

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., акад. РАН

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

*Двухмесячный научно-практический журнал*

*Основан в 1924 г.*

4

июль—август

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

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

<http://www.jmicrobiol.com>

**Благодарим всех, кто поддержал нас в подписке на II полугодие 2017 г.**

**Доподписаться на II полугодие 2017 г. можно по объединенному каталогу «Пресса России», индексы 10277 и 71436.**

**Подписка на 2018 г. начнется с 1 сентября 2017 г.: I. Каталог Агентство «Роспечать», индекс 71436 (на полугодие). II. Объединенный каталог «Пресса России», индекс 10277 (на полугодие); 16729 (годовая подписка).**

**Редколлегия, Редакция**

---

Подписано в печать 19.07.17. Выход в свет 08.08.17.  
Формат 70x108 1/16. Печать офсетная. Заказ 5421.

---

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

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

С.В.Балахонов<sup>1</sup>, Е.С.Куликалова<sup>1</sup>, А.В.Мазепа<sup>1</sup>, А.К.Сынгеева<sup>1</sup>,  
А.С.Остяк<sup>1</sup>, Е.П.Михайлов<sup>2</sup>, И.И.Ешелкин<sup>2</sup>, В.А.Шестаков<sup>2</sup>

### РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ FRANCISELLA TULARENSIS, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ЮГЕ СИБИРИ (1950 — 2015 ГГ.)

<sup>1</sup>Иркутский научно-исследовательский противочумный институт; <sup>2</sup>Алтайская противочумная станция, Горно-Алтайск

*Цель.* Исследование таксономической принадлежности коллекционных штаммов возбудителя туляремии на основе протеометрического и молекулярно-генетического методов идентификации. *Материалы и методы.* В работе использовано 23 штамма туляремийного микроба, изолированных в Красноярском крае и Республике Алтай с 1950 по 2015 гг. Для культивирования возбудителя использовался FT-агар. Спектры для время-пролетной масс-спектрометрии собирались на приборе Microflex LT (Bruker Daltonics, Германия) и анализировались в сравнении с предварительно дополненной базой данных программы MALDI Biotyper 3.0. ПЦР со специфическими праймерами проводилась с электрофоретической визуализацией результатов и в режиме реального времени. *Результаты.* Установлено, что штаммы *F. tularensis*, выделенные на юге западной Сибири с 1950 до 2010 гг., относятся к подвиду *holarctica*, из них 56,3% — эритромицин-чувствительные (I биовар *Ery*<sup>S</sup>), остальные — эритромицин-резистентные (II биовар *Ery*<sup>R</sup>). Семь штаммов, изолированных после 2011 г., по цитруллинуреидазной активности, расщеплению глицерина и наличию фрагментов *rdpA* и *rdpD* острова патогенности (FPI) определены как среднеазиатский подвид. *Заключение.* Результаты ретроспективного исследования биологических свойств штаммов *F. tularensis*, выделенных на юге Сибири, показало отсутствие в коллекции Иркутского противочумного института до 2011 г. возбудителя туляремии среднеазиатского подвида. Обнаружение указанного подвида на территории Российской Федерации свидетельствует о необходимости изучения и анализа вопросов эпидемиологии, экологии и эпизоотологии возбудителя туляремии среднеазиатского подвида, а также определения границ его распространения.

Журн. микробиол., 2017, № 4, С. 3—9

Ключевые слова: туляремия, *Francisella tularensis*, масс-спектрометрия, MALDI-TOF масс-спектрометрия, ПЦР, природные очаги

S.V.Balakhonov<sup>1</sup>, E.S.Kulikalova<sup>1</sup>, A.V.Mazepa<sup>1</sup>, A.K.Syngeeva<sup>1</sup>,  
A.S.Ostyak<sup>1</sup>, E.P.Mikhailov<sup>2</sup>, I.I.Eshelkin<sup>2</sup>, V.A.Shestakov<sup>2</sup>

### RETROSPECTIVE ANALYSIS OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF FRANCISELLA TULARENSIS COLLECTION STRAINS ISOLATED IN SOUTH SIBERIA (1950 — 2015)

<sup>1</sup>Irkutsk Research Institute for Plague Control; <sup>2</sup>Altai Station for Plague Control, Gorno-Altaysk, Russia

*Aim.* Study taxonomic belonging of collection strains of tularemia causative agent based on proteomic and molecular-genetic methods of identification. *Materials and methods.* 23 strains of tularemia were used in the study, isolated from Krasnoyarsk region and Altai Republic from 1950 to 2015. FT-agar was used for the cultivation. Spectra for time-of-flight mass-spectrometry were

collected using Microflex LT (Bruker Daltonics, Germany) and analyzed compared with previously collected enhanced database of MALDI Biotyper 3.0. PCR with specific primers was carried out with electrophoretic visualization of results in real time. *Results.* *F. tularensis* strains isolated from south of western Siberia from 1950 to 2010 were established to belong to subspecies *holarctica*, and 56.3% of those — erythromycin sensitive (I biovar Ery<sup>S</sup>), the rest — erythromycin-resistant (II biovar Ery<sup>R</sup>). 7 strains isolated after 2011 by citrulline ureidase activity, cleavage of glycerin and presence of pdpA and pdpD fragments of pathogenicity island (FPI) were determined as Central Asian subspecies. *Conclusion.* Results of a retrospective study of biological properties of *F. tularensis* strains isolated from south Siberia have shown the lack of Central Asian subspecies tularemia causative agent in the collection of Irkutsk Institute for Plague Control before 2011. Detection of this subspecies in Russian Federation gives evidence on the necessity to study and analyze problems of epidemiology, ecology and epizootology of Central Asian subspecies tularemia causative agent as well as determination of borders of its spread.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 4, P. 3—9

Key words: tularemia, *Francisella tularensis*, mass-spectrometry, MALDY-TOF mass-spectrometry, PCR, natural foci

## ВВЕДЕНИЕ

Туляремия — природно-очаговая инфекция, приуроченная к многокомпонентным биоценоотическим системам, способная вызывать массовые эпидемические вспышки и эпизоотии. На территории Российской Федерации широко распространены природные очаги туляремии, где циркулирует голарктический подвид возбудителя — *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*. В Казахстане, помимо голарктического подвида, по долинам пустынных рек в природных очагах тугайного типа обнаруживается микроорганизм среднеазиатского подвида — *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* [1]. На территории граничащего с Казахстаном Алтайского края и Республики Алтай находится Алтайский предгорно-ручьевого очаг туляремии. Заболевания туляремией регистрировались в этом очаге на территории Восточно-Казахстанской области в 2011 г. [4]. Последний случай туляремии в этом очаге на территории России зарегистрирован в 2015 г. у невакцинированной против туляремии жительницы с. Большой Лог Крутихинского района Алтайского края. Заражение произошло в результате присасывания иксодового клеща на собственной усадьбе. Эпизоотологическое обследование подворья выявило четыре серопозитивных на туляремию мыши (из шести отловленных). По данным 2015 г. циркуляция возбудителя подтверждена серологически в 598 пробах биоматериала из 18 районов края титрами от 1:20 до 1:320 (РНAt, РНГА). Ранее (до 2011 г.) на территории Алтайского края отмечалось выделение из объектов окружающей среды штаммов возбудителя туляремии голарктического подвида. Однако в 2011 г. из шести изолятов туляремийного микроба, выделенных от иксодовых клещей, отловленных в Алтайском крае, три (из биотопов Ельцовского, Первомайского, Шелаболихинского районов) впервые отнесены к среднеазиатскому подвиду [3, 6]. Изолированный в 2015 г. в Каратузском районе Красноярского края штамм туляремийного микроба также идентифицирован (Референс-центр по мониторингу за природно-очаговыми инфекциями на базе Иркутского научно-исследовательского противочумного института) как возбудитель туляремии среднеазиатского подвида.

Цель работы — изучение таксономической принадлежности выделенных на территории Красноярского края и Республики Алтай с 1950 по 2015 гг.

коллекционных и свежeweделенных штаммов возбудителя туляремии на основе протеометрического и молекулярно-генетического методов идентификации.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовано 23 штамма туляремийного микроба, выделенных в Красноярском крае и Республике Алтай в период с 1950 по 2015 гг. (табл.). Все штаммы получены из коллекции Музея живых культур Иркутского научно-исследовательского противочумного института, где хранились в лиофилизированном состоянии при 4°С.

Исследование видовых и подвидовых свойств взятых в исследование штаммов проводилось общепринятыми методами [5], а также с использованием современных подходов к идентификации микроорганизмов — протеометрических и молекулярно-генетических методов.

Для культивирования в процессе исследования туляремийного микроба использовался FT-агар (рН 7,0) производства ГНЦ ПМБ (пос. Оболенск). Хранение культур возбудителя туляремии осуществлялось на желточной среде Мак-Коя на протяжении двух месяцев при температуре 5°С с последующим пересевом.

Данные о штаммах *F. tularensis*, взятых в исследование

Инв. № штамма	Объект выделения	Год выделения	Место выделения (очаг)
И-1	человек (бубон)	1950	Красноярский край, Бирилюсский р-н
И-6	комары <i>Aedes vexans</i>	1950	Красноярский край, Бирилюсский р-н
И-94	полевки водяные <i>Arvicola terrestris</i>	1958	Республика Алтай, Майминский р-н, ручей Бочкаревка
И-95	мыши полевые <i>Arodemus agrarius</i>	1958	Республика Алтай, Майминский р-н, Мокрый Лог, ручей №2
И-111	клещи <i>Haemaphysalis concinna</i>	1959	Республика Алтай, Майминский р-н, г. Горно-Алтайск, ручей Бочкаревка
И-125	клещи <i>Dermacentor silvarum</i>	1960	Республика Алтай, Майминский р-н, г. Горно-Алтайск, ручей Бочкаревка
И-126	суслик длиннохвостый <i>Spermophilus undulatus</i>	1960	Республика Алтай, Кош-Агачский р-н, оз. Кара-Куль
И-127	полевка узкочерепа <i>Microtus gregalis</i>	1960	Республика Алтай, Кош-Агачский р-н, оз. Кара-Куль
И-129	кутора <i>Neomys spp.</i>	1960	Республика Алтай, Кош-Агачский р-н, оз. Кара-Куль
И-283	бурозубки <i>Sorex spp.</i>	1971	Республика Алтай, Майминский р-н
И-367	обыкновенные полевки <i>M. arvalis</i>	1989	Красноярский край, Ужурский р-н, окр. пос. Ужур
И-368	полевые мыши <i>A. agrarius</i>	1989	Красноярский край, Ужурский р-н, с. Солган
И-390	бурозубка <i>Sorex spp.</i>	2012	Красноярский край, Каратузский р-н, пос. Марьян Лог
И-391	труп кошки <i>Felis silvestris catus</i>	2012	Красноярский край, Кежемский р-н, п. Кежма
И-392	ондатра <i>Ondatra zibethicus</i>	2012	Красноярский край, Кежемский р-н, п. Кежма
И-393	ондатра <i>O. zibethicus</i>	2012	Красноярский край, Кежемский р-н, п. Кежма
И-394 (310)	клещи <i>H. concinna</i>	2015	Красноярский край, Каратузский р-н, с. Чубчиково
И-396 (77)	клещи <i>H. concinna</i>	2015	Республика Алтай, Майминский р-н, ручей Бакала
И-397 (87)	клещи <i>H. concinna</i>	2015	Республика Алтай, Майминский р-н, р. Б. Шарара
И-398 (196)	клещи <i>H. concinna</i>	2015	Республика Алтай, Чойский р-н, окр. с. Паспаул
И-399 (198)	клещи <i>D. silvarum</i>	2015	Республика Алтай, Чойский р-н, окр. Ашпанак
И-400 (193)	клещи <i>H. concinna</i>	2015	Республика Алтай, Чойский р-н, р. Уба-2
И-401 (195)	клещи <i>H. concinna</i>	2015	Республика Алтай, Чойский р-н, р. Уба-1

Качество питательных сред определялось с учетом чувствительности и скорости роста микроба. Штаммы туляремийного микроба выращивались в течение 48 ч при температуре 37°C, после чего проводилось изучение их культурально-морфологических свойств и ферментативной активности в отношении глицерина и цитрулина. В каждую пробирку засеивалась полная петля агаровой культуры. Пробирки с посевами помещались в термостат при 37°C.

Метод времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF) осуществляли таким образом. После инкубации в течение 24 — 48 ч при 37°C штаммов туляремийного микроба из них готовились белковые препараты: к водной суспензии одной изолированной колонии добавлялся 96% этанол, тщательно перемешивался на микроцентрифуге-вортексе, клетки осаждались центрифугированием при 13 тыс. об./мин. К осадку добавлялся 70% водный раствор муравьиной кислоты и равный объем ацетонитрила, центрифугировался при 13 тыс. об./мин. Супернатант в количестве 1 мкл наносился в лунки MSP-чипа (мишени); после подсыхания на каждую лунку наслаивался 1 мкл насыщенного водного раствора  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричной кислоты, содержащей 50 % ацетонитрила и 2,5 % трифторуксусной кислоты. После высушивания чип помещался в камеру масс-анализатора и проводился сбор спектров.

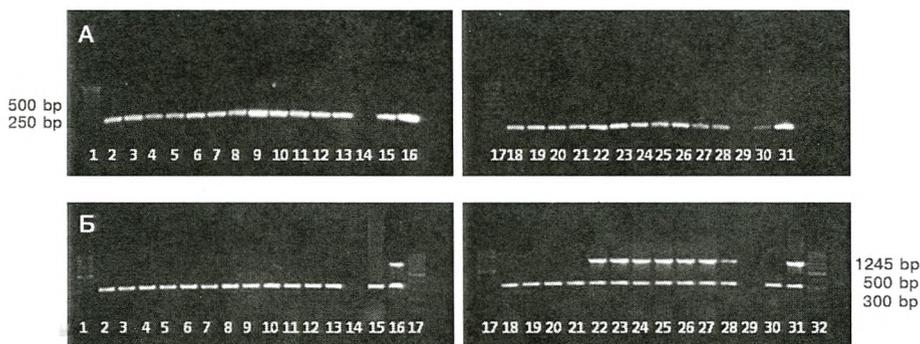
Сбор спектров проводился в автоматическом режиме на масс-спектрометре Microflex LT (Bruker Daltonics, Германия). Полученные в процессе сбора исходные спектры подвергали анализу в сравнении с базой данных программы MALDI Biotyper 3.0 для идентификации штаммов.

Предварительно проделана работа по созданию базы референсных спектров представителей четырех подвидов туляремийного микроба (*F. tularensis* ssp. *holarctica* I Ery<sup>S</sup> 15B НИИЭГ, *F. tularensis* ssp. *holarctica* I Ery<sup>S</sup> 250, *F. tularensis* ssp. *holarctica* II Ery<sup>R</sup> 94, *F. tularensis* ssp. *mediaasiatica* A-120, *F. tularensis* ssp. *tularensis* Schu-11, *F. tularensis* ssp. *novicida* Utah 112) [2].

Заключение о таксономической принадлежности микроорганизма давалось на основании значения индекса совпадения (параметр score value, SV). Значение SV  $\geq 2,3$  соответствовало достоверной идентификации до вида; SV менее 2,299, но более 2,000 — достоверной идентификации до рода, вероятной идентификации до вида; значение SV в диапазоне 1,7 — 1,999 рассматривалось как вероятная идентификация до рода и менее 1,7 — недостоверный результат.

Выявление видоспецифических генов *F. tularensis* проводилось с помощью «Набора реагентов для выявления ДНК *F. tularensis* методом полимеразной цепной реакции с учетом результатов в реальном времени» производства РосНИПЧИ «Микроб» на амплификаторе и Rotor-Gene Q (QIAGEN), а также с использованием праймеров *tul4* на термоциклере «Терцик» [7] (производства ЗАО «Синтол»). Гены *rdpA* и *rdpD* острова патогенности для определения подвида туляремийного микроба детектировались по методу F.E. Nano et al. [8] (праймеры производства ЗАО «Синтол»).

