко распространенным методом стало изготовление наночастиц по принципу «core/shell» («ядро/оболочка») — покрытие Ag-наночастиц защитным слоем различного происхождения, например, золота или оксида кремния, к которому привязаны антитела и ГКР-репортеры [34]. Такого рода биметаллические Ag+Au или комбинированные Ag+Au+Si субстраты сочетают высокий коэффициент усиления сигнала, присущий серебряным субстратам, с высокой стабильностью [16, 36, 37]. Так, в работе Khaywah M. Y. et al. «core/shell» наночастицы Au–Ag/Au сохраняли высокий коэффициент усиления даже через год хранения при комнатной температуре [14].

Все чаще при конструировании ГКР-биосенсоров используют магнитные частицы. Существенное преимущество таким субстратам дают суперпарамагнитные свойства оксида железа, входящего в состав ядра микрочастиц, что позволяет легко собрать их магнитом, обеспечивая процессы сепарации и отмывки. Оболочка в суперпарамагнитных частицах может быть золотой, конъюгированной с антителами, реже с антигенами [29], либо в системе детекции

применяется два типа частиц, сенсibilизированных антителами — магнитные и золотые, меченные ГКР-репортером [2, 4, 9].

В последних работах часто используют частицы с более сложным строением. Так, были описаны трехслойные частицы с серебряным ядром и двуслойной оболочкой: внутренний слой SiO_2 и наружный слой Ag [19]. Другим примером трехслойных частиц являются «золотые звезды». Ядром в таких частицах выступают золотые наночастицы в форме звезды, внутренняя оболочка представляет собой ГКР-репортер, а наружная — еще один слой Au [Yang T. et al., 2016]. Еще одним сложным субстратом являются «золотые наноагрегаты», полученные путем контролируемой агрегации золотых наночастиц, инкапсулированных вместе с ГКР-репортерами в оболочку из оксида кремния [18]. Все эти работы имеют целью повышение чувствительности теста и/или стабильности ГКР-субстратов.

ГКР-детекция вирусов по «молекулярным отпечаткам пальцев». В научной литературе представлен ряд работ по ГКР-детекции вирусов в образцах без применения ГКР-репортеров («label-free») — по «молекулярным отпечаткам пальцев», то есть характерным линиям рамановского спектра. Интерпретация получаемых рамановских спектров чистых химических соединений проводится с помощью программного обеспечения ГКР-анализатора путем сличения получаемого спектра с библиотекой спектров разных соединений. Однако ГКР-идентификация даже чистых культур микроорганизмов представляет особую проблему ввиду сложности химического состава их поверхностных элементов и требует применения сложных алгоритмов хемометрического анализа.

В ряде работ описывается ГКР-детекция вирусов без иммунного захвата. В одном исследовании применялись ГКР-активные поверхности на основе наночастиц золота для обнаружения и распознавания препаратов семи видов вирусов млекопитающих [7]. Используя высокоочищенные концентрированные препараты вирусов (от 8 до 9 lg БОЕ/мл), авторам не только удалось обнаружить достоверные различия в спектрах оболочечных и безоболочечных вирусов, но и дифференцировать ГКР-спектры разных вирусов. Во второй работе [6] были проанализированы ГКР-спектры восьми штаммов ротавирусов, относящихся к разным G/P генотипам, и с 96% надежностью выявлены различия между ними. Ротавирусы перед ГКР-анализом размножали в клетках MA-104 и исследовали в виде клеточных лизатов. Прикладное значение подобных работ остается под вопросом, однако они демонстрируют принципиальную возможность выявлять видовые и штаммовые различия между вирусами путем хемометрического анализа получаемых ГКР-спектров.

Применение иммунного захвата с последующим ГКР-анализом по «молекулярным отпечаткам пальцев» позволяет работать с неочищенными препаратами вируса, поскольку перед измерением имеется возможность удалить несвязавшиеся компоненты путем отмывки. Примером использования иммунного захвата антигена с последующей детекцией по характерным ГКР-спектрам, или так называемым «молекулярным отпечаткам пальцев», является работа по выявлению вирусоподобных частиц ВИЧ [15]. В работе продемонстрирована линейная зависимость интенсивности рамановских пиков от логарифма концентрации антигена.

В немногочисленных работах по ГКР-детекции вирусов по «молекулярным отпечаткам пальцев» (безметочная технология) ГКР-спектры для вирусов были получены с использованием концентрированных препаратов коллекционных штаммов вирусов, вирусоподобных частиц, либо лизатов зараженных вирусом клеточных культур. В них не представлены данные по идентификации

вирусов в составе клинических образцов или в смеси двух и более разных вирусов, что, вероятно, связано с высоким уровнем «паразитного» сигнала. Очевидно, что такие результаты не демонстрируют каких-то преимуществ «label-free» ГКР-детекции перед стандартными методами выявления вирусов.

Интересно, что больший прогресс достигнут в работах по безметочной ГКР-идентификации разных видов патогенных бактерий [Wu H. et al., 2015]. Однако и в области диагностики бактериальных инфекций прорыва пока нет, поскольку большинство работ предусматривает длительный этап выделения чистых культур бактерий.

Выявление вирусных маркеров в иммуноанализе с применением ГКР-репортеров. Одна из первых работ по иммунохимической ГКР-детекции вирусов посвящена выявлению маркера гепатита В — Hbs-антигена [33]. Твердофазный ГКР-иммуноанализ проводился на силиконовом или кварцевом субстрате с ковалентно иммобилизованными на его поверхности поликлональными антителами к Hbs-антигену. После инкубации с образцами, содержащими Hbs-антиген в различной концентрации, и последующей отмывки иммуночипа проводилась вторая инкубация с золотыми наночастицами, модифицированными 4-меркаптобензойной кислотой и мышинными моноклональными антителами к Hbs-антигену. После химического покрытия золотых наночастиц слоем серебра проводилось измерение ГКР-спектров 4-меркаптобензойной кислоты. По калибровочному графику зависимости интенсивности сигнала при 1585 см^{-1} от концентрации был определен предел обнаружения Hbs-антигена, который составил $0,5\text{ нг/мл}$. Общая продолжительность анализа была более 4 часов, однако авторы статьи не проводили оптимизацию метода.

Более высокая чувствительность выявления Hbs-антигена в плазме была достигнута с использованием ряда технических решений. В работе использованы не только золотые модифицированные наночастицы, но и ГКР-активный стабильный субстрат, ранее разработанный авторами [12]. Детектирующие антитела и ГКР-репортер (основной фуксин) были ковалентно иммобилизованы на поверхности золотых «наноцветов», состоящих из золотых наночастиц. Проведение анализа в микрожидкостном устройстве также повышало эффективность иммунохимической реакции и приводило к улучшению функциональных характеристик метода. Разработанный метод позволил проводить количественное определение Hbs-антигена в низких концентрациях с пределом обнаружения $0,01\text{ МЕ/мл}$, что соответствует чувствительности коммерческих иммуноферментных наборов реагентов.

Описан метод выявления нуклеопротеина вируса гриппа на оригинальном ГКР-субстрате, представляющем собой последовательные слои серебра и золота на оксидах индия и олова [13]. Специфичность выявления вирусного белка определяли золотые наночастицы 25 нм , модифицированные ГКР-репортером ТВВТ (4,4'-тиобисбензентиол) и антителами. Метод с использованием двухслойного субстрата показал четырехкратное усиление по сравнению с однослойным золотым покрытием. Однако следует отметить, что схема проведения анализа выявления нуклеопротеина вируса гриппа А соответствовала прямому иммунохимическому анализу, в котором выявляемый антиген в разных концентрациях ковалентно присоединялся к субстрату. Такой метод непригоден для детекции антигенов в реальных биологических образцах, имеющих сложный белковый состав.

Такой же недостаток присущ методу, предложенному для субтипирования вируса гриппа. ГКР-иммуноанализ включал иммобилизацию выявляемого

антигена на твердой фазе, которой служила нитроцеллюлозная мембрана [18]. После нанесения антигена мембрану инкубировали в суспензии золотых наночастиц, конъюгированных с ГКР-репортером и типоспецифическими антителами к H1N1, H3N2 или H5N1. Авторы заявляют о более высокой чувствительности ГКР-детекции вируса в сравнении с иммуноферментным анализом (30 нг/мл против 1 мкг/мл), проводившимся по аналогичной схеме.

На модели вируса животных (цирковирус свиней 2 типа) изучена эффективность ГКР-иммуноанализа с использованием разветвленных золотых наночастиц, меченных р-меркаптобензойной кислотой и ковалентно связанных с моноклональными антителами к капсидному белку вируса [20]. Предел чувствительности выявления цирковиральных вирионов составил 8×10^2 копий/мл, а в опытах на клинических образцах наблюдался удовлетворительный уровень совпадения с результатами ПЦР — 75 и 87,5% для отрицательных и положительных сывороток соответственно.

Оригинальный подход для детекции респираторно-синцитиального вируса (РСВ) заключался в использовании рамановских свойств окисленной формы 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМВ) [35]. Авторы установили, что только окисленная форма ТМВ имеет выраженный рамановский спектр с максимумами при 1191 см^{-1} , 1346 см^{-1} и 1606 см^{-1} . Использовались компоненты коммерческого набора для иммуноферментного сэндвич-метода выявления РСВ, основанного на колориметрической детекции результата ферментативной реакции пероксидазы с субстратной системой, включающей ТМВ. Рамановский спектр измерялся после взаимодействия окисленной формы ТМВ с серебряными наночастицами, при этом была достигнута чувствительность в 20 раз выше, чем при колориметрической детекции.

Возможность мультиплексного выявления белков в ГКР-иммуноанализе экспериментально обоснована в ряде работ с использованием модельных антигенов — IgG мыши и человека и онкологических маркеров [17, 28]. Чувствительность выявления модельных антигенов достигала высоких значений — 1 фг/мл с возможностью количественного определения аналита. В работе J.P. Nolan et al. разработаны принципы мультиплексного ГКР-анализа на золотых наночастицах с автоматизированным учетом результатов в проточном ГКР-анализаторе, подобном проточному цитофлуориметру [25]. Одним из преимуществ проточного ГКР-анализатора является применение лишь одного лазера и детектора и потенциально более высокая степень мультиплексности, по сравнению с применением проточных цитофлуориметров. Примером применения мультиплексного ГКР-иммуноанализа вирусных антигенов служит работа J. Neng et al. Описан иммунохимический метод, основанный на ГКР-спектроскопии, для одновременной детекции двух аналитов: поверхностного антигена вируса Лихорадки Западного Нила и капсидного антигена вируса Лихорадки Долины Рифт [21]. Образование сэндвича происходило между парамагнитными частицами, модифицированными поликлональными антителами, специфичными к каждому из целевых маркеров, и золотыми наночастицами с экспонированными на их поверхности парами антитело и ГКР-репортер, также соответствующими каждому из аналитов. Количественное определение антигенов проводилось по зависимости интенсивности рамановских пиков, характерных для каждого из репортеров, от логарифма концентрации. В работе показана высокая чувствительность — предел обнаружения вирусного антигена составил ~ 5 фг/мл в фосфатном буферном растворе и ~ 25 пг/мл в растворе с бычьей сывороткой.

В последние годы в научных публикациях активно ведется поиск оптимального технического решения для создания биосенсоров, сочетающих

специфичность иммунохимического взаимодействия с высокой чувствительностью детекции методом гигантского комбинационного рассеяния света. Однако большинство работ проведено на модельных системах, а чувствительность и специфичность анализа не установлены испытаниями на реальных клинических образцах. В то же время, для традиционных иммунохимических методов, представляющих неотъемлемую часть клинической лабораторной диагностики, разработана обширная реагентная база, приобретен опыт оптимизации функциональных характеристик анализа. Для разработки новой платформы, которая сможет сравниться по своей эффективности с методами ИФА и ПЦР и обеспечит выигрыш в экспрессности и эргономичности метода, необходима опора на эту базу и совместные усилия специалистов различного профиля.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №16-15-10332).

ЛИТЕРАТУРА

1. Кукушкин В.И., Гришина Я.В., Егоров С.В., Соловьев В.В., Кукушкин И.В. Комбинированный диэлектрический и плазмонный резонанс для гигантского рассеяния света. Письма в ЖЭТФ. 2016, 8: 572-577.
2. Bao F., Yao J.L., Gu R.A. Synthesis of magnetic Fe₂O₃/Au core/shell nanoparticles for bioseparation and immunoassay based on surface-enhanced Raman spectroscopy. Langmuir. 2009, 18: 10782-10787.
3. Charles D.E., Aherne D., Gara M. et al. Versatile solution phase triangular silver nanoplates for highly sensitive plasmon resonance sensing. ACS Nano. 2010, 1: 55-64.
4. Chon H., Lee S., Son S.W. et al. Highly sensitive immunoassay of lung cancer marker carcinoembryonic antigen using surface-enhanced Raman scattering of hollow gold nanospheres. Anal. Chem. 2009, 8: 3029-3034.
5. Driscoll A.J., Harpster M.H., Johnson P.A. The development of surface-enhanced Raman scattering as a detection modality for portable in vitro diagnostics: progress and challenges. Phys. Chem. Chem. Phys. 2013, 47: 20415-20433.
6. Driskell J.D., Zhu Y., Kirkwood C.D. et al. Rapid and sensitive detection of rotavirus molecular signatures using surface enhanced Raman spectroscopy. PLoS One. 2010, 4: e10222.
7. Fan C., Hu Z., Riley L.K. et al. Detecting food- and waterborne viruses by surface-enhanced Raman spectroscopy. J. Food. Sci. 2010, 5: M302-307.
8. Fleischmann M., Hendra P.J., McQuillan A.J. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. Chemical Physics Letters. 1974, 2: 163-166.
9. He Y., Wang Y., Yang X. et al. Metal organic frameworks combining CoFe₂O₄ magnetic nanoparticles as highly efficient SERS sensing platform for ultrasensitive detection of N-terminal Pro-Brain natriuretic peptide. ACS Appl. Mater. Interfaces. 2016, 12: 7683-7690.
10. Jia K., Khaywah M.Y., Li Y. et al. Strong improvements of localized surface plasmon resonance sensitivity by using Au/Ag bimetallic nanostructures modified with polydopamine films. ACS Appl. Mater. Interfaces. 2014, 1: 219-227.
11. Jiang T., Wang X., Zhou J. et al. Hydrothermal synthesis of Ag@MSiO₂@Ag three core-shell nanoparticles and their sensitive and stable SERS properties. Nanoscale. 2016, 9: 4908-4914.
12. Kaminska A., Witkowska E., Winkler K. et al. Detection of hepatitis B virus antigen from human blood: SERS immunoassay in a microfluidic system. Biosens Bioelectron. 2015, 461-467.
13. Karnorachaia K., Sakamotoa K., Laochareonsukc R. et al. Extrinsic surface-enhanced Raman scattering detection of 1 influenza A virus enhanced by two-dimensional gold@silver core-shell nanoparticle arrays, RSC Advances. 2016, 6: 97791-97799.
14. Khaywah M.Y., Jradi S., Louarn G. et al. Ultrastable, uniform, reproducible, and highly sensitive bimetallic nanoparticles as reliable large scale SERS substrates. J. Phys. Chem. 2015, 46: 26091-26100.
15. Lee J.H., Kim B.C., Oh B.K. et al. Rapid and sensitive determination of HIV-1 virus based on surface enhanced raman spectroscopy. J. Biomed. Nanotechnol. 2015, 12: 2223-2230.