Учет результатов амплификации проводился с помощью электрофореза в 2% агарозном геле в присутствии 1-кратного TBE-буфера (0,089 М трис-ОН; 0,089 М  $H_3BO_3$ ; 0,002 М EDTA) при напряжении 160 В и силе тока 67 мА в течение 30 минут. Фрагменты амплифицированной ДНК сравнивались с маркером молекулярного веса 100 бп производства ЗАО «Синтол», просматривались в проходящем УФ-свете и видеорегистрировались.



## Определение специфических фрагментов ДНК исследуемых штаммов *F. tularensis*.

### А. Фрагменты гена *tul4*. Б. Фрагменты генов *rdpA* и *rdpD*.

Дорожки 1, 17, 32 — маркер молекулярного веса, ДНК 100 bp; 2-13, 18-28: амплификаты ДНК штаммов *F. tularensis*. 2 — И-1; 3 — И-6; 4 — И-94; 5 — И-95; 6 — И-111; 7 — И-125; 8 — И-126; 9 — И-127; 10 — И-129; 11 — И-283; 12 — И-367; 13 — И-368; 18 — И-390; 19 — И-391; 20 — И-392; 21 — И-393; 22 — И-394; 23 — И-396; 24 — И-397; 25 — И-398; 26 — И-399; 27 — И-400; 28 — И-401. Дорожки 14, 29 — отрицательный контроль; 15, 30 — положительный контроль (*F. tularensis* ssp. *holarctica* 15В). Дорожки 16, 31 — положительный контроль (*F. tularensis* ssp. *mediasiatica* 357).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биологические свойства штаммов туляремийного микроба разных подвидов, выделенных на территории южной Сибири, определялись по комплексу тестов — культурально-морфологических, биохимических, молекулярно-генетических и вирулентности. Все изоляты принадлежат к виду *Francisella tularensis*, морфологически представляют собой мелкие полиморфные грамотрицательные палочки, не растущие на обычных питательных средах. Все штаммы агглютинируются до титра или  $1/2$  титра туляремийной сывороткой и дают специфическое свечение в реакции иммунофлуоресценции.

Полученные в результате масс-спектрометрической идентификации спектры были визуализированы в виде графиков, где по оси *x* обозначена величина отношения массы к заряду, а по оси *y* — интенсивность сигнала. В результате сравнения с референсной базой данных спектры исследуемых штаммов *F. tularensis* достоверно идентифицированы до вида, Score Value 2,21 — 2,63 (совпадение с биохимическим и молекулярно-генетическим методом — 100 %). Внутривидовую дифференциацию по подвиду и биовару провести не удалось, значимых различий в белковых профилях между штаммами не выявлено.

В ПЦР выявлена генетическая однородность в отношении всех штаммов по видоспецифичным для *F. tularensis* фрагментам *igl-1BC* гена (268 п.н.) тест-системы «Ген *Francisella tularensis* — РГФ» и гену *tul4* (250 п.н.), кодирующему один из основных Т-клеточных мембранных белков возбудителя туляремии (рис. А). Все изученные изоляты высоковирулентны, летальная доза для мышей составляет одна микробная клетка.

Установлено, что штаммы *F. tularensis*, выделенные на юге западной Сибири до 2011 г., не обладают цитрулинуреидазной активностью и не расщепляют глицерин, что позволяет отнести данные штаммы к голарктическому подвиду. По наличию фрагментов острова патогенности FPI (*Francisella pathogen island*) у вышеперечисленных штаммов обнаружен только один фрагмент острова патогенности *rdpA* (рис. Б). Из этих штаммов 56,3% эритромицин-

чувствительны, отнесены к I биовару Ery<sup>S</sup>, остальные культуры подвида *holarctica* — ко II биовару Ery<sup>R</sup>.

Штаммы *F. tularensis* И-394, И-396, И-397, И-398, И-399, И-400, И-401 обладают цитруллинуреидазной активностью и расщепляют глицерин. Кроме того, выявлены обе геномные области *pdpA* и *pdpD* острова патогенности (FPI), характерные для микроорганизмов среднеазиатского подвида.

Три вирулентных штамма *Francisella tularensis* подвида *mediaasiatica* с генотипом *tul4<sup>+</sup> pdpA<sup>+</sup> pdpD<sup>+</sup>* (выделены от клещей на территории Каратузского района Красноярского края, Майминского и Чойского района Республики Алтай) депонированы в Госколлекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk» с присвоением номеров В-7892, В-7893, В-7894 соответственно.

Таким образом, установлено, что коллекционные штаммы туляремийного микроба, выделенные с 1950 по 2010 гг. на территории Республики Алтай и Красноярского края, относятся к голарктическому подвиду — *F. tularensis* ssp. *holarctica*. Обнаруженный впервые в Алтайском крае в 2011 г. [6], а затем в Республике Алтай и в Красноярском крае в 2015 г. возбудитель среднеазиатского подвида ранее на этих территориях не выявлялся. В 2016 г. при оперативной идентификации в Референс-центре по мониторингу за природно-очаговыми инфекциями на базе Иркутского научно-исследовательского противочумного института из 17 штаммов *Francisella tularensis* (выделены из воды в Алтайском и Красногорском районах; из клещей в Чойском районе, с. Паспаул, Майминском районе, Ак-Кол, Алтайском районе, Верх-Ая, выше Верх-Ая, Красногорском районе, с. Луговое Республики Алтай) по комплексу молекулярно-генетических и биохимических свойств девять отнесены к подвиду *holarctica*, а восемь — к подвиду *mediaasiatica*.

Таким образом, в результате проведенного исследования таксономических свойств коллекционных штаммов *F. tularensis*, выделенных на территории Республики Алтай и Красноярского края в 1950 — 2010 гг., с применением высокотехнологичных методов идентификации установлена их принадлежность к подвиду *holarctica*. Регистрация случаев заболеваний на территории трансграничного с Казахстаном предгорно-ручьевого очага туляремии; изоляция высоковирулентных штаммов туляремийного микроба двух подвидов; инфицирование объектов окружающей среды (кровососущие членистоногие, вода открытых водоемов, мелкие млекопитающие) указывают на неблагоприятную эпидемиологическую ситуацию в отношении этой опасной природно-очаговой инфекции и на существование риска возникновения эпидемических осложнений у местного населения, а также у посещающих с различными целями рекреационные зоны природных биотопов. Выявление изолятов туляремийного микроба среднеазиатского подвида из объектов окружающей среды Алтайского края, Республики Алтай и Красноярского края, начиная с 2011 г., свидетельствует о необходимости изучения вопросов эпидемиологии, экологии и эпизоотологии возбудителя туляремии среднеазиатского подвида, а также тщательного эпидемиологического и эпизоотологического мониторинга природного очага для определения границ его распространения.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Арутюнов Ю.И., Мишанькин Б.Н., Водопьянов А.С. Туляремия в Казахстане. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2009, 3: 40-46.
2. Балахонов С.В., Миронова Л.В., Афанасьев М.В., Куликалова Е.С., Остяк А.С. MALDI-ToF масс-спектрометрическое определение видовой принадлежности патогенов в со-

- вершенствовании эпидемиологического надзора за опасными инфекционными болезнями. Бактериология. 2016, 1 (1): 88-94.
3. Кудрявцева Т.Ю., Транквиловский Д.В., Мокриевич А.Н., Попов В.П., Морозова Н.С., Зароченцев М.В., Мазепа А.В., Окунев Л.П., Холин А.В., Косилко С.А., Федоров Ю.М., Храмов М.В., Дятлов И.А. Эпизоотическая и эпидемическая ситуации по туляремии в Российской Федерации в 2015 г. и прогноз на 2016 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2016, 1: 28-32.
  4. Куница Т.Н., Избанова У.А., Мека-Меченко В.Г., Майканов Н.С., Садовская В.П. Эпизоотическая активность природных очагов туляремии Казахстана на приграничной с Россией территории. Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2014, 25: 63-65.
  5. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырев (ред.). М., Шико, 2013.
  6. Мокриевич А.Н., Тимофеев В.С., Кудрявцева Т.Ю., Уланова Г.И., Карбышева С.Б., Миронова Р.И., Вахрамеева Г.М., Губарева Т.И., Павлов В.М., Дятлов И.А. Выделение среднеазиатского подвида туляреминого микроба на территории Алтайского края. Проблемы особо опасных инфекций. 2013, 1: 66-69.
  7. Long G.W., Oprandy J.J., Narayanan R.B. et al. Detection of Francisella tularensis in blood by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 1993, 31 (1): 152-154.
  8. Nano F.E., Zhang N., Cowley S.C. et al. A Francisella tularensis pathogenicity island required for intramacrophage growth. J. Bacteriol. 2004, 186: 6430-6436.

Поступила 25.12.16

Контактная информация: Балахонов С.В.,  
664002, Иркутск, ул. Трилиссера, 78, р. т. (3952)23-99-85

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

*Д.В.Ульшина, Д.А.Ковалев, Д.Г.Пономаренко, Д.В.Русанова,  
Н.М.Швецова, Т.В.Таран, И.В.Кузнецова, А.М.Жиров,  
А.А.Хачатурова, И.Ю.Борздова, А.Н.Куличенко*

## **ПРИМЕНЕНИЕ ВРЕМЯПРОЛЕТНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ БРУЦЕЛЛЕЗА В ОБРАЗЦАХ КРОВИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт

*Цель.* Изучение возможности применения метода времяпролетной масс-спектрометрии для выявления возбудителя бруцеллеза в крови. *Материалы и методы.* Штаммы бруцелл: 5 Brucella melitensis и 21 Brucella abortus. Белковое профилирование в линейном режиме на MALDI-TOF масс-спектрометре Microflex «Bruker Daltonics». *Результаты.* Модифицирована и оптимизирована методика обеззараживания и пробоподготовки образцов крови, контаминированной бруцеллами, для анализа методом MALDI-TOF MS. Получены 120 репрезентативных белковых профилей экстрактов образцов крови, содержащей возбудитель бруцеллеза. Сформирован и проанализирован результирующий пик-лист (супер-спектр) исследуемой белковой фракции экстракта крови условно здорового человека в пределах исследуемой группы. *Заключение.* Предложена схема выявления бруцелл в образцах крови методом MALDI-TOF масс-спектрометрии, основанная на выявлении комплекса 15 родоспецифичных фрагментов. Охарактеризованы сигналы на масс-спектрах экстрактов лейкоцитарной фракции крови, искусственно контаминированной возбудителем бруцеллеза.

Журн. микробиол., 2017, № 4, С. 9—17

Ключевые слова: возбудитель бруцеллеза, кровь, масс-спектрометрия, белковое профилирование, выявление

D.V. Ulshina, D.A. Kovalev, D.G. Ponomarenko, D.V. Rusanova,  
N.M. Shvetsova, T.V. Taran, I.V. Kuznetsova, A.M. Zhirov,  
A.A. Khachaturova, I.Yu. Borzdova, A.N. Kulichenko

## APPLICATION OF TIME-OF-FLIGHT MASS-SPECTROMETRY FOR DETECTION OF CAUSATIVE AGENT OF BRUCELLOSIS IN BLOOD SAMPLES IN EXPERIMENT

Stavropol Research Institute for Plague Control, Russia

*Aim.* Study the possibility to apply time-of-flight mass-spectrometry for detection of causative agent of brucellosis in blood. *Materials and methods.* Brucella strains: 5 *Brucella melitensis* and 21 *Brucella abortus*. Protein profiling in linear mode on MALDI-TOF mass-spectrometer Microflex «Bruker Daltonics». *Results.* Technique for disinfection and preparation of blood samples was modified and optimized for MALDI-TOF MS analysis. 120 representative protein profiles of sera extract were obtained that contain brucellosis causative agent. A resulting peak-list (super-spectrum) of the studied protein fraction of blood extract of a conditionally healthy human within the studied group was formed and analyzed. *Conclusion.* A scheme of brucella detection in blood samples by MALDI-TOF MS is proposed, based on detection of a complex of 15 genus-specific fragments. Signals on mass-spectra of extracts of leukocyte fraction of blood, artificially contaminated with brucellosis causative agents are characterized.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 4, P. 9–17

Key words: brucellosis causative agent, blood, mass-spectrometry, protein profiling, detection

### ВВЕДЕНИЕ

Микроорганизмы рода *Brucella* — факультативные внутриклеточные бактерии, вызывающие зоонозное инфекционно-аллергическое заболевание, имеющее тенденцию к хроническому течению. По данным Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору, в Российской Федерации отмечено ежегодное увеличение числа больных бруцеллезом сельскохозяйственных животных и неблагополучных пунктов по бруцеллезу крупного (КРС) и мелкого (МРС) рогатого скота [2]. В свою очередь, эпидемиологическая ситуация по бруцеллезу определяется неблагополучной эпизоотической обстановкой.

В последнее десятилетие помимо традиционных методов идентификации чистых культур бактерий (бактериологические, иммуно-серологические), используют молекулярно-генетические подходы, которые значительно расширяют возможности лабораторной диагностики инфекций, позволяя осуществлять прямое определение ДНК патогена в анализируемом материале [14]. Кроме того, наблюдается интеграция MALDI-TOF масс-спектрометрии (МС) в систему традиционных схем индикации и идентификации бруцелл [6, 8].

Одно из активно развивающихся направлений протеомных исследований — изучение возможности применения MALDI-TOF MS для выявления возбудителей инфекционных болезней, в том числе бруцелл, в клинических или иных контаминированных образцах без этапа выделения чистой культуры на стадии пробоподготовки [5]. Однако отсутствие регламентированных методик обеззараживания и подготовки исследуемых проб, а также универсального программного обеспечения для анализа клинических образцов методом MALDI-TOF MS является основной причиной относительно низкой воспроизводимости результатов масс-спектрометрии [4, 7, 10]. Метод MALDI-TOF

MS для исследования клинических образцов на наличие патогенов имеет ряд ограничений, которые связаны, в том числе, с низкой концентрацией возбудителя в материале [1, 13]. Сложность интерпретации полученных MALDI-TOF MS масс-спектров при анализе клинических образцов обусловлена существенной вариабельностью качественного и количественного состава белковых профилей аналитов, полученных от различных индивидуумов. В качестве эффективного решения указанной проблемы исследователями предложены различные способы предварительной подготовки проб: концентрирование, фракционирование, удаление мажорных фракций белков, селективное удаление небелковых примесей и др. [11].

Ранее нами была предложена схема идентификации культур возбудителя бруцеллеза методом MALDI-TOF MS, основанная на выявлении группы родоспецифичных фрагментов в диапазоне масс 2000 — 20000 Da ( $m/z \pm 5$  Da): 2422, 2581, 3025, 3268, 3336, 3523, 3696, 3754, 4545, 4770, 5036, 5170, 5360, 6672, 7048, 9085, 16068 [3]. Возможность применения этого подхода для выявления возбудителя бруцеллеза в клинических образцах не изучена.

Цель работы — оценка эффективности алгоритма выявления возбудителя бруцеллеза в искусственно контаминированных образцах крови с использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии.

Для реализации поставленной цели проведен MALDI-TOF MS анализ белковых экстрактов проб крови человека, искусственно контаминированной возбудителем бруцеллеза (модельные образцы крови), изучена эффективность разработанного нами алгоритма выявления бруцелл в модельных образцах крови, основанного на определении бруцелла-специфичных биомаркеров в белковых экстрактах с помощью метода MALDI-TOF масс-спектрометрии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали 26 культур бруцелл из коллекции патогенных микроорганизмов Ставропольского противочумного института: *B. abortus* 19 BA, 544, 1552, 870, C-68, 63-75, B-3196, Tulya, C-548, C-549, C-550, 19, C-497, C-551, C-499, 42, 381, 385, 390, 403, 420; *B. melitensis* 16-M, 63/9, 548, C-554, Rev-1.