16. Lee K.E., Hesketh A.V., Kelly T.L. Chemical stability and degradation mechanisms of triangular Ag, Ag@Au, and Au nanoprisms. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2014, 24: 12407-12414.
17. Li M., Kang J.W., Sukumar S. et al. Multiplexed detection of serological cancer markers with plasmon-enhanced Raman spectro-immunoassay. *Chem. Sci.* 2015, 7: 3906-3914.
18. Lin Y.J., Wu C.Y., Li T. et al. A rapid and sensitive early diagnosis of influenza virus subtype via surface enhanced Raman scattering. *J. Biosens Bioelectron.* 2014, 5: 150.
19. Lin H.Y., Huang C.H., Hsieh W.H. et al. On-line SERS detection of single bacterium using novel SERS nanoprobes and a microfluidic dielectrophoresis device. *Small.* 2014, 22: 4700-4710.
20. Luo Zh., Li W., Lu D. et al. A SERS-based immunoassay for porcine circovirus type 2 using multi-branched gold nanoparticles. *Microchim. Acta.* 2013, 180: 1501-1507.
21. Neng J., Harpster M.H., Wilson W.C. et al. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) detection of multiple viral antigens using magnetic capture of SERS-active nanoparticles. *Biosens Bioelectron.* 2013, 41: 316-321.
22. Neng J., Harpster M.H., Zhang H. et al. A versatile SERS-based immunoassay for immunoglobulin detection using antigen-coated gold nanoparticles and malachite green-conjugated protein A/G. *Biosens Bioelectron.* 2010, 3: 1009-1015.
23. Netzer N.L., Qiu C., Zhang Y. et al. Gold-silver bimetallic porous nanowires for surface-enhanced Raman scattering. *Chem. Commun. (Camb).* 2011, 34: 9606-9608.
24. Nie S., Emory S.R. Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering. *Science.* 1997, 5303: 1102-1106.
25. Nolan J.P., Duggan E., Liu E. et al. Single cell analysis using surface enhanced Raman scattering (SERS) tags. *Methods.* 2012, 3: 272-279.
26. Penn M.A., Drake D.M., Driskell J.D. Accelerated surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS)-based immunoassay on a gold-plated membrane. *Anal. Chem.* 2013, 18: 8609-8617.
27. Sheng R. Ni F., Cotton T.M. Determination of purine bases by reversed-phase high-performance liquid chromatography using real-time surface-enhanced Raman spectroscopy. *Anal. Chem.* 1991, 5: 437-442.
28. Shin M.H., Hong W., Sa Y. et al. Multiple detection of proteins by SERS-based immunoassay with core shell magnetic gold nanoparticles. *Vib. Spectrosc.* 2014, 72: 44-49.
29. Wang J., Wu X., Wang C. et al. Facile synthesis of au-coated magnetic nanoparticles and their application in bacteria detection via a SERS method. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2016, 31: 19958-19967.
30. Wigginton R.K., Vikesland P.J. Gold-coated polycarbonate membrane filter for pathogen concentration and SERS-based detection. *Analyst.* 2010, 6: 1320-1326.
31. Wu L., Wang Z., Zong S. et al. A SERS-based immunoassay with highly increased sensitivity using gold/silver core-shell nanorods. *Biosens Bioelectron.* 2012, 1: 94-99.
32. Xu H., Bjerneld E., Kall M. et al. Spectroscopy of single hemoglobin molecules by surface enhanced raman scattering. *Phys. Rev. Lett.* 1999, 21: 4357-4360.
33. Xu S., Ji X., Xu W. et al. Immunoassay using probe-labelling immunogold nanoparticles with silver staining enhancement via surface-enhanced Raman scattering. *Analyst.* 2004, 1: 63-68.
34. Yang Y., Shi J., Kawamura G. et al. Preparation of Au-Ag, Ag-Au core-shell bimetallic nanoparticles for surface-enhanced Raman scattering. *Scripta Materialia,* 2008, 58: 862-865.
35. Zhan L., Zhen S.J., Wan X.Y. et al. A sensitive surface-enhanced Raman scattering enzyme-catalyzed immunoassay of respiratory syncytial virus. *Talanta.* 2016, 148: 308-312.
36. Zhang C., Jiang S.Z., Yang C. et al. Gold@silver bimetal nanoparticles/pyramidal silicon 3D substrate with high reproducibility for high-performance SERS. *Sci. Rep.* 2016, 6: 25243.
37. Zhang X. Du X. Carbon nanodot-decorated Ag@SiO₂ nanoparticles for fluorescence and surface-enhanced raman scattering immunoassays. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2016, 1: 1033-1040.

Поступила 25.11.16

Контактная информация: Борисова Ольга Васильевна, к.х.н.,
115088, Москва, 1-я Дубровская ул., 15, р.т.(495) 674-54-97

*М.Н.Копицына¹, А.С.Морозов^{1,2}, И.В.Бессонов^{1,2},
В.М.Писарев³, Е.С.Лобакова², О.В.Бухарин⁴*

ЛИГАНДЫ ДЛЯ СЕЛЕКТИВНОГО УДАЛЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

¹АО Перспективные медицинские технологии, Москва; ²Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова; ³НИИ общей реаниматологии им. В.А.Неговского, Москва; ⁴Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, Оренбург

Бактериальные липополисахариды (ЛПС) — высокотоксичные молекулы, выделяющиеся при лизисе бактериальных клеток. Они играют ключевую роль в патогенезе сепсиса, а также могут контаминировать лекарственные препараты, поэтому их удаление из водных растворов и биологических жидкостей — крайне важная задача. В настоящем обзоре рассмотрена структура ЛПС, его токсичность для различных животных, а также различные низко- и высокомолекулярные лиганды, пригодные для эффективного связывания и удаления ЛПС из растворов. Основное внимание уделено взаимосвязи химического строения лиганда с его способностью образовывать прочные комплексы с ЛПС и принципам создания селективных лигандов для депирогенизации фармацевтических субстанций и создания гемосорбционных колонок для терапии сепсиса.

Журн. микробиол., 2017, № 3, С. 115—126

Ключевые слова: липополисахарид, бактериальный эндотоксин, сепсис, гемосорбция, депирогенизация, селективный сорбент

*M.N.Kopitsyna¹, A.S.Morozov^{1,2}, I.V.Bessonov^{1,2},
V.M.Pisarev³, E.S.Lobakova², O.V.Bukharin⁴*

LIGANDS FOR SELECTIVE REMOVAL OF LIPOPOLYSACCHARIDES FROM GRAM NEGATIVE BACTERIA

¹JSC Advanced Medical Technologies, Moscow; ²Lomonosov Moscow State University; ³V.A.Negovsky Research Institute of General Reanimatology, Moscow; ⁴Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg, Russia

Bacterial lipopolysaccharides (LPS) are highly toxic molecules released during the lysis of bacterial cells. They play important role in the pathogenesis of sepsis, and can contaminate pharmaceuticals, so removing them from aqueous solutions and biological fluids is an extremely important task. Structure of LPS and its toxicity for various animals are presented in this review. Various low- and high-molecular ligands, suitable for efficient binding and removal LPS from solutions are studied and demonstrated. The main attention is paid to the relationship between the chemical structure of the ligand and its ability to form strong complexes with LPS and the principles of creating selective ligands for the depyrogenation of pharmaceutical substances and the creation of hemoperfusion columns for the sepsis therapy.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 3, P. 115—126

Key words: lipopolysaccharide, bacterial endotoxin, sepsis, hemoperfusion, depyrogenation, selective sorbent

Липополисахарид (ЛПС) грамотрицательных бактерий — фрагмент наружной мембраны клеточной стенки, является бактериальным эндотоксином (БЭ) — антигеном системы врожденного иммунитета млекопитающих [16, 24]. Хотя сам ЛПС химически инертен, при попадании в кровеносную систему при генерализованной бактериальной инфекции, он связывается с рецепторами и клетками

иммунной системы, регулирующими воспалительный ответ. При этом происходит избыточный выброс медиаторов воспаления (цитокинов), и развивается слишком сильный системный воспалительный ответ, характеризующийся повреждением эндотелия кровеносных сосудов, коагулопатией, гипоперфузией тканей, сердечно-сосудистой недостаточностью, полиорганной дисфункцией. Именно эта последовательность событий сегодня признается ключевым звеном патогенеза сепсиса, грозного осложнения бактериальных инфекций, ежегодно уносящего сотни тысяч жизней [9].

Химическое строение ЛПС придает им свойства поверхностно-активных веществ, поэтому в водных растворах и в биологических жидкостях, в частности, в крови, равновесие сдвинуто в сторону образования супрамолекулярных структур переменного состава и строения, в состав которых могут также входить белки плазмы крови и ионы металлов [32, 42]. В то же время, физиологической активностью ЛПС обладают в ничтожно низких концентрациях порядка 10^{-9} г/кг [42]. Эффективным методом, позволяющим добиться снижения их концентрации ниже физиологически значимых величин, является применение аффинных сорбентов на основе иммобилизованных лигандов, специфичных к ЛПС. При этом константа образования комплекса с иммобилизованным лигандом должна быть достаточно высока ($\sim 10^6 - 10^9$) [12]. Это позволяет сдвинуть равновесие сорбционного процесса в сторону образования иммобилизованных комплексов ЛПС с лигандом. Важно отметить, что неселективные сорбенты с развитой поверхностью, способные эффективно удалять малые молекулы, такие как активированный уголь, алюмосиликаты, полисахаридные гели и другие, зачастую не позволяют снизить концентрацию ЛПС до приемлемого уровня [31].

Экстракорпоральные методы детоксикации, направленные на извлечение из крови пациента БЭ, при своевременном применении обладают клинически доказанной эффективностью при лечении сепсиса и септического шока [3, 14]. Наиболее перспективной разновидностью экстракорпоральной детоксикации являются селективная ЛПС-гемосорбция. Ее принцип заключается в избирательном связывании (и направленном удалении) БЭ, первичного звена патогенеза сепсиса. Существуют также гемосорбенты, способные удалять одновременно как БЭ, так и эндогенные медиаторы воспаления — цитокины («мультимодальные» гемосорбенты) [3].

Другой важной задачей, решаемой с помощью подобных сорбентов, может стать проблема «депирогенизации» (удаления «пирогенных» примесей — чаще всего это те же самые ЛПС) лекарственных препаратов. Особенно остро эта проблема стоит для лекарств, получаемых биотехнологическим путем, продуцентами которых являются грамотрицательные бактерии. Универсального способа решения этой проблемы пока не найдено, но есть отдельные сообщения об эффективных идеях [2].

Для рационального дизайна таких умных материалов, избирательно поглощающих ЛПС из физиологических жидкостей, требуется глубокое понимание механизма связывания ЛПС с их лигандами. О принципах строения таких лигандов и пойдет речь в данном обзоре

1. Структура и свойства бактериальных эндотоксинов. БЭ являются неотъемлемой частью внешней мембраны грамотрицательных бактерий, они также участвуют в стабилизации клеточной стенки бактерий [26, 27]. Общая химическая структура ЛПС у большинства бактерий сходная. ЛПС содержит полярный гетерополисахаридный фрагмент (О-антиген), внутренний олигосахаридный и липидный (липид А) фрагменты [36, 50].