В качестве объекта исследования использовали стабилизированную гепарином венозную кровь 30 условно здоровых человек (15 мужчин и 15 женщин в возрасте от 20 до 60 лет). Кровь отбирали в емкости для взятия венозной крови Vacutainer (Becton Dickinson International, США).

Питательные среды, реактивы: вода ультрачистая (тип I по ASTM) (систему Milli-Q, Millipore, США), деионизированная вода, спирт этиловый 96% (ГОСТ Р 51723-2001), кислота муравьиная ~98% (Sigma-Aldrich, США), ацетонитрил (степень чистоты «для ВЭЖХ-МС») (Sigma-Aldrich, США),  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричная кислота (степень чистоты «для МС») (Sigma-Aldrich, США), трифтороуксусная кислота >99% (Sigma-Aldrich, США), бактериальный тест-стандарт МВТ для внутренней калибровки масс-спектрометра (Bruker Daltonics, Германия). Культуры возбудителя бруцеллеза были выращены на агаре Альбими (производитель — Ставропольский противочумный институт), показатели качества: рН 7,2 — 7,4, прочность 300 — 380 г по Валенту, содержание аминного азота 100 — 120 мг %).

Одну бактериологическую петлю 48-часовой культуры бруцелл, выращенной на плотной питательной среде (бруцелла-агар), эмульгировали в стерильном изотоническом растворе натрия хлорида, затем по 1 мл приготовленной суспензии переносили в вакутейнеры со стабилизированной кровью объемом 3 мл, свободной от бруцеллезного инфекта. Искусственно контаминированные

бруцеллами образцы крови инкубировали 48 часов при 37°C. Аликвоту полученной взвеси объемом 2 мл центрифугировали при 2000 об/мин в течение 2 мин, полученную надосадочную жидкость удаляли. В дальнейшей работе использовали осадок, содержащий форменные элементы крови. Для удаления (лизиса) эритроцитов осадок разбавляли деионизированной водой в 10 раз, инкубировали 10 мин. Центрифугировали 3 мин при 2000 об/мин, супернатант удаляли. Процедуру повторяли до полного удаления эритроцитов. Суспензию отмытых лейкоцитов переносили в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 — 2 мл и центрифугировали при 15 500 об/мин 10 мин, супернатант удаляли.

Все этапы работы с культурами возбудителя бруцеллеза проводили в боксе биологической безопасности класса III или II-B.

Обеззараживание образцов, содержащих возбудитель бруцеллеза, проводили раствором 70% этилового спирта по ранее описанной методике [9]. Часть полученного осадка использовали для проверки на специфическую стерильность.

Для достижения соблюдения одинаковых условий с модельными образцами крови интактные пробы объемом 4 мл инкубировали при 37°C в течение 48 ч, после чего центрифугировали при 2000 об/мин 30 сек. Супернатант отбирали в пробирки типа эппендорф и центрифугировали при 15 500 об/мин 5 мин, затем осадок промывали деионизированной водой. Полученные белковые экстракты использовали в качестве отрицательного контроля.

Во время проведения теста на специфическую стерильность полученные образцы хранились при температуре минус 18 — 20°C, затем использовались для MALDI-TOF MS исследования.

Приготовленные белковые экстракты наносили на ячейки стального планшета для MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Германия) в объеме 1 мкл. Планшет сушили на открытом воздухе в течение нескольких минут с последующим наслоением поверх раствора матрицы, состоящего из  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричной кислоты в растворе, содержащем 500 мкл ацетонитрила, 475 мкл ультрачистой воды и 25 мкл трифторуксусной кислоты. Плашку высушивали на воздухе до образования кристаллов в течение 5 мин. Масс-спектры получали в линейном режиме на MALDI-TOF масс-спектрометре Microflex (Bruker Daltonics, Германия) при следующих параметрах: частота лазера 60 Гц, интенсивность лазера 10 — 50%, время задержки экстракции 110 нс P1E, напряжение первого источника ионов 19,4 kV, второго — 17,3 kV, напряжение фокусирующей линзы 8 kV, напряжение линейного детектора 2,500 kV, диапазон масс 2000 — 20 000 Da. Внутреннюю калибровку ранее указанного диапазона проводили с использованием точных значений масс бактериального тест-стандарта MBT (Bruker Daltonics, Германия). Суммарный масс-спектр генерировали из 20 случайно выбранных позиций каждой капли мишени (всего по 4000 выстрелов лазера). Для управления масс-спектрометром, включая установку режимов работы и регистрации масс-спектров, использовали программный пакет Daltonics flexControl v 3.3.64 (Bruker Daltonics, Германия), визуализацию и анализ полученных масс-спектров проводили в программе — flexAnalysis v 3.3.65. Формирование таблиц выполняли с использованием программных ресурсов пакета Microsoft Office 2010.

Для математико-статистической обработки данных использовали пакет прикладных программ Statistica v 10.0 (Statsoft Inc., США). Анализ групповых

различий оценивали по t-критерию Стьюдента для несвязанных выборок при 95% уровне значимости. Различия между выборками считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

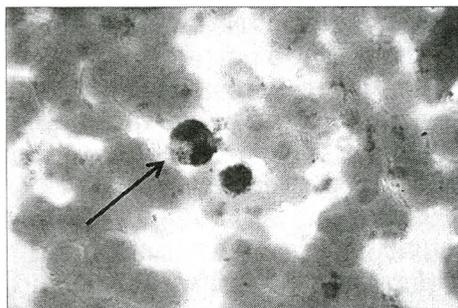
В ходе настоящего исследования использовали 30 проб крови человека. Из каждой пробы параллельно готовили три образца в двух повторах: 1, 2 — искусственно контаминировали культурой *B. melitensis* или *B. abortus*, 3 — использовали для получения белковых профилей интактной крови. Всего было исследовано 120 образцов, для каждого из которых получали не менее 30 масс-спектров с последующим формированием суммарного спектра образца. Наиболее репрезентативные спектры использовали для сравнительного анализа полученных данных. Воспроизводимость белковых профилей модельных образцов была подтверждена серией повторных измерений. При проведении масс-спектрометрического анализа проб, хранившихся до 3 сут при температуре минус 18 — 20°C, изменений основных характеристик сигналов масс-спектров не выявлено.

Ранее нами был предложен комплекс параметров для оценки качества масс-спектров чистых культур возбудителя бруцеллеза [3]. Учитывая особенности качественного и количественного состава сигналов масс-спектров экстрактов модельных образцов крови, а также экспериментальные данные, полученные в рамках настоящей работы, нами были приняты следующие параметры валидных масс-спектров: абсолютная интенсивность пиков  $I > 300$ , разрешение  $R > 150$ , общее число идентифицированных пиков от 65 до 100, отношение сигнал/шум — 10/1.

В результате инкубации искусственно контаминированной бруцеллами крови в образце достигалась необходимая концентрация бактериальных клеток для проведения MALDI-TOF MS анализа. Конечная концентрация бактерий в крови составляла около  $1 \times 10^4$  м.к./мл.

Из научных источников известно, что благодаря фагоцитозу бактериальных клеток микро- и макрофагами крови, бруцеллы локализуются преимущественно в лейкоцитах [12]. На рис. представлена полученная в ходе настоящего исследования микрофотография, иллюстрирующая фагоцитоз бруцелл в мазке крови, искусственно контаминированной возбудителем бруцеллеза.

При масс-спектрометрическом анализе модельных образцов крови, содержащих бруцеллы, Ferreira L. et al. предложили удалять в процессе пробоподготовки лейкоциты многократным центрифугированием и для последующего MALDI-TOF MS использовать полученный супернатант [5]. Учитывая внутриклеточную локализацию возбудителя бруцеллеза, по нашему мнению, целесообразно использовать в качестве образца для выявления микроорганизма белковый экстракт лейкоцитарной фракции крови. Для сравнительной оценки указанных вариантов пробоподготовки в ходе исследования



Мазок крови, искусственно контаминированной возбудителем бруцеллеза. Фагоцитоз бруцелл (стрелка).

Окраска азуром-II,  $\times 1000$  (микроскоп Nikon Eclipse E200, Япония; окуляр 10x (F.O.V. 20); объектив 100x1,25).

параллельно проводили MALDI-TOF MS анализ супернатанта и лейкоцитарной фракции образцов модельных образцов крови. При этом было установлено, что пик-листы масс-спектров лейкоцитарной фракции, как правило, более представительны (в среднем на  $20 \pm 2\%$ ), что может быть связано с чрезвычайно низкой концентрацией клеток возбудителя в полученном после центрифугирования супернатанте. Кроме того, интенсивность родоспецифичных фрагментов бруцелл на 30 — 40% превосходила аналогичные сигналы на масс-спектрах, полученных из сыворотки крови. Таким образом, использование белковых экстрактов лейкоцитарной фракции представляется более предпочтительным по сравнению с супернатантом при выявлении возбудителя бруцеллеза в крови методом MALDI-TOF MS.

Основное количество зарегистрированных пиков на масс-спектрах белковых экстрактов крови человека было локализовано в интервале значений масс 2300 — 16 100 Da рабочей области и составило  $80 \pm 10$ . На всех масс-спектрах встречались гомологичные сигналы, отличающиеся по абсолютной интенсивности ( $m/z \pm 5$  Da): 2581, 3268, 3352, 3372, 3440, 3467, 3486, 3508, 3613, 3711, 4230, 5226, 5290, 5422, 5674, 5935, 6345, 6576, 7090, 7353, 7570, 7935, 9414, 10088, 10442, 10830, 11100, 15131, 15866. В ходе работы были отмечены изменения количественных и качественных характеристик на масс-спектрах крови человека для указанных гомологичных сигналов: интенсивность — от 314 до 9533 a.i., разрешение пиков — от 157 до 2141, отношение сигнал/шум — от 10/1 до 30/1, ширина пика на полувысоте — от 7 до 375. При этом общие сигналы ( $m/z \pm 5$  Da): 2576, 3263 были обозначены ранее как потенциально специфичные для микроорганизмов рода *Brucella* [9]. Кроме того, следует отметить, что наибольшая относительная интенсивность на всех спектрах была характерна для фрагментов ( $m/z \pm 5$  Da): 3372, 3440, 3486, 5674, 6345, 7090, 7935. В то же время, масс-спектры отдельных образцов содержали единичные сигналы ( $m/z \pm 5$  Da): 3533, 4062, 4593, 5156, 8123, 10031, что может быть следствием присутствия в исследуемом экстракте переменных белковых фрагментов. Полученные данные масс-спектрометрического анализа белковых экстрактов крови условно здоровых людей были использованы при формировании результирующего пик-листа (супер-спектра).

Результаты подтверждают, что состав протеома крови человека динамичен и может изменяться в зависимости от текущих условий жизнедеятельности и состояния здоровья. Помимо присутствующих различий протеомного профиля крови у разных индивидуумов и его естественных изменений во времени, существуют вариации количественного и качественного набора белков, связанные с адаптивным ответом на изменение внешних условий. Также известно, что на белковый состав крови могут оказывать влияние различные факторы, в том числе питание, физическая активность, хронические заболевания и т.д. То есть, протеом человека в отличие от генома является ситуационным [Corzett T.H. et al., 2010]. Следовательно, возможные изменения белкового состава крови у различных индивидуумов будут сопровождаться появлением или элиминированием некоторых белков,  $m/z$  которых может совпасть с таковыми бруцелл. В связи с этим, при выявлении возбудителя бруцеллеза в клинических образцах, а также в крови методом MALDI-TOF MS важно учитывать переменность белкового состава исследуемого биоматериала.

Таким образом, MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ экстрактов крови человека позволил выявить неспецифичные фрагменты ( $m/z \pm 5$  Da): 2581, 3268, ранее используемые в схеме родовой идентификации культур воз-

будителя бруцеллеза. Учитывая состав белковых профилей крови человека и культур штаммов возбудителя бруцеллеза с одинаковым значением  $m/z$ , для выявления бруцелл в модельных и клинических образцах крови нами предложена схема анализа, включающая поиск 15 специфических фрагментов на соответствующих масс-спектрах ( $m/z \pm 5$  Da): 2422, 3025, 3336, 3523, 3696, 3754, 4545, 4770, 5036, 5170, 5360, 6672, 7048, 9085, 16068. Специфичность каждого из указанных сигналов будет уточнена в ходе дальнейших исследований, однако на основании присутствия всех 15 аналитически значимых сигналов на соответствующем спектре можно судить о наличии бруцелл в исследуемом образце.

На следующем этапе работы был осуществлен MALDI-TOF MS анализ экстрактов модельных образцов крови. При этом было определено, что основное количество зарегистрированных сигналов на масс-спектрах экстрактов образцов контаминированной возбудителем бруцеллеза крови человека локализуется в интервале значений масс 2300 — 16 100 Da и составляет  $80 \pm 10$ . Белковые профили всех исследуемых модельных образцов гемокультур содержали общие сигналы ( $m/z (\pm 5$  Da)): 2422, 2581, 3025, 3268, 3336, 3372, 3440, 3467, 3523, 3696, 3754, 4410, 4545, 4770, 5036, 5170, 5360, 6217, 6284, 6345, 6672, 7048, 7394, 7513, 7567, 7765, 7938, 9085, 15129, 16068. При этом интенсивность указанных фрагментов находилась в диапазоне от 2022 до 19541 a.i., разрешение — от 292 до 629, отношение сигнал/шум — от 10/1 до 21/1, ширина пика на полувысоте — от 7 до 52.

Кроме того, был установлен ряд особенностей белковых профилей экстрактов модельных образцов крови относительно соответствующих спектров интактной крови человека. В частности, на масс-спектрах экстрактов крови, содержащей культуры *B. abortus* 544, С-68, 63-75, В-3196, Tulya и С-548, интенсивность фрагментов ( $m/z \pm 5$  Da): 5226, 5290, 5422, 5674, 7353, 7565 в 3 — 5 раз превосходила интенсивность аналогичных сигналов интактной крови. Вероятно, это связано с интерференцией сигналов, присутствующих в модельных системах сходных по массе белков, которые содержатся в бактериальных экстрактах бруцелл и в крови человека. В то же время, было отмечено существенное снижение интенсивности в 10 и более раз сигналов ( $m/z \pm 5$  Da): 3372, 3440, 3467 на профилях модельных образцов крови, по сравнению с сигналами на масс-спектрах экстрактов интактной крови. Полученные данные могут свидетельствовать о возможном взаимодействии белков крови в модельных образцах с последующим удалением образовавшихся комплексов в процессе пробоподготовки. В то же время, для общих сигналов ( $m/z \pm 5$  Da): 6345, 7765, 7938 существенных изменений параметров не наблюдалось.

На масс-спектрах экстракта модельного образца крови, содержащей *B. abortus* 19 ВА, была отмечена группа достоверно воспроизводимых сигналов, отсутствующих на белковых профилях интактной крови ( $m/z \pm 5$  Da): 2202, 2224, 2291, 2305, 2319, **2422**, 2531, **2581**, 2635, 2729, 2848, 2876, 2894, 2943, 2995, **3025**, 3189, 3224, **3268**, **3336**, 3428, 3475, **3523**, **3696**, 3823, 3997, **3754**, 4258, **4545**, 4658, 4723, 4756, **4770**, 4897, 4925, **5036**, **5170**, 5534, 5580, 5611, 5749, 6123, 6286, 6314, **6672**, 6922, **7048**, 7591, 7794, 7853, 7881, 7908, 7966, 7995, 8022, 8048, 8341, **9085**, 9302, 10065, 10738, 11358, 12627, 15184, 15899.