Фрагмент О-антигена состоит из повторяющихся сахаридных фрагментов и присутствует в эндотоксинах не всех грамотрицательных бактерий [26], в частности некоторые бактерии из рода *Neisseria* продуцируют ЛПС без О-антигенного фрагмента, при этом биологическая функция БЭ сохраняется [10]. В отличие от внутреннего полисахаридного фрагмента в О-антигене довольно часто присутствуют деоксисахара, при этом встречаются как линейные, так и сильно развет-

вленные полисахаридные фрагменты, функционолизированные различными агликонами, такими, как ацетилфосфат, фосфорилэтанолламин, формил, ацетамид, и аминокислотными остатками [6, 20]. В целом, О-антиген является наименее консервативным участком бактериальных ЛПС.

Внутренняя часть олигосахаридного фрагмента более консервативна и содержит семиуглеродные сахара гептозы (Hep) и, как минимум, один остаток 3-дезоксид-Д-манно-окт-2-улозоновой кислоты (Kdo). Фрагмент Kdo редко встречается в других гликанах, это означает, что его можно рассматривать в качестве маркера присутствия ЛПС [44]. Стоит отметить, что у некоторых жизнеспособных штаммов бактерий отсутствует как О-антиген, так и большая часть внутреннего олигосахарида, но фрагмент Kdo необходим для жизнеспособности бактерий. Если рассматривать содержание семиуглеродных сахаров, к примеру, в бактериях вида *Escherichia coli* и в других энтеробактериях, в зависимости от конкретного вида может быть два или три остатка D-глицеро- α -D-манно-гептопиранозы и L-глицеро- α -D-манно-гептопиранозы.

Внутренний олигосахаридный фрагмент можно условно разделить на внутреннюю и внешнюю часть. Внешняя часть, также как и О-антиген, может сильно различаться у разных видов бактерий, и преимущественно содержит в своем составе остатки типичных шестиуглеродных сахаров, таких как глюкоза (Glc), глюкозамин (GlcN), ацетилглюкозамин (GlcNAc), в количестве от 8 до 12 сахаридных фрагментов. Эти сахара нередко модифицированы фосфатными, пирофосфатными и фосфорилэтанолламинными группами в 1 и 4 положениях [26].

Липид А — наиболее консервативная часть молекулы ЛПС, представляющая собой уникальный фосфорилированный гликолипид [49]. Все липиды А содержат D-глюкозоаминные остатки (или 2,3-диамино-2,3-дидезокси-D-глюкозу), которые присутствуют в виде β -(1 \rightarrow 6) связанных димеров. Другими характерными особенностями липида А является наличие фосфатов в 1 и 4' положениях и (R)-

Токсичность БЭ для различных видов животных

Вид животного	ЛД ₅₀ , мг/кг	Продуцент БЭ, способ введения	Ссылка
Крупный рогатый скот	0,025 ¹	<i>E. coli</i> O78	[8]
Собаки	0,125—0,5 ²	<i>E. coli</i>	[38]
	4 ¹	<i>E. coli</i> O78	[8]
Кролики	3 ¹	<i>E. coli</i> O78	[8]
	>5	<i>Salmonella</i> spp.	[23]
	0,5 ²	<i>Salmonella</i> spp.	[23]
Свиньи	5 ¹	<i>E. coli</i> O78	[8]
	0,092 ³	<i>S. abortus equi</i>	[23]
	1 ⁴	<i>S. abortus equi</i>	[23]
Морские свинки	10 ¹	<i>E. coli</i> O78	[8]
Крысы	13—24,8	<i>E. coli</i> O128:B12	[11]
	20—60 ¹	<i>E. coli</i> O78	[8]
Мыши	0,25—0,40 мг/мышь	<i>S. typhimurium</i> Lt ₂	[23]
	0,38—0,43 мг/мышь	<i>S. typhimurium</i> Lt ₂	[23]
	0,34—0,36 мг/мышь ²	<i>S. typhimurium</i> rouB (R ₁₁)	[23]
	0,42—0,50 мг/мышь ²	<i>S. typhimurium</i> rouB (R ₁₁)	[23]
	25—60 ¹	<i>E. coli</i> O78	[8]
Кошки	15 ¹	<i>E. coli</i> O78	[8]
Макаки-резус	>25	<i>E. coli</i> , <i>S. typhosa</i>	[41]
Цыплята	>50	<i>E. coli</i> O78	[8]
Лягушки	>100	<i>E. coli</i> O78	[8]
Ящерицы	>200	<i>E. coli</i> O128:B12	[17]
Рыбы (капп)	>200	<i>E. coli</i> O78	[17]

Примечание. ¹Приведено значение летальной дозы, вероятно, имеется в виду ЛД₁₀₀; ²в. в способ введения; ³рассчитано методом пробит-анализа по данным из статьи; ⁴ЛД₁₀₀.

3-гидрокси-жирных кислот в 2, 2', 3 и 3'-положениях сахаров, связанных амидными или же эфирными связями.

В зависимости от строения гексоаминов, степени фосфорилирования, присутствия заместителей в фосфатной группе, а также длины цепи и строения жирных кислот молекулы липида А могут различаться между собой для различных видов бактерий и даже для одного штамма при определенных условиях [37].

Наиболее изученная структура липида А *E. coli* содержит две фосфатные группы и шесть остатков жирных кислот (C12:0 и C14:0). Однако в особых условиях под действием ферментов фосфатные группы могут быть этерифицированы этаноламином, 4-амино-4-дезоксид-*L*-арабинозой или пальмитиновым спиртом [35]. В структуре липида А бактерии *Rhizobium etli* присутствует остаток длинноцепочечной жирной кислоты (C28:0) в положении 2', но отсутствуют фосфатные группы. В структуре липида А *Francisella tularensis* есть только одна фосфатная группа и четыре остатка жирных кислот (C16:0, C18:0). В липиде А *Salmonella typhimurium* имеется дополнительный остаток жирной кислоты в положении 2 (C16:0). Дополнительные к основному остову углеводные фрагменты были также обнаружены в составе липида А таких бактерий, как, например, *F. tularensis*, *S. typhimurium* и *R. etli*.

Таким образом, молекула ЛПС заряжена отрицательно (pK_a 1,3 [30]) при наличии фосфатных групп в липиде А и внутреннем сахаридном фрагменте и имеет как гидрофильные (О-антиген, так и гидрофобные (жирные кислоты в липиде А) участки. Молекулярная масса ЛПС варьируется в широких пределах от 2,5 кДа (в случае отсутствия О-антигена) до 70 кДа (очень большой О-антиген), обычно — от 10 до 20 кДа [10]. Молекула ЛПС является очень гибкой, значительно более гибкой, чем глобулярные белки [19].

Другой отличительной особенностью ЛПС является способность образовывать прочные супрамолекулярные структуры под действием гидрофобных взаимодействий между остатками жирных кислот и образований мостиков между фосфатными группами и двувалентными катионами, в частности, Ca^{2+} и Mg^{2+} [10].

2. *Токсичность бактериальных эндотоксинов.* Хотя БЭ прочно связаны с клеточной стенкой бактерий, они могут высвободиться в окружающую среду не только при гибели клеток, но и во время их роста и деления [22], при этом одна бактериальная клетка может содержать приблизительно 2 миллиона молекул ЛПС [49]. Поэтому БЭ обнаруживаются во всех средах, где обнаруживаются грамотрицательные бактерии. Особенно высокие концентрации БЭ наблюдаются при массовой гибели бактерий в очаге инфекции и в средах биотехнологических производств [10].

Остро стоит проблема очистки фармацевтических препаратов, предназначенных для парентерального введения [26]. Безопасным считается введение БЭ в дозе не более 5 ЕЭ/кг/ч (1 ЕЭ=100 пг БЭ) [1]. Наиболее часто БЭ могут содержаться в рекомбинантных белках, получаемых генно-инженерным путем, ведь продуцентом зачастую являются грамотрицательные бактерии. Очистка таких препаратов — важная и зачастую не простая задача [26].

БЭ весьма токсичны при попадании в кровь, причем разные виды животных имеют не одинаковую чувствительность к БЭ (табл.; данные ЛД₅₀ приведены для интраперитонеального введения вещества, если не сказано отдельно).

Исходя из данных, представленных в табл., можно сделать вывод, что разные животные имеют различную чувствительность к БЭ. Рыбы, пресмыкающиеся, земноводные, цыплята и макаки не погибают даже при введении очень высоких доз БЭ, хотя у цыплят и макак отмечаются симптомы заболевания. Мыши, крысы, морские свинки, свиньи, кролики и собаки имеют умеренную восприимчивость к ЛПС, в то же время, для крупного рогатого скота БЭ является чрезвычайно токсичным веществом со смертельной дозой 0,025 мг/кг. Также следует отметить, что для собак при в/в введении смертельная доза на порядок ниже, чем при интраперитонеальном.