Таким образом, нами было подтверждено сохранение выявленного ранее комплекса специфических для *Brucella* spp. сигналов в экстрактах модельных образцов крови. Кроме того, в указанной совокупности помимо 15 родоспецифических сигналов бруцелл (выделены курсивом) присутствовали дополнительные фрагменты, характерные только для модельных образцов крови.

Полученные спектральные характеристики экстрактов модельных образцов крови подтверждают предположение о том, что присутствие возбудителя бруцеллеза в значительной мере меняет белковый профиль крови в исследуемом диапазоне.

Наряду с этим, на масс-спектрах экстрактов модельных образцов крови были выявлены сигналы, отсутствующие на соответствующих профилях интактной крови человека и культур возбудителя бруцеллеза. Например, для модельных образцов крови, содержащих *B. abortus* 19 VA, комплекс указанных сигналов включал ( $m/z \pm 5$  Da): 2202, 2319, 2531, 2635, 2848, 2876, 3428, 3823, 3997, 4658, 4723, 4897, 4925, 5580, 5611, 5749, 6123, 6286, 7591, 7794, 7853, 7881, 7908, 7966, 7995, 8022, 8048, 8341, 9302, 10065, 10738, 11358, 12627, 15184, 15899. Для масс-спектров экстрактов модельных образцов крови, содержащих *B. melitensis* 548, выявленная группа специфических сигналов составила ( $m/z \pm 5$  Da): 2202, 2291, 2319, 2395, 2635, 2876, 2996, 3197, 3985, 4154, 4258, 4658, 4723, 5021, 5253, 5344, 5462, 5749, 6123, 6862, 7462, 7966, 8048, 8311, 8569, 8649, 8873, 8970, 9290, 10040, 10738, 11072, 11325, 15789, 16114, 16172, 16222, 16336, 16635, 16719.

Полученные результаты позволяют наглядно продемонстрировать изменение качественных характеристик белкового профиля крови человека в присутствии комплекса белков возбудителя бруцеллеза. Мы полагаем, что указанные фрагменты могут быть использованы в качестве диагностических маркеров при MALDI-TOF MS исследовании клинического материала, подозрительного на наличие возбудителя бруцеллеза наряду с ранее изученными родоспецифичными сигналами.

Таким образом, при сопоставлении полученных масс-спектрометрических данных нами охарактеризован комплекс сигналов, позволяющий достоверно дифференцировать интактную кровь условно здорового человека и контаминированную возбудителем бруцеллеза.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ломинадзе Г.Г., Семенова Е.А., Мотузова О.В., Калакуцкая А.Н., Лазарева А.В. Использование метода MALDI-TOF масс-спектрометрии для ускорения идентификации микроорганизмов в гемокультурах пациентов с подозрением на сепсис. *Лаборатория ЛПУ*. 2014, 4: 17-20.
2. Лямкин Г.И., Пономаренко Д.Г., Худолеев А.А., Русанова Д.В., Вилинская С.В., Куличенко А.Н. Обзор эпидемиологической ситуации по бруцеллезу в Российской Федерации в 2015 г. и прогноз на 2016 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016, 2: 11-13.
3. Ульшина Д.В., Ковалев Д.А., Бобрышева О.В., Лямкин Г.И., Худолеев А.А., Сирица Ю.В., Куличенко А.Н. Разработка алгоритма идентификации культур возбудителя бруцеллеза методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015, 4: 96-99.
4. Baranov A.A., Mayanskii A.N., Mayanskii N.A. A new epoch in medical microbiology. *Her. Russ. Acad. Sci.* 2015, 85 (6): 515-522.
5. Ferreira L., Castaño S.V., Sánchez-Juanes F. et al. Identification of *Brucella* by MALDI-TOF mass spectrometry. Fast and reliable identification from agar plates and blood cultures. *PLoS One*. 2010, 5 (12): 14235.
6. Grunow R., Jacob D., Klee S. et al. Brucellosis in a refugee who migrated from Syria to Germany and lessons learnt. *Euro Surveill*. 2016, 21 (31): 1-4.
7. Karger A., Melzer F., Timke M. et al. Interlaboratory comparison of intact-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry results for identification and differentiation of *Brucella* spp. *J. Clin. Microbiol.* 2013, 51 (9): 3123-3126.
8. Lasch P., Wahab T., Weil S. et al. Identification of highly pathogenic microorganisms by matrix-

- assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: Results of an interlaboratory ring trial. *J. Clin. Microbiol.* 2015, 53 (8): 2632-2640.
9. Lista F., Reubsaet F., De Santis R. et al. Reliable identification at the species level of *Brucella* isolates with MALDI-TOF-MS. *BMC Microbiology.* 2011, 11: 267.
  10. Nyvang H.G., Kvistholm J.A., Böcher S. et al. Mass spectrometry: pneumococcal meningitis verified and *Brucella* species identified in less than half an hour. *Scand. J. Infect. Dis.* 2010, 42 (9): 716-718.
  11. Šedo O., Sedláček I., Zdráhal Z. Sample preparation methods for MALDI-MS profiling of bacteria. *Mass Spectrometry Reviews.* 2011, 30 (3): 417-434.
  12. Vitr M.A., Mambres D.H., Deghelt M. et al. *Brucella melitensis* invades murine erythrocytes during infection. *Infect. Immunity.* 2014, 82 (9): 3927-3938.
  13. Yonetani S., Ohnishi H., Ohkusu K. et al. Direct identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF MS using an in-house saponin method. *Intern. J. Infect. Dis.* 2016, 52: 37-42.
  14. Zamanian M., Hashemi Tabar G.R., Rad M. et al. Evaluation of different primers for detection of *Brucella* in human and animal serum samples by using PCR method. *Archives Iranian Medicine.* 2015, 18 (1): 44-50.

Поступила 10.12.16

Контактная информация: Ульшина Диана Васильевна,  
355035, Ставрополь, ул. Советская. 13-15, р.т. (865 2)26-03-12

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

*А.В.Тришина, Е.А.Березняк, И.Р.Симонова,  
Л.М.Веркина, А.Ю.Березняк, М.В.Полева*

## **БИОРАЗНООБРАЗИЕ И АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ УСЛОВНО ПАТОГЕННЫХ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДОЕМОВ РОСТОВА-НА-ДОНУ**

Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт

*Цель.* Изучение биоразнообразия, чувствительности/устойчивости к антибактериальным препаратам (АБП) штаммов условно патогенных микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae*, выделенных из поверхностных водоемов Ростова-на-Дону в 2014 — 2016 гг. *Материалы и методы.* Определение родовой и видовой принадлежности энтеробактерий осуществляли по результатам совокупности биохимических тестов, используя программно-аппаратный комплекс MALDI Biotyper. Чувствительность к АБП определяли методом серийных разведений. *Результаты.* За время исследования было выделено 468 штаммов условно патогенных и патогенных энтеробактерий. Идентифицировано 20 родов, 33 вида микроорганизмов. Доминировали представители родов *Escherichia* (37,0%), *Enterobacter* (23,0%), *Klebsiella* (13,2%), *Citrobacter* (8,0%). Чувствительными ко всем АБП в 2014 г. были 8,5% выделенных штаммов, в 2015 г. — 5,2%, в 2016 г. микроорганизмов, чувствительных к АБП, не обнаружено. Количество полирезистентных изолятов нарастало в течение трех лет: в 2014 г. выделено 40,7% штаммов, в 2015 г. — 60,1%, в 2016 г. — 80,0%. Высокой активностью в отношении выделенных энтеробактерий обладали цефтриаксон, гентамицин и ципрофлоксацин. Наибольшую устойчивость фиксировали к ампициллину, налидиксовой кислоте, нитрофурантоину, ко-тримоксазолу. *Заключение.* Полученные результаты позволяют оценить динамику нарастания полирезистентных штаммов энтеробактерий, выделенных из поверхностных водоемов.

Журн. микробиол., 2017, № 4, С. 17—23

Ключевые слова: мониторинг, условно патогенные микроорганизмы, антибиотикорезистентность, поверхностные водоемы

## BIODIVERSITY AND ANTIBIOTICS RESISTANCE OF OPPORTUNISTIC PATHOGENIC ENTEROBACTERIA ISOLATED FROM SURFACE RESERVOIRS OF ROSTOV-ON-DON

Rostov-on-Don Research Institute for Plague Control, Russia

*Aim.* Study biodiversity, sensitivity/resistance to antibacterial preparation (ABP) of opportunistic microorganisms of *Enterobacteriaceae* family isolated from surface reservoirs of Rostov-on-Don in 2014 — 2016. *Materials and methods.* Determination of genus and species membership of enterobacteria was carried out by the results of a complex of biochemical tests using MALDI Biotyper program-apparatus unit. Sensitivity to ABP was determined by serial dilution method. *Results.* 468 strains of opportunistic and pathogenic enterobacteria were isolated during the study. 20 genera, 33 species of microorganisms were identified. *Escherichia* (37.0%), *Enterobacter* (23,0%), *Klebsiella* (13.2%), *Citrobacter* (8.0%) predominated. 8.5% of the strains isolated in 2014 were sensitive to ABP, 5.2% — in 2015; strains sensitive to ABP were not detected in 2016. The number of polyresistant isolates has increased during the last 3 years: 40.7% strains in 2014, 60.1% in 2015, 80,0% in 2016. Ceftriaxone, gentamycin and ciprofloxacin had high activity against the isolated enterobacteria. The highest resistance was documented against ampicillin, nalidixic acid, nitrofurane, co-trimoxazole. *Conclusion.* The data obtained allow to evaluate the dynamics of increase of polyresistant strains of enterobacteria isolated from surface reservoirs.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 4, P. 17—23

Key words: monitoring, opportunistic microorganisms, antibiotics resistance, surface reservoirs

### ВВЕДЕНИЕ

Деятельность человека приводит к негативным изменениям в окружающей среде, в том числе и в водных экосистемах. Основной путь микробного загрязнения — попадание в близлежащие озера, пруды, реки неочищенных городских отходов и сточных вод, резко изменяющих микробный пейзаж и санитарный режим водоемов. Вода в местах интенсивного антропогенного загрязнения характеризуется расширенным спектром микробиоценоза с увеличением таксономического разнообразия, в том числе представителей семейства *Enterobacteriaceae* [4].

Штаммы микроорганизмов, выделенные из водоемов, испытывающих мощное влияние промышленных, бытовых и речных стоков, обладают высокой антибиотикоустойчивостью, высокоадгезивными свойствами и цитотоксичностью, что является ответной реакцией на воздействие стрессового фактора и имеет как общебиологическое, так и важное эколого-эпидемиологическое значение [2].

Микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae* регулярно выделяются из почвы и воды, сохраняют жизнеспособность в широком диапазоне абиотических факторов среды [7]. Энтеробактерии, обладая значительным арсеналом приспособительных механизмов, способностью менять свойства, продуцировать различные ферменты вирулентности, вызывают энтеральные и парентеральные инфекции, число которых нарастает из года в год [5, 6, 9].

В последнее время появилось множество доказательств тому, что экологические места обитания, особенно водоемы, реки, озера, являются идеальной средой для распространения устойчивости к антибактериальным препаратам среди микроорганизмов [10]. Изучается чувствительность/устойчивость к АБП

различных микроорганизмов, выделенных из водоемов, в том числе представителей семейства *Enterobacteriaceae*. Такие исследования в настоящее время проводятся как в зарубежных странах (Португалия, Аргентина, Бразилия, Саудовская Аравия, Румыния, Китай, Сингапур, США, Канада, Швейцария) [15, 16, 18, 19], так и в России — в Восточной Сибири (река Ангара, Лена, озеро Байкал), в Волго-Каспийском регионе, в Челябинской области (река Миас) [1, 3, 8, 11, 12].

Важным аспектом контроля водных объектов является выявление некоторых патогенных и условно патогенных бактерий, таких как сальмонеллы, патогенные стафилококки, синегнойная палочка и другие. В странах Евросоюза в последнее время произошел переход от определения групп санитарно-показательных микроорганизмов к определению непосредственно самих санитарно-показательных микроорганизмов, что делает оценку качества воды более стандартизированной и достоверной [14].

Этиологическая значимость и потенциальная патогенность энтеробактерий обуславливают необходимость более тщательного изучения биоразнообразия данной группы возбудителей и природных мест их обитания.

Таким образом, для совершенствования региональной системы биологической безопасности является весьма актуальным изучение водных биотопов с целью получения базовой информации о составе и разнообразии патогенных и условно патогенных энтеробактерий, выявления доминирующей микрофлоры, ее сезонных колебаний и определения антибиотикорезистентности выделенных микроорганизмов.

Цель настоящего исследования — изучить биоразнообразие, распространенность и чувствительность/устойчивость к АБП штаммов условно патогенных и патогенных микроорганизмов (УПМ) семейства *Enterobacteriaceae*, выделенных из поверхностных водоемов Ростова-на-Дону в 2014 — 2016 гг.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Мониторинг УПМ, выделенных из поверхностных водоемов Ростова-на-Дону (реки Дон, Мертвый Донец, Темерник), проводили ежемесячно (с мая по сентябрь) в течение 3 лет (2014 — 2016 гг.).

Идентификацию микроорганизмов начинали с изучения морфологии выросших колоний на агаре Хоттингера ( $\text{pH} \pm 7,2$ ) и селективных средах: Эндо, Плоскирева, висмут-сульфит агаре. В целях ускорения исследования и значительного сокращения объема работы использовали хромогенную питательную среду (Hi Crom UTI Agar, Modified HiMedia, Индия) для одноэтапного выделения и прямой идентификации наиболее частых и значимых для санитарной микробиологии энтеробактерий. Определение родовой и видовой принадлежности условно патогенных бактерий осуществляли по результатам совокупности биохимических тестов (наборы RapiD 20 E и API 20 NE) производства BioMerieux, Франция. Для быстрой выборочной идентификации микроорганизмов использовали программно-аппаратный комплекс MALDI Biotyper. Масс-спектрометрический анализ проводили с использованием MALDI-TOF масс-спектрометра Autoflex («Bruker Daltonics», Германия). Для записи, обработки и анализа масс-спектров использовали программное обеспечение фирмы «Bruker Daltonics»: flexControl 2.4 (Build 38) и flexAnalysis 2.4 (Build 11).

Чувствительность к АБП определяли методом серийных разведений в агаре Mueller-Hinton (HiMedia). В работе использовали препараты — беталактамы: пенициллины (ампициллин), цефалоспорин III поколения (цефтриак-

сон), хинолоны (налидиксовая кислота, ципрофлоксацин), нитрофураны (фурагин); аминогликозиды (гентамицин); тетрациклины (доксицилин), а также амфениколы (левомицетин), комбинированные сульфаниламиды (ко-тримоксазол). Интерпретацию результатов проводили в соответствии с МУК 4.2.1890-04. Внутренний контроль качества исследований антибиотикочувствительности определяли с использованием контрольного штамма *E. coli* ATCC 25922. При характеристике микроорганизмов использовали общепринятые показатели: чувствительные, умеренно-резистентные и резистентные. Умеренно-резистентные и резистентные штаммы были объединены в категорию резистентные.

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью стандартных средств программы «Microsoft Office Excel». Статистическую значимость различий доли резистентных штаммов оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента при уровне значимости  $\alpha < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

За время исследования было выделено 468 штаммов условно патогенных и патогенных энтеробактерий (в 2014 г. — 130 штаммов, в 2015 г. — 193 штамма, в 2016 г. — 145 штаммов). Определены представители 20 родов, 33 видов микроорганизмов. Среди представителей семейства *Enterobacteriaceae* были идентифицированы микроорганизмы, относящиеся к родам: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Cronobacter*, *Salmonella*, *Pantoea*, *Proteus*, *Raoultella*, *Rahnella*, *Kluuyvera*, *Providencia*, *Serratia*, *Yersinia*, *Leclercia*, *Morganella*, *Ewingella*, *Erwinia*, *Hafnia*, *Plesiomonas*.