Наиболее частыми симптомами при отравлении БЭ у животных являются лихорадка, диарея, малоподвижность, тахикардия, учащенное дыхание, цианоз. Для кошек также наблюдалось агрессивное поведение и рвота через 1 — 2 ч после введения ЛПС. У кошек и собак развивался понос с кровью, у мышей — паралич. У различных животных также наблюдались отеки и геморрагии в сочетании с шоковым состоянием. У восприимчивых к БЭ животных наибольшие изменения отмечены в желудочно-кишечном тракте. У крыс и собак кровотечения отмечаются преимущественно в лимфатической системе, а также в тимусе и бляшках Пейера. У собак иногда наблюдаются кровотечения в селезенке. У свиней и кошек кровотечения возникают в эпикарде и эндокарде, также иногда отмечается отек легких [8].

Для человека БЭ представляют не меньшую опасность. Так, введение БЭ в дозе 0,0025 мкг/кг вызывает повышение температуры [39]. В больших дозах (от 0,02 до 0,04 мкг/кг) отмечается заметный токсический эффект, во многом напоминающий клинику септического шока [46]. Описан клинический случай в/в введения БЭ (*E. coli* O127:B8) в дозе 2 мкг. После введения отмечалась лихорадка, озноб, понижение АД, что потребовало лечения в отделении интенсивной терапии в течение 8 ч [40].

БЭ играют непосредственную роль в развитии клинической картины тяжело-го сепсиса и септического шока [45]. Поэтому на удалении БЭ основаны современные высокоэффективные методы терапии сепсиса [4].

3. *Создание селективных лигандов для удаления бактериальных эндотоксинов.* Из-за вариативности химических структур БЭ, выражающихся в различных модификациях О-антигена и внутреннего олигосахарида, лиганд должен характеризоваться максимальным связыванием с самой консервативной частью БЭ — липидом А. Применение специально подобранных лигандов для создания гемосорбентов позволяет проводить селективное удаление токсикантов (БЭ) из крови и различных растворов.

Как было сказано выше, липид А, а также внутренний олигосахаридный фрагмент, входящие в состав БЭ, фосфорилированы, чем обусловлен отрицательный заряд БЭ при обычных условиях (pK_a 1.3) [6, 19]. Можно предположить, что для лучшего связывания эндотоксина необходим лиганд, обладающий положительным зарядом, носителем которого обычно выступают положительно заряженные протонированные аминогруппы. Ниже приведен подробный анализ молекул, используемых для удаления БЭ.

3.1 *Полимиксин В.* Полимиксин В — это своеобразный «золотой стандарт» среди лигандов, взаимодействующих с ЛПС. В структуре полимиксинов можно выделить гидрофобную область, состоящую из остатков жирных кислот и аминокислот, а также полярную часть, несущую положительный заряд [16, 28]. Полимиксин В используется в колонках ToxapuxinTM в качестве лиганда для удаления ЛПС [13, 43].

Бактерицидная активность полимиксина В в отношении грамотрицательных бактерий обусловлена его способностью встраиваться и разрушать клеточную стенку бактерий, взаимодействуя с ЛПС. Изучению взаимодействия полимиксина В с БЭ посвящено много работ [5, 18, 34].

Mares J. et al. проводили изучение структуры комплекса, образующегося в результате взаимодействия нескольких типов полимиксинов с ЛПС [28]. Методами ЯМР-спектроскопии было показано, что амидные фрагменты пептидного макроцикла образуют связи с фосфатной группой GlcN-В в липиде-А. Гидрофобные фрагменты D-Phe and Leu оказываются в непосредственной близости от жирно-кислотных остатков ЛПС, при этом Leu дополнительно связывается с фрагментом GlcN-В. Аминогруппы из Dab вступают в электростатические взаимодействия с фосфатным фрагментом GlcN-А, а также с карбоксильной группой в Kdo-С. Таким образом, комплекс ЛПС-полимиксин В возникает за счет связывания с фрагментом GlcN-В, соседних с ними атомов из GlcN-А, и функциональ-

ными группами в Kdo-C. Структура этого комплекса подтверждается данными химических сдвигов и межмолекулярным ядерным эффектом Оверхаузера [43].

Многие научные группы проводили аналогичные эксперименты по определению взаимодействия полимиксина В с ЛПС. Так, было показано, что связывание происходит благодаря взаимодействию гидрофобной части пептида в полимиксине В с липидом А [47, 48], однако кинетика связывания такого комплекса достаточно медленная, и время контакта, необходимое для реакции, составило 16 часов при экспериментах в статичных режимах.

Несмотря на чрезвычайно высокие показатели по адсорбции БЭ, сорбенты на основе полимиксина В обладают рядом существенных недостатков. Основная проблема — нейротоксичность и нефротоксичность полимиксина В в случае смывания с полимерной матрицы [15, 33]. Также при пропускании растворов через колонки с полимиксином В наблюдалась существенная адсорбция белков, таких как бычья каталаза (24%) [21] и бычий сывороточный альбумин (20%) [7]. Удержание белков на колонке с полимиксином В обусловлено электростатическим взаимодействием между положительно заряженным лигандом и отрицательно заряженными белками при низкой ионной силе.

3.2 Гистамин и гистидин. Уже в 1982 г. японские ученые показали, что помимо азотистых оснований (аденина, цитозина и др.) гистидин и гистамин эффективно удаляют ЛПС из различных культур микроорганизмов [29]. По эффективности использования в качестве лигандов для извлечения БЭ гистидин и гистамин не уступают полимиксину В при очистке растворов таких белков, как альбумин, инсулин, лизоцим и миоглобин. Несмотря на то, что оба этих лиганда могут эффективно связываться с ЛПС, предпочтение было отдано гистидину, так как он не обладает такой биологической активностью, как гистамин, а потому является более безопасным.

Как и в случае с полимиксином В, при оценке эффективности адсорбции важно учитывать селективность удаления БЭ. Присутствие в растворе белков существенно влияет на способность лигандов к селективной сорбции ЛПС из-за высокой степени извлечения белковых компонентов [7, 25]. Эффективность гистидина в качестве лиганда обусловлена гидрофобными и электростатическими взаимодействиями, возникающими за счет положительного заряженного имидазольного фрагмента в молекуле, а также, заряженных аминокислот [34]. При этом опубликованы данные, подтверждающие эффективность самого диаминогексана в качестве агента для извлечения БЭ из растворов [Hou K.C. et al., 1991]. При использовании гистидина в комплексе с незаряженным спейсером на основе диоксиранов эффективного извлечения ЛПС удалось добиться только в кислой среде при $pH \leq 5,5$, когда на имидазольном кольце присутствует положительный заряд (pK имидазола 6,0).

3.3 Поликатионные лиганды. Для селективного извлечения БЭ из водных растворов, а также из плазмы крови применяются разнообразные поликатионные лиганды. Большое количество модификаций таких лигандов для связывания БЭ свидетельствует о том, что точное структурное соответствие между молекулами лиганда и БЭ не является необходимым. Главным условием для создания селективного лиганда является наличие поликатионной молекулы с гидрофобными областями [Takahashi I. et al., 1987].

Среди поликатионных лигандов наиболее популярным соединением является полиэтиленимин — разветвленный полимер весом порядка 60 кДа, содержащий в своем составе первичные, вторичные и третичные аминокислотные группы в соотношении 1:2:1. При нейтральных условиях полиэтиленимин заряжен положительно ($pK > 9$ у первичных аминокислотных групп и $pK > 0,5$ у вторичных аминокислотных групп); а БЭ в аналогичных условиях обладают отрицательным зарядом за счет фосфатных групп, входящих в состав липида А [18]. Таким образом, связывание происходит благодаря электростатическим взаимодействиям. Кроме того, после сближения молекул полиэтиленимина и БЭ за счет электростатических взаимодействий возникают дополни-

тельные силы притяжения между гидрофобными фрагментами благодаря близкому расположению последних.

Полиэтиленимин, иммобилизованный на целлюлозной подложке, был успешно протестирован при экстракорпоральном извлечении БЭ из плазмы [Mitzner S. et al., 1993]. Показано, что эффективность сорбции сравнима с действием полимиксина В, а биосовместимость таких сорбентов — выше. При извлечении ЛПС из раствора бычьего сывороточного альбумина, полиэтиленимины на целлюлозных волокнах адсорбировали БЭ эффективнее, чем соответствующие сорбенты с гистидином, и не так сильно зависели от ионной силы и рН исследуемых растворов [Morimoto S. et al., 1995]. Растворы миоглобина, γ -глобулина и цитохрома С были очищены от БЭ в циклическом режиме (эффективность — 98%, концентрация оставшегося в растворе БЭ < 0,05 нг/мл), при этом степень извлечения белка не превышала 2%.

В качестве подложки также могут применяться пористые частицы оксида циркония. Сорбенты на основе полиэтилениминов, иммобилизованных на оксиде циркония, стабильны даже в щелочных условиях и обладают достаточно высокой емкостью по эндотоксину (снижение концентрации БЭ с $5 \cdot 10^6$ ЕЭ/мл до 5 ЕЭ/мл).

Поли-L-лизин является более гидрофобным из-за наличия в структуре алкильных цепей и также успешно применяется для извлечения БЭ из растворов БСА. Его эффективность не уступает полимиксину В или гистамину и гистидину, причем селективность по отношению к белку выше [7].

Известны работы, подтверждающие, что хитозан — катионный полиэлектролит, представляющий собой линейный полисахарид, построенный из β -1,4-глюкозаминальных остатков, взаимодействует с ЛПС с образованием стабильных растворимых комплексов разного состава благодаря заряженным аминогруппам [Naberezhnykh G.A. et al., 2013].

Взаимодействие БЭ с поликатионами вероятнее всего основывается на том же принципе, что и флокуляция клеток. При флокуляции в начале образуются полианионные-поликатионные комплексы. После этого молекулы воды замещаются и образуются агрегаты больших размеров — процесс, получивший название комплексная коацервация [Xia J. et al., 1994]. Если представить, что такой же процесс происходит при взаимодействии БЭ и поликатионов, то можно предположить, что образующиеся комплексы непрерывно выделяются из растворов. Это могло бы объяснить наличие отдельных областей связывания, которые наблюдаются при термодинамических исследованиях, а также селективность поликатионных лигандов в присутствии белков.

3.4 Лиганды на основе белковых молекул. Некоторые белки также могут взаимодействовать с БЭ. В их числе можно выделить ЛПС-связывающий белок, бактерицидный белок, увеличивающий проницаемость клеточной мембраны, компонент амилоида Р и некоторые другие [6].

Катионные амфифильные белки, составляющие основную часть антимикробных агентов, связываются с ЛПС не хуже, чем полимиксин В. На крысах было показано, что белок кателицидин LL-37 нейтрализует биологическую активность БЭ и может спасти от летального исхода при высоких содержаниях БЭ в крови. Однако в присутствии двухвалентных катионов или при относительно высоких концентрациях других электролитов активность катионных амфифильных белков снижается. Учитывая эти особенности, был синтезирован искусственный белок WLBU2, синтетический аналог LL-37. Такой белок активно связывается и вызывает агрегацию БЭ при физиологических концентрациях NaCl в растворах, а также проявляет более высокую антимикробную активность по сравнению с полимиксином В или LL-37 в отношении широкого спектра бактерий [Ryder M.P. et al., 2014].

В имеющихся на рынке колонках Endotrap применяется сорбент на основе ЛПС-специфичного белка, полученного из бактериофага, иммобилизованного

на агарозную матрицу. Такие системы селективны по отношению к БЭ, обладают высокой адсорбционной эффективностью и стабильностью в широком диапазоне рН от 5 до 10. Применяющаяся на сегодняшний день колонка для экстракорпоральной детоксикации крови при сепсисе Altесо представляет собой пористую полиэтиленовую матрицу, которая покрыта специально сконструированным синтетическим катионным пептидом, разработанным для адсорбции БЭ. Матрица также специально разработана для обеспечения оптимальной поверхности связывания. Такая конструкция сорбента сводит к минимуму нежелательные эффекты, оказываемые на клетки крови, при этом сохраняется максимальная поверхность и количество сайтов связывания пептида с БЭ. Благодаря высокому сродству сорбента к липиду А достигается эффективное снижение уровня БЭ различных видов бактерий [Adamik V. et al., 2015].

3.5 Дендримерные лиганды. Исходя из ранее сделанных выводов о том, какая должна быть структура ЛПС-селективного лиганда, можно предположить, что дендримерные молекулы полиамидаминного типа должны эффективно удалять БЭ из растворов. Однако несмотря на то, что формально дендримеры типа А можно считать амфифильными за счет присутствия и неполярных, и положительно заряженных функциональных групп, взаимодействия с БЭ не происходит.

Это объясняется тем, что большие дендримерные молекулы легко сворачиваются в «клубки», в результате чего гидрофобные фрагменты оказываются внутри, а на поверхности остаются заряженные аминогруппы, взаимодействующие с растворителями. Таким образом, в разбавленных растворах поведение таких молекул сходно с полиэлектролитами, а не с катионными амфифильными полимерами, так как гидрофобные области недоступны для контакта. Среди более 50 изученных видов различных дендримерных поликатионов, только один класс — монодендроны додециламина с четырьмя или восемью зарядами связываются с липидом А и адсорбируют БЭ [16].

3.6 Производные гуанидина, бигуанида и алифатических аминов. Ряд катионных амфифильных лекарств, применяющихся в клинической практике, также были исследованы на предмет связывания с липидом А и нейтрализации ЛПС. Среди них препараты против малярии на основе 4-аминохинолинов, нейролептики фенотиазины, производные бис- и бигуанидинов, хлоргексидин, пентамидин и др. Критерием при выборе именно таких препаратов служил их катионный амфифильный характер [David S.A. et al., 1994]. Из проводимых ранее исследований известно, что пентамидин и хлоргексидин взаимодействуют с липидом А, с константой связывания K_d 0,12 и 0,87 μM соответственно. Стоит отметить, что соответствующая K_d для полимиксина В составляет 0,37 μM . Бисбигуанидин и хлоргексидин связываются с липидом А на 1 — 2 порядка лучше, чем соответствующие монобигуанидины: метформин и фенформин.

Оба этих соединения эффективно блокировали активность ЛПС по данным гель-тромб ЛАЛ (*Limulus amoebocyte lysate*) теста. Это одно из первых подтверждений о том, что присутствие двух основных групп на некотором расстоянии в молекуле может коррелировать с высокой способностью связывания ЛПС. Как в пентамидине, так и в хлоргексидине присутствуют два идентичных фрагмента — производные гуанидина. В связи с этим особый интерес представляет варьирование основности этих фрагментов (рК) и расстояния между ними с точки зрения оценки эффективности комплексообразования с БЭ [Escamilla G.H., 1994]. Было показано, что введение метокси группы в орто-положение по отношению к амидиниевой группе в бензольном кольце уменьшает основность последней, но практически не влияет на связывания с ЛПС. Все рассмотренные аналоги пентамидина обладают практически одинаковой способностью к образованию комплекса с липидом А, из чего следует вывод, что основность не является определяющим фактором при оценке способности к комплексообразованию. Электростатические взаимодействия катионных лигандов с липидом А протекают с образованием ионных Н-связей («солевых мостиков»), так как было показано,

что некоторые соединения с кватернизованными полиамидиниевыми функциональными группами не связываются с БЭ [Rietschel E.T. et al., 1993].

α , ω — Диаминоалканы, полиамины спермидин и спермин и их производные, представляющие собой линейные молекулы, с расстоянием между аминогруппами от 5 до 16 Å, использовались для анализа. Оптимальное расстояние между основными группами для хорошего связывания с БЭ составило 16 Å (спермин), чуть хуже показывает себя спермидин — 11 Å.

Было показано, что гомологизованный спермин, в котором расстояние между аминогруппами соответствует исходному спермину и составляет 16 Å, более активен, чем моноацилированный спермин, что подтверждает предположение о важности расстояния между основными аминогруппами. Стоит отметить, что благодаря алкильной группе на конце молекулы соединения В его константа связывания в 5 раз лучше, чем у липополиаминов с гидрофобными заместителями, находящимися не на конце молекулы, такими, как DÖSPER.

Показана эффективность микросфер на основе макропористых производных поли-(γ -алкил-L-глутамата) и их производных с введенными первичными аминогруппами для селективного удаления ЛПС из водных растворов, а также для очистки вакцин против дифтерии и столбняка [Hirayama S. et al., 1990]. Аффинность таких микросфер по отношению к БЭ обусловлена катионными и слабыми гидрофобными свойствами микросфер на основе алкилглутаматов. Предположение об ионных взаимодействиях подтверждалось тем фактом, что адсорбционная способность таких сорбентов возрастала с увеличением количества введенных аминогрупп и значительно уменьшалась при высоких значениях ионной силы (1–1) растворов. Что касается гидрофобных взаимодействий, в пользу этого предположения свидетельствует тот факт, что даже не содержащие аминогрупп соединения могут связываться с ЛПС лучше, чем некоторые коммерчески доступные микросферы, в частности Ryoosер.

3.7 Молекулярный импринтинг. Сравнительно новая техника молекулярного импринтинга, получившая широкое распространение в последние годы, основывается на получении функциональных полимерных матриц при помощи специальных молекул-темплатов, которые образуют в матрицах так называемые «отпечатки» или полости [Cutivet A. et al., 2009]. Это позволяет получать полимеры, которые обладают ярко выраженным сродством к тем или иным биомолекулам, что, в свою очередь, открывает возможности использования таких матриц для разделения, очистки или идентификации биомолекул.