Проведенный микробиологический мониторинг поверхностных водоемов Ростова-на-Дону показал, что в отдельные годы и соответственно в течение всего периода наблюдения доминирующими микроорганизмами среди всех выделенных штаммов были представители родов *Escherichia* (37,0%), *Enterobacter* (23,0%), *Klebsiella* (13,2%), *Citrobacter* (8,0%).

Род *Escherichia* был представлен одним видом *E. coli*, среди рода *Enterobacter* нами идентифицировано 9 видов, в течение трехлетнего периода частота встречаемости *E. cloacae* и *E. asburiae* составила соответственно 10,0% и 7,0%. Из представителей рода клебсиелл, изолированных из проб воды, чаще всего выделяли *K. pneumoniae* (8,0%) и *K. oxytoca* (5,0%). Среди микроорганизмов рода *Citrobacter* часто встречались два вида: *C. freundii* (4,5%) и *C. braakii* (3,3%).

Резистентность к антимикробным препаратам является одной из важнейших фенотипических характеристик условно патогенной микрофлоры. Поэтому все выделенные в процессе мониторинга энтеробактерии были протестированы на чувствительность/устойчивость к антибактериальным препаратам.

По устойчивости к АБП все микроорганизмы в настоящем исследовании были разделены на четыре группы: чувствительные, монорезистентные, резистентные к двум АБП, полирезистентные. В соответствии с международными критериями в группу полирезистентных (обладающих множественной резистентностью) входят микроорганизмы с устойчивостью как минимум к трем различным группам АБП [17].

В 2014 г. 8,5% выделенных штаммов были чувствительны ко всем тестируемым в исследовании АБП. В 2015 г. число таких штаммов составило 5,2%. В 2016 г. микроорганизмов, чувствительных ко всем АБП, в нашем исследовании не выявлено.

Частота выделения монорезистентных энтеробактерий составила в 2014 и 2015 гг. 23,9% и 14,0% соответственно, в 2016 г. их доля снизилась до 9,7%. Такую же динамику мы наблюдали, анализируя антибиотикорезистентность к двум АБП. С 2014 по 2016 гг. доля таких штаммов снизилась с 26,9% до 10,3%. В то же время, количество полирезистентных изолятов заметно нарастало в течение трех лет: в 2014 г. выделено 40,7% штаммов, в 2015 г. — 60,1%, в 2016 г. — 80,0%. Различия долей монорезистентных штаммов, устойчивых к двум АБП, и полирезистентных штаммов, выделенных в 2014 г. и в 2016 г., статистически достоверны.

Представляло интерес проанализировать динамику чувствительности/устойчивости исследуемых микроорганизмов по каждому АБП.

Проведенные нами исследования показали, что наиболее высокий уровень устойчивости среди УПМ регистрировался к ампициллину. Так, в 2014 и 2015 гг. количество штаммов, устойчивых к этому антибиотику, составило 73,0% и 72,0% соответственно. В 2016 г. число ампициллинрезистентных штаммов возросло до 89%.

Нечувствительные к ко-тримоксазолу штаммы встречались на протяжении всего периода исследования: в 2014 и 2015 гг. резистентность фиксировалась на уровне 70,0%, в 2016 г. возросла до 84,2%.

Доля культур, устойчивых к нитрофурантоину, варьировала от 33,8% в 2014 г. до 75,2% в 2016 г.

За время наблюдения регистрировали нарастание частоты встречаемости водных изолятов энтеробактерий, устойчивых к налидиксовой кислоте. Так, в 2014 г. число таких штаммов составляло 23,0%, а в 2016 г. увеличилось почти в два раза, до 52,5%.

В 2014 г. нами зафиксировано всего 6,9% энтеробактерий, устойчивых к доксициклину, а к 2016 г. их доля возросла до 17,2%.

Устойчивость к левомицетину регистрировали в 2015 г. у 13,5% штаммов, в 2014 г. и 2016 г. количество резистентных изолятов распределилось в среднем на одном уровне — около 25,0%.

Анализ динамики антибиотикорезистентности по годам выявил нарастание устойчивости к гентамицину с 0,2% в 2014 г. до 4,8% в 2016 г., к цефтриаксону с 3,8% в 2014 г. до 8,9% в 2016 г. Удельный вес устойчивых вариантов к ципрофлоксацину вырос с 0,77% до 8,9%.

В процессе работы наряду с условно патогенными энтеробактериями были выделены патогенные представители рода *Salmonella*, которые являются важными санитарно-показательными микроорганизмами и свидетельствуют о регулярном поступлении в водоем значительных фекальных загрязнений. Из многочисленных возбудителей острых кишечных инфекций сальмонеллы представляют опасность вследствие того, что они чаще других возбудителей вызывают осложнения и в некоторых случаях способны формировать длительное носительство [13]. В наших исследованиях частота выделения сальмонелл в пробах воды составила в 2014 г. 2,7%, в 2015 г. — 3,1%, в 2016 г. — 8,5%.

По данным литературы у сальмонелл регистрируется увеличение выделения штаммов с множественной лекарственной устойчивостью. Заболевания, вызванные такими штаммами, отличаются более длительным инкубационным периодом и тяжелым течением заболевания, поскольку снижается эффективность антибактериальной терапии [13].

Сальмонеллы, выделенные в нашем регионе, по чувствительности/устойчивости к АБП распределились следующим образом: в среднем за три года

чувствительные изоляты выделяли в 19,0% случаев, резистентные к 1 АБП — в 38,0%, резистентные к 2 АБП — в 14,3%, резистентные к 3 и более АБП — в 28,6% случаев. Как и в случае с условно патогенными энтеробактериями, регистрировалось снижение количества штаммов, чувствительных и резистентных к 1 и 2 АБП и увеличение числа полирезистентных. Так, в 2014 г. 3,0% изолятов сальмонелл были чувствительны к АБП, 3,8% — монорезистентны, 1,5% — резистентны к 2 АБП. В 2015 г. чувствительных штаммов не выделено, 0,5% сальмонелл обладали устойчивостью к 1 и 2 АБП, 2,0% имели резистентность к 3 и более антибактериальным препаратам. Чувствительных к АБП штаммов в 2016 г. не регистрировали, доли монорезистентных и полирезистентных сальмонелл составили по 1,4%.

В результате проведенного мониторинга в течение трехлетнего периода получены следующие данные:

В структуре представителей семейства Enterobacteriaceae, выделенных из поверхностных водоемов Ростова-на-Дону, доминировали представители родов *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*.

Высокой антибактериальной активностью в отношении выделенных энтеробактерий обладали цефтриаксон, гентамицин и ципрофлоксацин.

Наибольшую устойчивость штаммов УПМ фиксировали к ампициллину, налидиксовой кислоте, нитрофурантоину, ко-тримоксазолу.

Наблюдается снижение доли штаммов, чувствительных, резистентных к 1 и 2 АБП, и увеличение доли полирезистентных условно патогенных и патогенных энтеробактерий.

Анализ результатов проведенного исследования дает возможность оценить риск появления и распространения мультирезистентных штаммов энтеробактерий в окружающей среде, позволяя предотвратить вспышки заболеваний, вызванных антибиотикорезистентными штаммами.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Анганова Е.В., Курносоев А.Д., Самойлова И.Ю. и др. Антибиотикорезистентность бактерий микробиоценозов водных объектов как показатель антропогенной нагрузки на водоем (на примере реки Лены). Сибирский медицинский журнал. 2008, 1: 75-77.
2. Бузалева Л.С., Ким А. В., Компанец Г. Г. и др. Проявление патогенных свойств у морских бактерий под влиянием антропогенного загрязнения. Экология человека, 2016. 3: 30-36.
3. Веркина Л.М., Березняк Е.А., Титова С.В. и др. Мониторинг антибиотикорезистентности условно патогенных микроорганизмов поверхностных водоемов. Медицинский альманах, 2014. 4: 46-48.
4. Воробьева Т.Я. Пространственно-временная структура гетеротрофного бактериопланктона экосистемы устьевой области реки Северная Двина. Автореф. дисс. канд. биол. наук. Сыктывкар, 2005.
5. Габидуллин Ю.З. Особенности некоторых свойств, определяющих патогенный потенциал сокультивируемых вариаций бактерий *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *E.coli*, *Proteus*. Автореф. дисс. д-ра мед. наук. Челябинск, 2015.
6. Егорова С.А., Макарова М.А., Кафтырева Л.А. Этиологическая значимость условно-патогенных энтеробактерий при острых кишечных заболеваниях и дисбиотических состояниях кишечника. Инфекции и иммунитет. 2011, 2: 181-184.
7. Евтеева Н.И. Биоразнообразие энтеробактерий в природных местообитаниях Нижегородской области. Автореф. дисс. канд. биол. наук. Нижний Новгород, 2009.
8. Журавлев П.В., Алешня В.В., Головина С.В. Мониторинг бактериального загрязнения водоемов Ростовской области. Гигиена и санитария. 2010, 5: 33-36.
9. Загайнова А.В. Разработка подходов к оценке риска возникновения бактериальных

- кишечных инфекций, распространяемых водным путем. Автореф. дисс. канд. биол. наук. М., 2010.
10. Ларцева Л.В., Обухова О.В., Бармин А.Н. Экологическая и биологическая опасность резистентности условно-патогенной микрофлоры к антибиотикам. *Российский журнал прикладной экологии*. 2015, 4: 47-52.
  11. Обухова О.В., Ларцева Л.В. Мониторинг антибиотикорезистентности энтеробактерий, выделенных от судака (*stizostedion lucioperca*), и воды в местах его обитания. *Вестник АГТУ. Сер.: рыбное хозяйство*. 2013, 1: 65-74.
  12. Обухова О.В., Ларцева Л.В. Особенности антибиотикорезистентности энтеробактерий в дельте р. Волги. *Гигиена и санитария*. 2014, 3: 21-23.
  13. Решетнева И.Т., Перьянова О.В., Дмитриева Г.М., Остапова Т.С. Антибиотикорезистентность сальмонелл, выделенных на территории Красноярского края. *Гигиена и санитария*. 2015, 2: 35-38.
  14. Тымчук С.Н., Ларин В.Е., Соколов Д.М. Наиболее значимые санитарно-микробиологические показатели оценки качества питьевой воды. *Водоснабжение и санитарная техника*. 2013, 11: 8-14.
  15. Alzahrani A.M., Gherbawy Y. A. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains isolated from water springs in Al-Ahsa Region. *African J. Microbiol. Res.* 2011, 5: 123-130.
  16. Czekalski N., Berthold T., Caucci S. et al. Increased levels of multiresistant bacteria and resistance genes after wastewater treatment and their dissemination into lake Geneva, Switzerland. *Front. Microbiol.* 2012, 3: 1-17.
  17. Magiorakas A.P., Srinivasan A., Carey R.B., Carmeli Y. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012, 3: 268-281.
  18. Pereira A., Santos A., Tacão M. Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* from Tagus estuary. *Portugal Science Total Environment*. 2013, 1: 65-71.
  19. Yang Y., Zhang T., Zhang X. et al. Quantification and characterization of  $\beta$ -lactam resistance genes in 15 sewage treatment plants from East Asia and North America. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2012, 5: 1351-1358.

Поступила 07.03 17

Контактная информация: Тришина Алена Викторовна, к.б.н.,  
344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40, р.т. (863)234-23-11

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

Л.И.Краснопрошина, Т.А.Серова, Е.П.Фошина, И.В.Бишева, С.А.Сходова

## ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СХЕМАХ ПРИМЕНЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ ИММУНОВАК ВП-4

НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, Москва

*Цель.* Изучение динамики иммунологических показателей у больных с хроническими бактериальными инфекциями при разных схемах введения вакцины Иммуновак ВП-4. *Материалы и методы.* У больных (20 чел., 18 — 50 лет), распределенных в две группы по типу введения вакцины, дважды (до и через 0,5 — 1,5 месяца после курса вакцинотерапии) оценивали параметры системного иммунитета и уровень специфических антител различных изотипов в сыворотке крови и слюне к вакцинным антигенам *Staphylococcus aureus* и *Klebsiella pneumoniae*. *Результаты.* Местная вакцинация приводила к повышению только уровня IgA в слюне к обоим бактериальным антигенам, при этом показатели системного иммунитета до и после вакцинации не различались. Подкожная вакцинация повышала уровень сывороточных антител А- и G-изотипов к обоим бактериальным антигенам, нормализовывала сниженный уровень CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов и повышенное значение иммунорегуляторного индекса; наблюдалась тенденция к повышению процента CD3<sup>+</sup> Т-клеток и снижению процента CD4<sup>+</sup> Т-хелперов. *Заключение.* Для получения комплекс-

ного эффекта вакцинотерапии необходимо разработать оптимальную схему ее сочетанного применения, которая даст возможность одновременно достичь долгосрочного не только местного, но и системного антибактериального иммунитета, а также проявить ее иммуномодулирующее действие в отношении клеточного звена.

Журн. микробиол., 2017, № 4, С. 23—30

Ключевые слова: Иммуновак ВП-4, схемы вакцинотерапии, антибактериальный иммунитет, динамика иммунологических показателей

L.I.Krasnoproshina, T.A.Serova, E.P.Foshina, I.V.Bisheva, S.A.Skhodova

## FEATURES OF IMMUNE RESPONSE DURING VARIOUS SCHEMES OF USE OF BACTERIAL THERAPEUTIC VACCINE IMMUNOVAC VP-4

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

*Aim.* Study the dynamics of immunologic parameters in patients with chronic bacterial infections during various schemes of administration of Immunovac VP-4 vaccine. *Materials and methods.* Parameters of systemic immunity and levels of specific antibodies of various isotypes in blood sera and saliva against vaccine antigens of *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* were evaluated in patients (20 individuals, 18 — 50 years of age) distributed into 2 groups by vaccine administration type twice (before and 0,5 — 1,5 months after vaccine therapy course). *Results.* Local vaccination resulted in an increase of only IgA levels in saliva and both bacterial antigens, whereas parameters of systemic immunity before and after vaccination did not differ. Subcutaneous vaccination increased the level of sera antibodies of A- and G- isotypes against both bacterial antigens, normalized the decreased level of CD8<sup>+</sup> lymphocytes and an increased value of the immune regulating index; a tendency of increase of the percentage of CD3<sup>+</sup> T-cells and reduction of the percentage of CD4<sup>+</sup> T-helpers was observed. *Conclusion.* An optimal scheme of a combined vaccine therapy should be developed to obtain a complex effect, that would allow to simultaneously reach long-term local and systemic antibacterial immunity, as well as show immune modulating effect regarding cell compartment.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 4, P. 23—30

Key words: Immunovac VP-4, vaccine therapy schemes, antibacterial immunity, dynamics of immunologic parameters

## ВВЕДЕНИЕ

В течение последних десятилетий клинические иммунологи и врачи других специальностей констатируют значительный рост числа больных различными рецидивирующими инфекционно-воспалительными заболеваниями, вызванными наиболее распространенными условно патогенными возбудителями гнойно-воспалительных процессов, такими как *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris* [2]. При этом у данных пациентов выявляются определенные нарушения в функционировании как системного, так и местного иммунитета, а также изменение микробиоценоза слизистых оболочек в сторону преобладания условно патогенной флоры, что ведет к затяжному и хроническому течению заболевания [6]. Такие пациенты нуждаются в проведении иммуномодулирующей терапии, и наиболее перспективным для этой группы больных можно считать применение иммуномодуляторов бактериальной природы.

Приоритетное место среди таких препаратов занимают терапевтические бактериальные вакцины (Бронхомунал, Имудон, ИРС-19, Рузам, Паспат), содержащие лизаты одного или нескольких видов условно патогенных микро-

организмов. Механизм действия препаратов бактериальной природы связан не только с активацией выработки специфических антител, но и с иммуномодулирующим воздействием на клеточное звено иммунной системы. Бактериальные вакцины, стимулируя врожденный и адаптивный иммунитет, в то же время, являются истинными иммуномодуляторами, так как усиливают иммунный ответ только при его недостаточности и подавляют иммунные реакции при их избыточности [5].