Подход, основанный на методе молекулярного импринтинга, позволяет создавать функциональные полимеры, связывающие ЛПС. Так, в работе [Long Y. et al., 2016] методом эмульсионной полимеризации были получены наночастицы, обладающие сильной аффинностью по отношению к бактериям семейства Pseudomonadaceae. Для синтеза таких полимерных наночастиц с «молекулярными отпечатками» в качестве темплата использовался ЛПС, выделенный из бактерий *P. aeruginosa*.

Принцип работы таких наночастиц заключается в том, что при проведении микроэмульсионной полимеризации к раствору мономеров добавляется БЭ, выступающий в роли темплата. Молекулы мономера располагаются определенным образом вокруг него, после чего проводится синтез наночастиц. На последнем этапе происходит удаление ЛПС из продукта, в результате чего на том месте, где был введен ЛПС, в полимере остаются так называемые «полости», идеально подходящие по размеру к молекуле ЛПС.

Методом флуоресцентной поляризации, а также микромасштабного термофореза было продемонстрировано специфическое связывание таких частиц с ЛПС. Также было показано на моделях кератита у кроликов и менингита у мышей, вызванных *P. aeruginosa*, что наночастицы избирательно взаимодействовали с поверхностью бактериальных клеток.

Таким образом было продемонстрировано, что полученные методом молеку-

лярного импринтинга наночастицы могут обладать высокой аффинностью по отношению к ЛПС и грамотрицательным бактериям, это открывает новые пути для получения сорбентов селективных для удаления БЭ.

Наиболее эффективным, производительным и надежным методом удаления токсичных ЛПС из растворов, применяемым как в лабораториях, так и в клинической практике, является использование аффинных сорбентов. Несмотря на высокую вариабельность структуры ЛПС различных бактерий, домен липид А, содержащий две фосфорильные группы и фрагмент липида, является консервативным, и может рассматриваться в качестве молекулярной мишени для связывания самых разных ЛПС.

На протяжении уже нескольких десятилетий «золотым стандартом» в качестве лиганда для липида А рассматривается олигопептид полимиксин В, в состав которого входит пять остатков лизина и гидрофобный алкильный заместитель. Изучение трехмерной структуры прочного комплекса ЛПС и полимиксина В с помощью современных физико-химических методов позволило подтвердить ключевую роль в его формировании электростатических взаимодействий аминокислотных групп лиганда и фосфатных групп липида А, а также вспомогательную роль гидрофобных взаимодействий соответствующих алкильных заместителей.

Это позволило сделать ключевые выводы, сформулировать основные принципы создания синтетических лигандов для связывания липида А: таким лигандом должно являться амфифильное органическое соединение, содержащее две аминокислотные группы на расстоянии $\sim 15 \text{ \AA}$ друг от друга и гидрофобный алкильный заместитель. Критичным является именно наличие аминокислотных групп, роль алкильного заместителя является вспомогательной. Многие эффективные лиганды вообще не содержат подобных гидрофобных структурных фрагментов. Следует также не забывать о том, что наиболее эффективные лиганды в этом ряду (содержащие алкильный заместитель) являются цитотоксичными катионными поверхностно-активными веществами.

Таким образом, в зависимости от условий проведения сорбции, желаемой степени очистки раствора и дополнительных требований к процессу (например, био- и гемосовместимость сорбента, для возможности его применения в гемосорбционных колонках), аффинный сорбент может быть получен на основе самых необычных комбинаций матриц и лигандов, общие принципы создания которых мы постарались описать.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 16-14-00112).

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная фармакопея Российской Федерации. XII издание. Ч. 1. гл. 27 Бактериальные эндотоксины (ОФС 42-0062-07). М.: научный центр экспертизы средств медицинского применения. 2007: с. 128-136.
2. Красоткина Ю.В., Кустова П.А., Бессонов И.В., Морозов А.С., Копицына М.Н., Карелина Н.В., Нуждина А.В. «Эндосорб» — новый эффективный сорбент для очистки растворов фармацевтических белков от эндотоксинов. V съезд биофизиков России. Ростов-на-Дону; 2015: с. 208.
3. Морозов А.С., Бессонов И.В., Нуждина А.В., Писарев В.М. Сорбенты для экстракорпорального удаления токсических веществ и молекул с нежелательной биологической активностью (обзор). Общая реаниматология. 2016, 12 (6): 82-107.
4. Anisimova N. Yu. Immunological pathogenesis of sepsis and use of hemosorption for treatment of cancer patients with sepsis. New York: Nova Science Publishers Inc, 2014: p. 57-114.
5. Anspach F. V. Membrane adsorbents for selective endotoxin removal from protein solutions. Process Biochemistry. 2000, 35: 1005-1012.
6. Anspach F.V. Endotoxin removal by affinity sorbents. J. Biochem. Biophys. Methods. 2001, 49 (1-3): 665-681.

7. Anspach F.B., Hilbeck O. Removal of endotoxins by affinity sorbents. *J. Chromatogr. A.* 1995, 711 (1): 81-92.
8. Berczi I., Bertok L., Bereznai T. Comparative studies on the toxicity of *Escherichia coli* lipopolysaccharide endotoxin in various animal species. *Can. J. Microbiol.* 1966, 12 (5): 1070-1071.
9. Bone R.C. Gram-negative sepsis: a dilemma of modern medicine. *Clin. Microbiol. Rev.* 1993, 6 (1): 57-68.
10. Caroff M., Karibian D. Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr. Res.* 2003, 338 (23): 2431-2447.
11. Clark I.A. Correlation between susceptibility to malaria and babesia parasites and to endotoxicity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1982, 76 (1): 4-7.
12. Copeland S., Warren H.S., Lowry S.F. et al. Inflammation and the host response to injury investigators. Acute inflammatory response to endotoxin in mice and humans. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2005, 12 (1): 60-67.
13. Cruz D.N., Antonelli M., Fumagalli R. et al. Early use of polymyxin b hemoperfusion in abdominal septic shock. *JAMA.* 2009, 301 (23): 2445-2452.
14. Cutuli S.L., Artigas A., Fumagalli R. et al. EUPHAS 2 Collaborative Group. Polymyxin-B hemoperfusion in septic patients: analysis of a multicenter registry. *Ann. Intensive Care.* 2016, 6 (1): 77.
15. Damais C., Jupin C., Parant M., Chedid L. Induction of human interleukin-1 production by polymyxin B. *J. Immunol. Methods.* 1987, 101 (1): 51-56.
16. David S.A. Towards a rational development of anti-endotoxin agents: novel approaches to sequestration of bacterial endotoxins with small molecules. *J. Mol. Recognit.* 2001, 14 (6): 370-387.
17. Goodwin M.H., Stapleton T.K. The course of natural and induced infections of *Plasmodium joyrides* in *Sceloporus undulatus undulatus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1952, 1 (5): 773-783.
18. Hanora A., Plieva F.M., Hedström M. et al. Capture of bacterial endotoxins using a supermacroporous monolithic matrix with immobilized polyethyleneimine, lysozyme or polymyxin B. *J. Biotechnol.* 2005, 118 (4): 421-433.
19. Hou K.C., Zaniewski R. Depyrogenation by endotoxin removal with positively charged depth filter cartridge. *J. Parenter. Sci. Technol.* 1990, 44(4): 204-209.
20. Jansson P.-E. The chemistry of O-polysaccharide chains in bacterial lipopolysaccharides. In: Brade H. et al. (eds). *Endotoxin in health and disease*. New York: Medical Directions Incorporation; 1999: p. 155-178.
21. Karplus T.E., Ulevitch R.J., Wilson C.B. A new method for reduction of endotoxin contaminations from protein solutions. *J. Immunol. Methods.* 1987, 105 (2): 211-220.
22. Kastowsky M., Gutberlet T., Bradacsek H. Molecular modelling of the three-dimensional structure and conformational flexibility of bacterial lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.* 1992, 174 (14): 4798-4806.
23. Kim Y.B., Watson D.W. Role of antibodies in reactions to gram-negative bacterial endotoxins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1966, 133 (2): 727-745.
24. Kumar A. An alternate pathophysiologic paradigm of sepsis and septic shock. *Virulence.* 2014, 5 (1): 80-97.
25. Legallais C., Anspach F.B., Bueno S.M.A. et al. Strategies for the depyrogenation of contaminated IgG solutions by histidine-immobilized hollow fiber membrane. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci Appl.* 1997, 691 (1): 33-41.
26. Magalhães P.O., Lopes A.M., Mazzola P.G. et al. Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2007, 10 (3): 388-404.
27. Malik D.J., Webb C., Holdich R.G. et al. Synthesis and characterization of size-selective nanoporous polymeric adsorbents for blood purification. *Sep. Purif. Technol.* 2009, 66 (3): 578-585.
28. Mares J., Kumaran S., Gobbo M., Zerbe O. Interactions of lipopolysaccharide and polymyxin studied by NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 2009, 284 (17): 11498-11506.
29. Minobe S., Watanabe T., Sato T. et al. Preparation of adsorbents for pyrogen adsorption. *J. Chromatogr.* 1982, 248: 401-408.
30. Moran A.P., Rietschel E.T., Kosunen T.U., Zahringer U. Chemical characterization of *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharides containing N-acetylneuraminic acid and 2,3-diamino-2,3-dideoxy-D-glucose. *J. Bacteriol.* 1991, 173 (2): 618-626.

31. Morozov A.S., Kopitsyna M.N., Bessonov I.V. et al. A selective sorbent for removing bacterial endotoxins from blood. *Russ. J. Phys. Chem. A* 2016, 90 (12): 2465-2470.
32. Mueller M., Lindner B., Kusumoto S. et al. Aggregates are the biologically active units of endotoxin. *J. Biol. Chem.* 2004, 279 (25): 26307-26313.
33. Newton B.A. The properties and mode of action of the polymyxins. *Bacteriol. Rev.* 1956, 20 (1): 14-27.
34. Petsch D., Beeskow T.C., Anspach F.B., Deckwer W.-D. Membrane adsorbers for selective removal of bacterial endotoxin. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 1997, 693 (1): 79-91.
35. Raetz C.R., Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 2002, 71: 635-700.
36. Raetz C.R.H. Biochemistry of endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 1990, 59: 129-170.
37. Raetz C.R.H. *Escherichia coli* and *Salmonella*. In: Niedhardt F.C. et al. (eds). *Cellular and molecular biology*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1996, p. 1035-1063.
38. Reddin J.L., Starzecki B., Spink W.W. Comparative hemodynamic and humoral responses of puppies and adult dogs to endotoxin. *Am. J. Physiol.* 1966, 210 (3): 540-544.
39. Rubenstein M., Mulholland J.H., Jeffery G.M., Wolff S.M. Malaria induced endotoxin tolerance. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 1965, 118 (1): 283-287.
40. Sauter C., Wolfensberger C. Interferon in human serum after injection of endotoxin. *Lancet.* 1980, 316(8199): 852-853.
41. Schmidt L.H. *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections in the owl monkey (*Aotus trivirgatus*) 1. The courses of untreated infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1978, 27(4): 671-702.
42. Seydel U., Brandenburg K., Koch M.H., Rietschel E.T. Supramolecular structure of lipopolysaccharide and free lipid A under physiological conditions as determined by synchrotron small-angle X-ray diffraction. *Eur. J. Biochem.* 1989, 186 (1-2): 325-332.
43. Shoji H. Extracorporeal endotoxin removal for the treatment of sepsis: endotoxin adsorption cartridge (Toramyxin). *Ther. Apher. Dial.* 2003, 7: 108-114.
44. Silipo A., Molinaro A. Lipid A structure. In: Knirel Y. A., Valvano M. A. (eds.). *Bacterial lipopolysaccharides. Structure, chemical, synthesis, biogenesis and interaction with host cells*. N.Y.: Springer; 2011, p. 1-20.
45. Silverman M.H., Ostro J. Bacterial endotoxin in human disease. How advances in understanding the role of Gram-negative bacteria and endotoxin in infectious diseases and complications may improve the development of diagnostic and treatment options. Berkeley: XOMA LLC; 1999: 1-30.
46. Smith C.E. Bacterial and Mycotic Infections of Man. *Am. J. Public. Health.* 1953, 43 (10): 1344-1345.
47. Srimal S., Surolia N., Balasubramanian S., Surolia A. Titration calorimetric studies to elucidate the specificity of the interaction of polymyxin B with lipopolysaccharides and lipid A. *Biochem. J.* 1996, 315: 679-686.
48. Talmadge K.W., Siebert C.J. Efficient endotoxin removal with a new sanitizable affinity column: affi-prep polymyxin. *J. Chromatogr.* 1989, 476: 175-185.
49. Vaara M., Nikaido H. Outer membrane organization. In: Rietschel E. T. (ed.). *Handbook of Endotoxin*. Amsterdam: Elsevier; 1984: p. 1-45.
50. Wilkinson S.G. Bacterial lipopolysaccharides — themes and variations. *Prog. Lipid Res.* 1996, 35 (3): 283-343.

Поступила 17.02.17

Контактная информация: Морозов А.С.,
119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 1, р.т. (495)939-27-76

СОДЕРЖАНИЕ (CONTENTS)

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ (ORIGINAL ARTICLES)

- Рыбальченко О.В., Эрман М.В., Орлова О.Г., Первунина Т.М., Капустина В.В., Парийская Е.Н.* Подавление биопленок условно патогенных бактерий на мочевых катетерах
Rybalchenko, O.V., Erman, M.V., Orlova, O.G., Pervunina, T.M., Kapustina, V.V., Pariyskaya, E.N. Suppression of biofilms of opportunistic bacteria in urinary catheters
- Бухарин О.В., Иванова Е.В., Перунова Н.Б.* Регуляция иммунного гомеостаза кишечника человека метаболитами бифидобактерий в условиях микробного распознавания 12
- Bukharin, O.V., Ivanova, E.V., Perunova, N.B.* Regulation of immune homeostasis of the human intestine by metabolites of bifidobacteria under conditions of microbial recognition
- Брико Н.И., Глушкова Е.В., Клейменов Д.А., Дмитриева Н.Ф., Липатов К.В., Девяткин А.В., Маликов В.Е.* Чувствительность к антибиотикам и молекулярно-генетические свойства штаммов *Streptococcus pyogenes*, выделенных от больных с инфекцией мягких тканей и ангинами 19
- Briko, N.I., Glushkova, E.V., Kleymenov, D.A., Dmitrieva, N.F., Lipatov, K.V., Devyatkin, A.V., Malikov, V.E.* Antibiotic susceptibility and molecular properties of strain *Streptococcus pyogenes* from patients with soft tissue infections and angina
- Чекнев С.Б., Вострова Е.И., Сарычева М.А., Кисиль С.В., Анисимов В.В., Востров А.В.* Торможение роста бактерий в культурах *Streptococcus pyogenes* и *Streptococcus agalactiae* в присутствии катионов меди и цинка 26
- Cheknev, S.B., Vostrova, E.I., Sarycheva, M.A., Kisil, S.V., Anisimov, V.V., Vostrov, A.V.* Inhibition of the bacterial growth in the cultures of *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus agalactiae* in presence of copper and zinc ions
- Гуляев С.А., Ляшенко А.А., Чумаков А.М., Сорокин А.А., Гордейчук И.В., Потемкин И.А., Исаева О.В., Кюрегян К.К., Михайлов М.И.* Изучение иммуногенности прототипного вакцинного препарата против гепатита Е 35
- Gulyaev, S.A., Lyashenko, A.A., Chumakov, A.M., Sorokin, A.A., Gordeichuk, I.V., Potemkin, I.A., Isaeva, O.V., Kyuregyan, K.K., Mikhaylov, M.I.* Study of immunogenicity of a prototype vaccine against hepatitis E
- Соболева Н.В., Карлсен А.А., Исаева О.В., Кюрегян К.К., Троценко О.Е., Михайлов М.И.* Особенности циркуляции вируса гепатита С в Хабаровском крае 43
- Soboleva, N.V., Karlsen, A.A., Isaeva, O.V., Kyuregyan, K.K., Trotsenko, O.E., Mikhaylov, M.I.* Features of circulation of hepatitis C virus in Khabarovsk region
- Михайлова Н.А., Калинин Е.О., Солдатенкова А.В., Ахматова Н.К.* Рекомбинантные антигены *Pseudomonas aeruginosa*: влияние на иммунный ответ у мышей 52
- Mikhaylova, N.A., Kalinichenko, E.O., Soldatenkova, A.V., Akhmatova, N.K.* Recombinant antigens of *Pseudomonas aeruginosa*: effect on immune response in mice
- Алсалих Н.Д., Сычев Д.А., Потемкин И.А., Кюрегян К.К., Михайлов М.И.* Распространенность маркеров энтеральных вирусных гепатитов среди трудовых мигрантов, прибывающих в Российскую Федерацию 59
- Alsalikh, N.D., Sychev, D.A., Potemkin, I.A., Kyuregyan, K.K., Mikhaylov, M.I.* Prevalence of markers of enteral viral hepatitis among migrant workers arriving in Russian Federation
- Отрашевская Е.В., Кулак М.В., Букин Е.К., Горбунов М.А., Игнатьев Г.М.* Горизонтальная трансмиссия вакцинного штамма вируса паротита от вакцинированных их близким контактам 65
- Otrashevskaya, E.V., Kulak, M.V., Bukin, E.K., Gorbunov, M.A., Ignatyev, G.M.* Horizontal transmission of parotitis vaccine strain from vaccinated to close contacts
- Флауер Ф.С., Кудрявцева А.В., Титарев С.И., Быкова И.Б.* Средство для ингибирования продукции стафилококковых энтеротоксинов и удаления их из биологических субстратов 71