Наряду с вышеперечисленными зарубежными препаратами для терапии и профилактики воспалительных заболеваний бактериальной природы применяется первая отечественная бактериальная терапевтическая поликомпонентная вакцина Иммуовак ВП-4, разработанная в НИИВС им. И.И. Мечникова под руководством проф. Н.Б. Егоровой. Иммуовак ВП-4 включает в себя лизаты четырех условно патогенных микроорганизмов (*S.aureus*, *K.pneumoniae*, *P.vulgaris*, *E.coli*), которые содержат так называемые молекулы патоген-ассоциированных образов (PAMPs — pathogen-associated-molecular-patterns), представленные липополисахаридами, пептидогликанами, тейхоевыми кислотами и белковыми антигенами клеточных стенок. Так как PAMPs могут синтезироваться только микроорганизмами, их распознавание PAMPs-рецепторами врожденного иммунитета сигнализирует о присутствии в организме бактериальной инфекции, что приводит к запуску начальных этапов иммунного ответа [3]. Высокий терапевтический эффект применения Иммуовак ВП-4 при различных нозологических формах инфекционных [1, 9, 10] и неинфекционных [4, 7] патологий человека, скорее всего, обусловлен широким спектром механизмов ее воздействия на иммунную систему. К таким механизмам, вероятно, в первую очередь относится активация врожденного иммунитета через содержащуюся в препарате оптимальную комбинацию PAMPs молекул — агонистов TLRs [3], программирование дифференцировки Т-лимфоцитов по Th1-типу [8], нормализация фагоцитарной активности моноцитов и нейтрофилов [10] и абсолютного количества лимфоцитов CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD72<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup> [4, 8, 9].

В настоящее время разрешены две схемы применения вакцины Иммуовак ВП-4: инъекционная (5 — 7 подкожных введений) только для взрослых и назально-оральная комбинированная вакцинация (апликация препарата на слизистую носа с последующим приемом внутрь в виде капель) для детей и взрослых. Однако полученные к настоящему времени данные о влиянии способа введения Иммуовак ВП-4 на параметры иммунного статуса не дают возможности выбрать оптимальную схему применения вакцины при тех или иных его индивидуальных показателях у больных инфекционно-воспалительными заболеваниями. Исходя из этого, существует необходимость проведения комплексного сравнительного изучения воздействия Иммуовак ВП-4 на параметры системного и местного иммунитета при разных схемах ее применения.

Цель работы — изучение динамики показателей системного иммунитета и специфических антител различных изоформ к антигенам *S.aureus* и *K.pneumoniae* в сыворотке и слюне у больных с хроническими бактериальными инфекциями при назально-оральной и подкожной схемах введения вакцины Иммуовак ВП-4.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Наблюдали 20 больных в возрасте 18 — 50 лет с хроническим рецидивирующим фурункулезом и хроническими очагами бактериальной инфекции ЛОР-органов (хронический синусит, рецидивирующий средний отит,

хронический тонзиллит), распределенных в две группы по типу введения вакцины. Первая группа (1), 11 человек, получила комбинированное назально-оральное введение Иммуновак ВП-4: три раза интраназально в возрастающих дозах с интервалом между введениями в 1 сутки, через 1 — 3 суток 8 раз перорально (от 2 до 4 мл) с интервалом в 3 — 5 суток. Вторая группа (2), 9 человек, получила 5 подкожных инъекций в дозе 0,1 мл через 3 — 5 суток. Иммунотерапия проводилась при информированном согласии пациентов. У больных дважды (до и через 0,5 — 1,5 месяца после последнего введения препарата) оценивали показатели клеточного иммунитета, концентрацию сывороточных иммуноглобулинов G, A, M классов и уровень специфических антител различных изотипов в сыворотке крови и слюне к антигенам *S.aureus* и *K.pneumoniae*, входящим в состав вакцины. Концентрацию иммуноглобулинов трех классов в сыворотке крови определяли методом радиальной иммунодиффузии в агаровом геле с использованием тест-наборов «Моно-РИД-G, A, M» производства НПО «Микроген». Определение популяций и субпопуляций лимфоцитов проводили методом проточной цитометрии на цитофлюориметре «FC500» с помощью моноклональных антител фирмы «Beckman Coulter» с маркерами CD45+CD3+ — T-клеток, CD45+CD3+CD4+ — T-хелперов, CD45+CD3+CD8+ — T-цитотоксических киллеров, CD45+CD3-CD19+ — B-лимфоцитов, CD45+CD3-CD16+CD56+ — натуральных киллеров. Иммунорегуляторный индекс (ИРИ) рассчитывали как отношение процентного количества T-хелперов к T-цитотоксическим киллерам.

Определение IgG, IgA, IgM к препаратам клеточных стенок *S.aureus* (штамм 1986) и *K.pneumoniae* (штамм 204) в сыворотке и IgG, IgA в слюне проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием моноклональных антител против соответствующих классов иммуноглобулинов («Полигност», С.-Петербург). Для постановки реакции использовали полимерные плоскодонные разборные 96-луночные планшеты, сорбированные антигенами *S.aureus* в концентрации 2,5 мкг/мл и *K.pneumoniae* в концентрации 5 мкг/мл. Для определения титров антител G-изотипа, специфичных к *S.aureus*, сыворотки начинали титровать с разведения 1:1000, для A-изотипа — с 1:500, M-изотипа с 1:100. При оценке в сыворотке антител, специфичных к *K.pneumoniae*, ее титровали соответственно для G-изотипа с 1:100, A- и M-изотипов — с 1:10. Уровень антител в исследуемых образцах выражался значением обратного титра, при котором оптическая плотность равнялась 0,3. Воспроизводимость модифицированной нами методики ИФА оценивалась по коэффициенту вариации при проведении многократной постановки реакции со стандартными образцами, представляющими собой соответственно пул сывороток или слюны, разбавленных 1:1 стабилизирующим раствором. Внутрисерийная воспроизводимость по данному показателю составляла не более 3%, а межсерийная не превышала 10%, что соответствует общепринятым стандартам для ИФА.

Результаты обрабатывались методами непараметрической статистики с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.1, данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха от 25 до 75%. Значимость различий величин в каждой группе до и после лечения оценивали по критерию Вилкоксона с уровнем значимости  $p < 0,1$ . Сравнение показателей в двух разных группах проводили по критерию Манна-Уитни с  $p_{MU} < 0,05$ , для сравнения групп по полу использовали точный критерий Фишера с  $p_F < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

До начала исследования две сравниваемые группы больных были сопоставимы по полу ( $p_F=0,36$ ) и возрасту ( $p_{MU}=0,47$ ) и статистически значимо не различались ни по одному исследуемому показателю ( $p_{MU}>0,05$ ). Динамика уровня специфических антител различных изотипов в сыворотке и слюне у больных в группах 1 и 2 до и после применения Иммуновак ВП-4 представлена в табл. 1.

Полученные данные показали, что уровень бактериальных специфических антител колебался в различных диапазонах в зависимости от природы антигена, вида исследуемого биоматериала и их изотипа. Значения обратных титров антител G- и A-изотипов к *S.aureus* в сыворотке были на порядок выше, чем к *K.pneumoniae*. При этом уровень сывороточных бактериальных антител к *S.aureus* G-изотипа более чем в 10 раз превышал соответствующие значения для антител A-изотипа, а уровень антител M-изотипа был более чем в 10 раз ниже значений для A-изотипа. В слюне, также как и в сыворотке, уровень бактериальных антител к стафилококкам был значительно выше, чем к клебсиеллам. Следует отметить, что титры бактериальных антител в слюне были значительно ниже сывороточных, при этом уровень антител A-изотипа практически всегда был выше антител G-изотипа.

Определение специфических антител у больных группы 1 через 0,5 — 1,5 месяца после начала назально-орального введения поливалентной вакцины выявило статистически значимое повышение у них только уровня IgA в слюне к обоим исследуемым бактериальным антигенам. Уровень IgA в слюне к

Таблица 1. Динамика изменения уровня специфических антител к *S.aureus* и *K.pneumoniae* при разных схемах введения Иммуновак ВП-4

Антиген	Биоматериал	Изотип антител	Обратные титры антител, Ме (25—75%)					
			Группа 1 (n=11) Назально-оральная схема введения ВП-4			Группа 2 (n=9) Подкожная схема введения ВП-4		
			до лечения	после лечения	p	до лечения	после лечения	p
<i>S.aureus</i>	Сыворотка	A	993,0 (525,0—2444,0)	809,5** (544,5—2988,5)	0,74	1893,0 (1251,0—3284,0)	4147,0** (1392,0—533,0)	0,01*
		G	15917,5 (4790,0—26335,0)	13521,0 (9088,0—29031,0)	0,4	13421,0 (6675,0—25263,0)	22578,0 (6772,0—25371,0)	0,05*
		M	100,5 (50,0—251,0)	128,5 (50,0—277,5)	0,34	166,0 (54,0—470,0)	144,5 (34,5—365,0)	0,6
	Слюна	A	34,0 (10,0—52,0)	41,5 (12,0—111,0)	0,07*	26,0 (18,0—116,0)	32,5 (16,0—114,0)	0,6
		G	34,5 (9,5—47,5)	19,0 (8,5—39,5)	0,61	11,5 (9,0—32,0)	19,5 (8,0—41,0)	0,12
		M	20,0 (5,0—48,0)	38,0 (8,0—86,0)	0,91	18,0 (5,0—32,0)	34,0 (13,0—141,0)	0,75
<i>K.pneumoniae</i>	Сыворотка	A	56,05 (25,0—67,0)	70,5** (29,0—136,0)	0,14	115,0 (36,0—199,0)	277,0** (174,0—808,0)	0,02*
		G	356,0 (112,0—616,0)	724 (335,0—968,0)	0,17	194,0 (164,0—84,0)	387,0 (256,0—6200,0)	0,04*
		M	20,0 (5,0—48,0)	38,0 (8,0—86,0)	0,91	18,0 (5,0—32,0)	34,0 (13,0—141,0)	0,75
	Слюна	A	9,0 (1,0—11,0)	16,0 (3,0—27,0)	0,03*	14,5 (13,0—23,0)	17,0 (10,0—31,0)	0,22
		G	1,0 (1,0—1,0)	1,0 (1,0—1,0)		1,0 (1,0—1,0)	1,0 (1,0—1,0)	
		M	20,0 (5,0—48,0)	38,0 (8,0—86,0)	0,91	18,0 (5,0—32,0)	34,0 (13,0—141,0)	0,75

Примечание. \* Статистически значимые различия внутри групп до и после лечения (здесь и в табл. 2), \*\* статистически значимые различия между группами 1 и 2 после лечения ( $p_{MU}<0,05$ ).

Таблица 2. Динамика изменения показателей системного иммунитета при разных схемах введения вакцины Иммуовак ВП-4

Показатели	Значения показателей Me (25–75%)						Нормальные значения [11]
	Группа 1 (n=11) Назально-оральная схема введения ВП-4			Группа 2 (n=9) Подкожная схема введения ВП-4			
	до лечения	после лечения	p	до лечения	после лечения	p	
IgG, мг/мл	12,5 (8,7–17,8)	12,5 (9,2–14,8)	0,57	13,45 (10,8–13,8)	10,95 (9,1–13,1)	0,25	8,0–16,5
IgA, мг/мл	2,5 (2,1–3,2)	2,2 (1,6–3,1)	0,62	1,48 (0,9–2,7)	1,6 (1,4–3,8)	0,35	0,9–3,2
IgM, мг/мл	1,7 (1,4–2,1)	1,5 (1,25–1,85)	0,31	1,8 (1,6–2,2)	1,55 (1,4–2,2)	0,92	0,8–2,7
CD3 <sup>+</sup> , %	77,5 (68,5–79,0)	76,5 (70,5–78,0)	0,92	74,0 (66,0–79,0)	76,0 (69,0–84,0)	0,12	72,0 (67,0–76,0)
CD3 <sup>+</sup> , абс.	1637,7 (791,6–2060,5)	1384,3 (943,2–2028,2)	0,86	992,6 (857,0–1638,0)	1368,0 (932,4–1527,0)	0,86	1400,0 (1100,0–1700,0)
CD4 <sup>+</sup> , %	41,5 (38,0–46,0)	41,5 (37,0–49,5)	0,61	42,0 (40,0–52,0)	38,0 (35,0–43,0)	0,12	42,0 (38,0–46,0)
CD4 <sup>+</sup> , абс.	653,8 (407,2–1021,5)	589,9 (367,3–1045,0)	0,4	416,8 (300,7–851,7)	483,2 (342,0–699,3)	0,61	800,0 (700,0–1100,0)
CD8 <sup>+</sup> , %	30,5 (26,5–32,0)	27,0 (25,5–33,0)	0,93	24,0 (21,0–31,0)	36,0 (30,0–41,0)	0,09*	35,0 (31,0–40,0)
CD8 <sup>+</sup> , абс.	432,0 (221,0–657,0)	381,1 (254,3–577,8)	0,87	343,9 (238,2–398,2)	457,7 (242,4–670,0)	0,12	700,0 (500,0–900,0)
ИРИ	1,5 (1,25–1,68)	1,4 (1,2–1,9)	0,87	1,76 (0,9–2,3)	1,1 (0,8–1,6)	0,06*	1,2 (1,0–1,5)
CD19 <sup>+</sup> , %	11,0 (9,0–13,0)	11,0 (10,0–13,0)	0,5	9,0 (6,0–16,0)	10,0 (5,0–11,0)	0,75	13,0 (11,0–16,0)
CD19 <sup>+</sup> , абс.	244,7 (123,0–368,3)	224,0 (149,5–383,3)	1,0	151,2 (115,3–240,6)	126,0 (109,7–258,0)	1,0	300,0 (200,0–400,0)
CD16 <sup>+</sup> , %	12,0 (8,5–16,5)	10,0 (8,0–17,0)	0,67	12,0 (10,0–18,0)	12,0 (4,0–18,0)	0,35	14,0 (10,0–19,0)
CD16 <sup>+</sup> , абс	247,7 (100,2–433,9)	178,2 (171,8–214,5)	0,87	196,5 (107,1–352,3)	181,8 (83,8–221,1)	0,4	300,0 (200,0–400,0)

*S.aureus* увеличился ( $p=0,07$ ) с  $Me=34,0$  до  $Me=41,0$ ; а к *K.pneumoniae* ( $p=0,03$ ) – с  $Me=9,0$  до  $Me=16,0$ . Значения антител класса G в слюне в результате назально-орального введения Иммуовак ВП-4 статистически значимо не изменялись ни к одному антигену, при этом обратные титры IgG к *K.pneumoniae* в слюне не превышали единицы. Также у больных в этой группе не было выявлено статистически значимых изменений после лечения в отношении титров сывороточных бактериальных антител всех изотипов к двум исследуемым антигенам.

Проведение курса подкожной вакцинации Иммуовак ВП-4 больным группы 2 привело к статистически значимому увеличению в их сыворотке антител А- и G-изотипов к обоим бактериальным антигенам. Уровень IgA к *S.aureus* вырос ( $p=0,01$ ) более, чем в 2 раза, с  $Me=1893,0$  до  $Me=4147,0$ , а IgG с  $Me=13421,0$  до  $22579,0$  ( $p=0,05$ ). При этом показатель IgA к *K.pneumoniae* увеличился ( $p=0,02$ ) с  $Me=115,0$  до  $Me=277,0$ , а IgG повысился ( $p=0,04$ ) с  $Me=194,0$  до  $Me=387,0$ . Уровень антител А- и G-изотипов к обоим антигенам в слюне больных группы 2 после проведения подкожной вакцинотерапии статистически значимо не изменился.

Динамика показателей системного иммунитета при разных схемах введения вакцины Иммуовак ВП-4 представлена в табл. 2. У больных двух изучаемых групп содержание сывороточных иммуноглобулинов всех трех классов было в пределах нормы и после проведения иммунотерапии статистически

значимо не изменилось. Все изучаемые нами показатели клеточного иммунитета у больных, принимавших Иммунак ВП-4 по назально-оральной схеме (группа 1), до и после вакцинации статистически не различались.

Проведение больным курса подкожной вакцинации (группа 2) приводила к статистически значимым сдвигам в показателях клеточного иммунитета: сниженный уровень CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов, относящихся к субпопуляции Т-цитотоксических клеток, повысился ( $p=0,09$ ) до нормальных значений с  $Me=24,0$  (21,0 – 31,0) до  $Me=36,0$  (30,0 – 41,0). При этом повышенное значение ИРИ до лечения ( $Me=1,76$ ) статистически значимо ( $p=0,06$ ) снизилось до нормальных значений ( $Me=1,1$ ).

Следует отметить, что у этих больных наблюдалась тенденция ( $p=0,12$ ) к повышению процентного количества CD3<sup>+</sup> Т-клеток с  $Me=74,0$  до  $Me=76,0$  и снижению ( $p=0,12$ ) процента CD4<sup>+</sup> Т-хелперов с  $Me=42,0$  до  $Me=38,0$ , при этом их значения входили в 50% интервал нормы.

Если до проведенного лечения сравниваемые группы статистически значимо не различались ни по одному исследуемому показателю, то после они достоверно различались по двум показателям (таб.1): уровню специфических антител А-изотипов в сыворотке к *S.aureus* ( $p_{MU}=0,012$ ) и к *K. pneumoniae* ( $p_{MU}=0,006$ ). Назально-оральное применение вакцины в отличие от подкожного не приводило к возрастанию уровня бактериальных антител в сыворотке. Эти статистические различия свидетельствуют о различных иммунных механизмах воздействия вакцины при ее местном и инъекционном применении.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время накоплено значительное количество литературных данных по воздействию вакцины Иммунак ВП-4 на различные звенья иммунной системы при ее назально-оральном применении у детей и инъекционном использовании у взрослых. Описано иммунокорректирующее действие вакцины на антительный ответ к бактериальным антигенам, входящим в ее состав: методом РПГА установлено, что местное применение Иммунак ВП-4 у детей приводило к повышению изначально низких титров антител в сыворотке к *K.pneumoniae*, *S.aureus*, *P.vulgaris*, а исходно высокие титры достоверно снижались [1]. Местная вакцинотерапия оказывала иммуномодулирующее действие на показатели клеточного иммунитета у детей — повышение содержания лимфоцитов периферической крови, несущих маркеры CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD72<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, при исходно низких значениях и снижение их — при исходно высоких [1, 9].

В нашем исследовании местное введение вакцины взрослому контингенту больных привело только к одному, но довольно долгосрочному иммунологическому эффекту — статистически значимому увеличению после 0,5 — 1,5 месяца по окончании курса уровня антибактериальных антител А-изотипа в слюне, но не в сыворотке, создав тем самым эффективную мукозальную защиту. При этом, местный курс вакцинации не вызвал значимых сдвигов в показателях системного иммунитета взрослых больных.

Подкожное введение поливалентной вакцины приводило к более значительным множественным воздействиям на иммунные показатели, которые проявлялись как в увеличении продукции специфических антител G- и А-изотипов в сыворотке крови, так и в модуляции некоторых параметров клеточного иммунитета: в первую очередь, в отношении CD8<sup>+</sup>-клеток и иммунорегуляторного индекса. Полученные нами результаты вполне согласуются с данными литературы об иммуномодулирующем эффекте парентерально-

го применения вакцины в отношении сывороточных IgG к S.aureus [10] и лимфоцитов CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> [9,10].

Проведенное сравнительное изучение влияния двух схем применения вакцины на показатели местного и системного иммунитета выявило, что у взрослого контингента, в отличие от детей, местное введение вакцины Иммунак ВП-4 не влияет на показатели системного иммунитета, но создает долгосрочную эффективную мукозальную защиту. Поэтому для получения комплексного эффекта воздействия вакцины необходимо разработать для взрослого контингента больных оптимальную схему сочетанного ее применения — назально-орального с инъекционным, которое даст возможность одновременно достичь долгосрочного не только местного, но и системного антибактериального иммунитета, а также проявить ее иммуномодулирующее действие в отношении клеточного звена.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Балаболкин И.И., Булгакова В.А., Краснопрошина Л.И., Курбатова Е.А. Опыт применения вакцины Иммунак ВП-4 при бронхиальной астме у детей. Педиатрия. 2007, 86 (6): 86-89.
2. Вакцины и вакцинация. Национальное руководство. Под ред. В.В.Зверева, Б.Ф.Семенова, Р.М.Хайтова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011.
3. Егорова Н.Б., Курбатова Е.А., Грубер И.М., Семенова И.Б., Михайлова И.А., Зверев В.В. Новый тип вакцин с комбинацией агонистов Toll-подобных рецепторов — TLRs 1/2,4,5,6,9. Журн. микробиол. 2011, 4: 44-48.
4. Егорова Н.Б., Курбатова Е.А. Иммунотерапевтическая концепция использования микробных антигенов при атопии и патологии, ассоциированной с условно-патогенной микрофлорой (на примере поликомпонентной вакцины Иммунак ВП-4). Медицинская иммунология. 2008, 10 (1): 13-20.
5. Караулов А.В. Иммуномодуляция при респираторных инфекциях: от понимания целей и механизмов действия к клинической эффективности. Детские инфекции. 2012, 3: 62-64.
6. Костинов М.П. Вакцинация взрослых с бронхолегочной патологией. М.: Арт студия «Созвездие», 2013.
7. Немыкина О.Е., Егорова Н.Б., Щербакова Б.В. и др. Иммунологические показатели при терапии атопического дерматита у детей поликомпонентной вакциной Иммунак ВП-4. Журн. микробиол. 2005, 5: 45-49.
8. Осипова Г.Л. Оптимизация патогенетической терапии бронхиальной астмы и других аллергических заболеваний. Автореф. дис. д-ра мед. наук. М., 2003.
9. Слатинова О.В. Динамика показателей системного и местного иммунитета у пациентов с бронхолегочными заболеваниями при применении поликомпонентной вакцины. Автореф. дис. канд. биол. наук. М., 2000.
10. Сорокина Е.В., Масюкова С.А., Курбатова Е.А., Егорова Н.Б. Терапевтическая бактериальная вакцина Иммунак в комплексном лечении пациентов с хронической пиодермией. Журн. микробиол. 2010, 4: 31-37.
11. Hannel I., Erkeller-Yuksel F., Lydyard P. et al. Developmental and maturational changes in human blood lymphocyte subpopulations. Immunology Today. 1992, 13 (6): 215-218.

*Поступила 12.01.17*

Контактная информация: Серова Татьяна Александровна, к.б.н.,  
105064, Москва, М.Казенный пер., 5а, р.т. (495) 916-31-28

*Т.Ю.Загоскина, Е.А.Чапоргина, Е.Ю.Марков, Ю.О.Попова,  
Т.М.Долгова, О.В.Гаврилова, Т.С.Тайкова, С.В.Балахонов*

## **ДОТ-ИММУНОАНАЛИЗ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АНТИТЕЛ, МЕЧЕННЫХ НАНОЧАСТИЦАМИ КОЛЛОИДНОГО ЗОЛОТА, ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ БОТУЛИНИЧЕСКОГО ТОКСИНА В КЛИНИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ И ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ**

Иркутский научно-исследовательский противочумный институт

*Цель.* Конструирование тест-системы для дот-иммуноанализа с использованием наночастиц коллоидного золота в качестве маркера специфических антител для детекции ботулинического токсина в клиническом материале и пищевых продуктах. *Материалы и методы.* В качестве маркера специфических антител использовали наночастицы золота с диаметром частиц 20 нм. IgG выделяли из поливалентной сыворотки диагностической против ботулотоксинов типов А, В, С, Е, F производства НПО «Аллерген» (Ставрополь) активностью 5000 — 10 000 МЕ. Ботулотоксин в клиническом материале (сыворотки крови) от 3 больных с установленным клиническим диагнозом «ботулизм», а также пищевом продукте (солянка грибная домашняя) определяли методом дот-иммуноанализа на нитроцеллюлозной мембране. *Результаты.* Во всех исследованных образцах (сыворотки крови от 3 больных и солянка грибная домашняя) обнаружен ботулинический токсин, который регистрировался у больного № 1 в разведении исследуемого образца 1:2112, у больного № 2 — 1:32, у больного № 3 — 1:1056, в пищевом продукте — 1:8. В отрицательном контроле (чистые культуры возбудителей дизентерии и кишечного иерсиниоза, сыворотках крови больного ОКИ и здорового человека, а также в консервированной фасоли в томатном соусе и консервированном зеленом горошке) ботулотоксин не обнаруживали. *Заключение.* Разработана высокочувствительная специфичная тест-система для дот-иммуноанализа на основе коммерческих противоботулинических антител, меченных частицами коллоидного золота, которая позволяет обнаруживать ботулотоксины в течение 2 ч в объеме 1 — 2 мкл исследуемого образца.

Журн. микробиол., 2017, № 4, С. 31—35

Ключевые слова: ботулинический токсин, наночастицы золота, дот-иммуноанализ

*T. Yu. Zagoskina, E. A. Chaporgina, E. Yu. Markov, Yu. O. Popova,  
T. M. Dolgova, O. V. Gavrilova, T. S. Taikova, S. V. Balakhonov*

## **DOT-IMMUNOASSAY USING GOLD NANOPARTICLE MARKED COLLOID GOLD FOR THE DETECTION OF BOTULINIC TOXIN IN CLINICAL MATERIAL AND FOOD PRODUCTS**

Irkutsk Research Institute for Plague Control, Russia

*Aim.* Construction of test-systems for dot-immunoassay using colloid gold nanoparticles as a marker of specific antibodies for the detection of botulinic toxin in clinical material and food products. *Materials and methods.* 20 nm gold nanoparticles were used as a marker of specific antibodies. IgGs were isolated from polyvalent diagnostic sera against type A, B, C, E, F botulin toxins produced by SPC Allergen (Stavropol) with 5000 — 10 000 ME activity. Botulin toxin in clinical material (blood sera) from 3 patients with established botulism clinical diagnosis as well as food product (home-made mushroom soup solyanka) was determined by dot immunoassay on nitrocellulose membrane. *Results.* Botulin toxin was detected in all the studied samples (blood sera from 3 patients and the soup) that was registered in the patient No. 1 at the 1:2112 dilution of the studied sample, in patient No. 2 — 1:32, in patients No. 3 — 1:1056, in the food product — 1:8. Botulin toxin was not detected in the negative control (pure cultures of the dysentery causative agents and intestine yersinosis, blood sera of the patient with AII and a healthy individual, as well as canned beans in tomato sauce and canned green peas). *Conclusion.* A highly

sensitive specific test-system was developed for dot-immunoassay based on the commercial anti-botulin antibodies labelled with colloid gold particles that allows to detect botulin toxins within 2 hours in the sample volume of 1 — 2  $\mu$ l.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 4, P. 31—35

Key words: botulin toxin, gold nanoparticles, dot-immunoassay

## ВВЕДЕНИЕ

В последние годы в связи с необходимостью обеспечения импортозамещения актуальны разработки простых, чувствительных и специфичных тест-систем с использованием отечественных реактивов и оборудования, пригодных для экспресс-детекции патогенов, в том числе в недостаточно оснащенных лабораториях, в полевых условиях, в работе санитарно-эпидемиологических бригад в режиме ЧС и т. п.

Технически подобные подходы представлены большим разнообразием иммунохроматографических, иммунофльтрационных и так называемых дот-блот методик, в которых в качестве твердой фазы используют соответствующие мембранные подложки, а в качестве маркеров — различные молекулярные метки: флуоресцирующие вещества, ферменты, золи тяжелых металлов (чаще — коллоидного золота) и дисперсные красители.

Использование препаратов коллоидного золота (КЗ) в твердофазных методах иммуноанализа находит достаточно широкое применение в лабораторной практике, в частности, для экспресс-диагностики некоторых особо опасных инфекционных болезней: чумы, бруцеллеза, туляремии, псевдотуберкулеза [1, 3, 4, 6]. Реализация этих методов осуществляется постановкой традиционного дот-иммуноанализа. Достоинством использования наночастиц КЗ являются возможность получения маркеров определенного заданного размера и соответственно использование их в качестве различных меток, что позволяет идентифицировать сразу 2–3 вещества на одном и том же объекте [8]. Процедура получения КЗ и его комплексов с антителами довольно проста, экспрессна, предусматривает использование одноэтапной методики приготовления диагностического препарата. Применение КЗ в твердофазных методах иммуноанализа основано на интенсивной красной окраске этого маркера, позволяющей определять результаты реакции визуально. Более того, чувствительность анализа можно повысить, используя технику усиления окрашивания адсорбированного на мембране золота серебром. Этот эффект основан на реакции, применяемой в фотографии и получившей название «физического проявления» [5]. КЗ катализирует восстановление ионов серебра (из соли) до металлического серебра. Образующаяся вокруг частиц золота оболочка металлического серебра, в свою очередь, ускоряет восстановление золота, и реакция становится автокаталитической, при этом чувствительность анализа повышается на порядок [2].

Ботулинические токсины (БТ) — яды биологического происхождения II группы патогенности — с высокой вероятностью могут быть использованы в качестве поражающих агентов при совершении актов биологического и химического терроризма. Люди чрезвычайно чувствительны к ботулотоксинам.

Детекцию ботулотоксинов согласно схеме проведения специфической индикации осуществляют двумя методами: постановкой реакций пассивной гемагглютинации (РПГА) и биологической нейтрализации токсина на мышах

(РБНТ) с использованием диагностических противоботулинических поли- и моновалентных сывороток типов А, В, С, Е и F. Ориентировочный ответ в РБНТ выдается через 2 суток, окончательный — через 4 — 8 суток. К сожалению, в ряде случаев отсутствует возможность проведения работ с лабораторными животными, да и сроки получения результатов в РБНТ длительны. В связи с ограниченной разрешающей способностью агглютинационных методов диагностики, в РПГА не всегда удается обнаружить небольшое количество токсина в клиническом материале, положительном в РБНТ.

Цель исследования — конструирование тест-системы для дот-иммуноанализа с использованием наночастиц коллоидного золота в качестве маркера специфических антител для детекции ботулинического токсина в клиническом материале и пищевых продуктах.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве источника специфических антител использовали цельную сыворотку диагностическую противоботулиническую поливалентную против типов А, В, С, Е, F производства НПО «Аллерген» (Ставрополь) активностью 5000 — 10 000 МЕ, из которой выделяли фракцию иммуноглобулина G (IgG) комбинированным методом с использованием каприловой кислоты и сульфата аммония [7].

Для получения золя коллоидного золота с диаметром частиц 20 нм, наиболее подходящего для использования в качестве диагностикума в ДИА, 0,01% раствор золотохлористоводородной кислоты доводили до кипения, добавляли установленное количество свежеприготовленного 1% раствора цитрата натрия, кипятили 10 мин. Цвет раствора при этом изменялся от бледно-желтого и бледно-голубого до цвета красного вина. По завершении процесса восстановления золота цвет раствора стабилен.

Получение комплекса коллоидного золота с противоботулиническими антителами (диагностикум) проводили при легком перемешивании на магнитной мешалке в течение 5 мин при  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  добавлением к раствору IgG золя золота. Далее последовательно с интервалом в 5 мин добавляли 0,5% водный раствор полиэтиленгликоля (ПЭГ-20 000) и 1% бычий сывороточный альбумин (БСА), перемешивая дополнительно 5 минут. Очистку диагностикума от непрореагировавших компонентов проводили центрифугированием (15 000x g, 15 мин). Осадок суспендировали в 0,01 М фосфатном буфере pH 7,4, содержащем 0,2 мг/мл ПЭГ-20 000; 0,15 М NaCl; 0,1% БСА и 0,1% азида натрия.

Постановку дот-иммуноанализа и учет результатов осуществляли следующим образом: исследуемый материал наносили в виде капель объемом 1 — 2 мкл на мембранный фильтр, заранее обработанный в течение 1 ч при комнатной температуре поливалентной диагностической противоботулинической сывороткой в разведении 1:100, мембрану подсушивали на воздухе в течение 10 — 15 мин, помещали в чашку Петри и дважды промывали забуференным физиологическим раствором pH 7,2, содержащим 0,05% твина 20 (ФБР-твин). Далее фильтр погружали на 30 мин в 2% раствор БСА на ФБР, блокируя возможные свободные участки на иммуносорбенте. После последующего двукратного промывания ФБР-твином «заблокированный» мембранный фильтр погружали на 1 час в приготовленный диагностикум — раствор IgG из поливалентной противоботулинической сыворотки, меченный коллоидным золотом (IgG=КЗ). Затем мембранный фильтр дважды промывали дистиллированной водой и один раз 0,2 М цитратным буфером pH 3,7. Учет результатов

реакции проводили после погружения на 5 — 10 мин в раствор проявителя (0,11 г лактата серебра, растворенного в 1 мл дистиллированной воды, добавленного в 0,85% раствор гидрохинона в 0,2 М цитратном буфере pH 3,7). Из-за светочувствительности лактата серебра реакцию рекомендуется проводить в темноте. Операцию останавливали погружением мембраны на 5 мин в раствор фотографического фиксажа (гипосульфит натрия) с последующим промыванием дистиллированной водой и подсушиванием на воздухе.

Регистрация результатов ДИА — визуальная. В исследуемых образцах, содержащих ботулинический токсин, и в параллельно поставленном положительном контроле (заведомо положительный материал от больных с установленным клиническим диагнозом «ботулизм») формировались четкие окрашенные в разные оттенки серого цвета пятна. При отсутствии в исследуемых образцах ботулотоксина и в отрицательном контроле окрашенных пятен не было, мембрана оставалась белой.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Испытание тест-системы для ДИА проводилось на клиническом материале (сыворотки крови) от 3 больных с установленным клиническим диагнозом «ботулизм», а также пищевом продукте (солянка грибная домашняя). Согласно направлению на исследование, это были члены одной семьи, употреблявшие в пищу консервированный продукт собственного изготовления.

В качестве отрицательного контроля использованы пищевые продукты (консервированная фасоль в томатном соусе, консервированный зеленый горошек), чистые культуры *Shigella flexneri* 6850 и *Yersinia enterocolitica* И-76 и клинический материал (сыворотка крови больного ОКИ и здорового человека).

В ходе постановки дот-иммуноанализа во всех исследованных образцах (сыворотки крови от 3 больных и солянка грибная домашняя) обнаружен ботулинический токсин, проявляющийся на мембране в местах нанесения проб в виде темно-серых пятен: ботулинический токсин регистрировался у больного № 1 в разведении исследуемого образца 1:2112, у больного № 2 — 1:32, у больного № 3 — 1:1056, в пищевом продукте — 1:8. Общее время проведения анализа составило около 2 часов. В отрицательном контроле (чистые культуры возбудителей дизентерии и кишечного иерсиниоза, сыворотках крови больного ОКИ и здорового человека, а также в консервированной фасоли в томатном соусе и консервированном зеленом горошке) ботулотоксин не обнаруживался, что свидетельствовало о высокой специфичности разработанной тест-системы. Параллельно этот материал исследовался в РБНТ. Нами отмечено, что результаты, полученные в ДИА, полностью совпадали с результатами реакции биологической нейтрализации токсина на мышах.

Разработанная нами тест-система для дот-иммуноанализа на основе коммерческих противоботулинических антител, меченных частицами коллоидного золота, проста в приготовлении, не требует дорогостоящего приборного обеспечения, эффективна при определении ботулинического токсина в клиническом материале и пищевом продукте, ДИА с ее использованием демонстративен, позволяет обнаруживать ботулотоксины в течение 2 ч в объеме 1 — 2 мкл исследуемого образца, высокочувствителен (положительные результаты в дот-иммуноанализе полностью совпадали с положительными результатами РБНТ, чувствительность которой при выявлении ботулинического токсина, по данным литературы, составляет 40 пг) и специфичен (отсутствие перекрестного реагирования с чистыми культурами возбудителей дизентерии

и кишечного иерсиниоза, сыворотками крови от больного ОКИ и здорового человека, с качественными пищевыми продуктами).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Загоскина Т.Ю., Балахонов С.В., Марков Е.Ю., Николаев В.Б., Субычева Е.Н., Чапоргина Е.А., Михайлов Е.П., Бодрых О.Б., Попова Ю.О. Апробация диагностических тест-систем с использованием наночастиц серебра в качестве маркеров специфических антител для скрининга исследуемого материала на наличие антигенов возбудителей чумы, бруцеллеза, туляремии и ботулотоксина в дот-иммуноанализе. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2014, 4: 61-64.
2. Загоскина Т.Ю., Голубинский Е.П., Меринов С.П., Полтавченко А.Г., Марков Е.Ю. Современные подходы к конструированию диагностических тест-систем с использованием неорганических корпускулярных меток. Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. 2004, 1 (2): 176-180.
3. Загоскина Т.Ю., Калиновский А.И., Марков Е.Ю., Докорина А.А., Голубинский Е.П. Использование специфических антител, меченных частицами коллоидного серебра, для выявления антигенов бруцелл методом дот-иммуноанализа. Клиническая лабораторная диагностика. 2002, 6: 38-39.
4. Загоскина Т.Ю., Чеснокова М.В., Климов В.Т., Попова Ю.О., Марков Е.Ю., Старикова О.А. Конструирование тест-системы с наночастицами коллоидного серебра для обнаружения возбудителей псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза в дот-иммуноанализе. Журн. микробиол. 2017, 1: 55-61.
5. Картужанский А.Л., Красный-Адмони Л.В. Химия и физика фотографического процесса. Л., Химия, 1987.
6. Носкова О.А., Загоскина Т.Ю., Субычева Е.Н., Марков Е.Ю., Попова Ю.О., Гриднева Л.Г., Михайлов Е.П. Применение дот-иммуноанализа для выявления антигенов чумного микроба в полевом материале. Проблемы особо опасных инфекций. 2014, 3: 69-71.
7. McKinney M.M., Parkinson A. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid. J. Immunol. Meth. 1987, 96 (2): 271-278.
8. Panfilova E., Shirokov A., Khebtsov B. et al. Multiplexed dot immunoassay using Ag nanocubes, Au/Ag alloy nanoparticles, and Au/Ag nanocages. Nano Research. 2012, 5 (2): 124-134.

Поступила 10.03.17

Контактная информация: Загоскина Татьяна Юрьевна, д.м.н., 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78, р.т. (3952)22-01-39

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

*М.Л.Леденева<sup>1</sup>, А.С.Водопьянов<sup>2</sup>, Г.А.Ткаченко<sup>1</sup>,  
С.О.Водопьянов<sup>2</sup>, С.С.Савченко<sup>1</sup>, И.М.Шпак<sup>1</sup>*

## **ВЫЯВЛЕНИЕ INDEL-МАРКЕРОВ В ГЕНОМАХ ШТАММОВ BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI ДЛЯ ВНУТРИВИДОВОГО ГЕНОТИПИРОВАНИЯ**

<sup>1</sup>Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт, <sup>2</sup>Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт

*Цель.* Поиск потенциальных INDEL-маркеров в геномах штаммов Burkholderia pseudomallei, а также оценка возможности их использования для внутривидового генотипирования. *Материалы и методы.* Изучены полногеномные последовательности 25 штаммов B. pseudomallei с известными географическими регионами выделения из базы данных GenBank. Поиск INDEL-маркеров осуществляли с использованием авторского программного обеспечения GeneExpert. Кластерный анализ проводили с помощью генетической дистанции по R. Sokal и C. Michener и метода ближайшего связывания. *Результаты.* Выявлено 11 INDEL- маркеров, которые позволили разделить исследуемые штаммы на

13 генотипов. Определен спектр INDEL-паттернов, характерный для австралийских штаммов. Показана возможность существования определенных филогеографических паттернов тайландских изолятов. *Заключение.* Выявлена возможность INDEL-маркеров дифференцировать изоляты *B. pseudomallei* на две географические популяции (австралийского и юго-восточноазиатского происхождения), которая позволит определять источник вспышки мелиоидоза и пути распространения возбудителя.

Журн. микробиол., 2017, № 4, С. 35—41

Ключевые слова: *Burkholderia pseudomallei*, INDEL-маркеры, генотипирование

*M.L.Ledeneva*<sup>1</sup>, *A.S.Vodopianov*<sup>2</sup>, *G.A.Tkachenko*<sup>1</sup>,  
*S.O.Vodopianov*<sup>2</sup>, *S.S.Savchenko*<sup>1</sup>, *I.M.Shpak*<sup>1</sup>

## DETECTION OF INDEL-MARKERS IN GENOMES OF *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* STRAINS FOR INTRA-SPECIES GENOTYPING

<sup>1</sup>Volgograd Research Institute for Plague Control, <sup>2</sup>Rostov-on-Don Research Institute for Plague Control, Russia

*Aim.* Search for potential INDEL-markers in genomes of *Burkholderia pseudomallei* strains, as well as evaluation of the possibility of their use for intra-species genotyping. *Materials and methods.* Full-genome sequences of 25 *B. pseudomallei* strains with known geographic regions of isolation from GenBank database were studied. INDEL-marker search was carried out using authors' program GeneExpert. Cluster analysis was carried out using genetic distance by R. Sokal and C. Michener and neighbor joining method. *Results.* 11 INDEL-markers were detected that allowed to split the studied strains into 13 genotypes. Spectrum of INDEL-patterns characteristic for Australian strains was determined. A possibility of existence of certain phylogeographic patterns of Thailand isolates is shown. *Conclusion.* A possibility of INDEL-markers to differentiate isolates of *B. pseudomallei* into 2 geographic populations (Australian and South-eastern Asia origin) that allows to determine the source of melioidosis outbreak and transmission routes of the pathogen is detected.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 4, P. 35—41

Key words: *Burkholderia pseudomallei*, INDEL-markers, genotyping

## ВВЕДЕНИЕ

Возбудитель мелиоидоза — *Burkholderia pseudomallei* — естественный обитатель водных и почвенных биоценозов Юго-Восточной Азии, Северной Австралии, а также ряда других тропических и субтропических регионов мира [9]. Регистрация случаев мелиоидоза в странах умеренного климатического пояса определяет возможности возникновения спорадических случаев этой инфекции в любом регионе мира [4, 6]. Возбудитель мелиоидоза в национальных системах классификации особо опасных бактериальных патогенов России, США и ряда европейских стран включен в список потенциальных агентов террористической угрозы [3]. В связи с этим, одним из наиболее важных вопросов, который необходимо решать всякий раз при возникновении вспышек мелиоидоза как естественного характера, так и связанных с возможными актами биотерроризма является вопрос о происхождении и путях распространения возбудителя. С этой целью используют методы генетического типирования, позволяющие осуществлять выявление степени сходства между штаммами микроорганизмов.

Одним из таких методов является молекулярное INDEL-типирование, в основе которого лежит феномен спонтанных вставок/делеций (insertion/deletion) нескольких нуклеотидов. Данный метод был успешно применен для

генотипирования как микроорганизмов [2, 7], так и человека [10]. Для филогенетического анализа штаммов *B. pseudomallei*, принадлежащих к одному сиквенс-типу, A. Sawana et al. впервые использовали комбинированный набор однонуклеотидных и INDEL-полиморфизмов [13]. Однако большинство выявленных в данном исследовании INDEL-маркеров было представлено локусами с tandemными повторами (VNTR — variable number tandem repeat). Высокий полиморфизм VNTR-локусов лежит в основе метода мультилокусного анализа числа варьируемых tandemных повторов MLVA (multiple-locus variable number tandem repeat analysis), являющегося эффективным для изучения микроэволюционных событий и исключения клонального характера вспышек. Однако подверженность VNTR-локусов гомоплазии исключает их использование для выявления филогенетического родства географически отдаленных штаммов.

Целью настоящей работы являлся поиск потенциальных INDEL-локусов с помощью компьютерного анализа полногеномных нуклеотидных последовательностей штаммов *B. pseudomallei* и оценка возможности их использования в качестве маркеров генотипирования, позволяющих выявлять географическую приуроченность.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись полногеномные последовательности 25 штаммов *B. pseudomallei* с известными географическими регионами выделения из базы данных Национального центра биотехнологической информации США (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>): 13 штаммов *B. pseudomallei* из Австралии (в скобках указан идентификационный номер) — MSHR491 (NZ\_CP009485.1; NZ\_CP009484.1), MSHR733 (KN323063.1; KN323064.1), PFGE\_B T6 (KN150983.1; KN150984.1), TSV 48 (NZ\_CP009161.1; NZ\_CP009160.1), NAU35A-3 (NZ\_CP004377.1; NZ\_CP004378.1), BED (KN150913-KN150925), MSHR146 (NZ\_CP004042.1; NZ\_CP004043.1), NAU20B-16 (NZ\_CP004003.1; NZ\_CP004004.1), BEB (KN150858.1; KN150859.1), MSHR5848 (NZ\_CP008909.1; NZ\_CP008910.1), BDP (NZ\_CP009209.1; NZ\_CP009210.1), MSHR520 (NZ\_CP004368.1; NZ\_CP004369.1), NCTC 13178 (NZ\_CP004001.1; NZ\_CP004002.1); 7 штаммов *B. pseudomallei* из Таиланда — K96243 (NZ\_CP009538; NZ\_CP009537), 3921g (NZ\_LK936442.1; NZ\_LK936443.1), 406e (NZ\_CP009298.1; NZ\_CP009297.1), 576 (NZ\_CP008777.1; NZ\_CP008778.1), 1710b (NC\_007434.1; NC\_007435.1), 1026b (NC\_017831.1; NC\_017832.1), 1106a (NZ\_CP008758.1; NZ\_CP008759.1); 2 штамма из Малайзии — M1 (NZ\_CP016638.1; NZ\_CP016639.1), 982 (NZ\_CP012576.1; NZ\_CP012577.1); 2 штамма из Тайваня — vgh16R (NZ\_CP012515.1; NZ\_CP012516.1), vgh07 (NZ\_CP010973.1; NZ\_CP010974.1) и 1 штамм из Китая — BPC006 (NC\_018527.1; NC\_018529.1).

Поиск INDEL-маркеров проводили с использованием авторского программного обеспечения GeneExpert, написанного на языке Java. Подбор праймеров к найденным локусам осуществляли с помощью компьютерного моделирования полимеразной цепной реакции *in silico* [1]. Кластерный анализ выполняли методом ближайшего связывания (neighbor-joining) на основе коэффициента генетической дистанции по R. Sokal и C. Michener с помощью программы Treecon for Windows v.1.3b [11, 14]. Для оценки достоверности топологии полученной дендрограммы использовали бутстрэп-анализ (bootstrap analysis) для 1000 репликаций.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнительный анализ геномов 25 штаммов *B. pseudomallei*, проведенный по каждому гену (или открытой рамке считывания) с использованием программы GeneExpert, позволил выявить ряд генов, отличающихся по длине у различных штаммов за счет вставок/делений. Для последующего изучения

нами были отобраны 11 таких локусов, к которым были сконструированы праймеры, фланкирующие области INDELs (табл. 1).

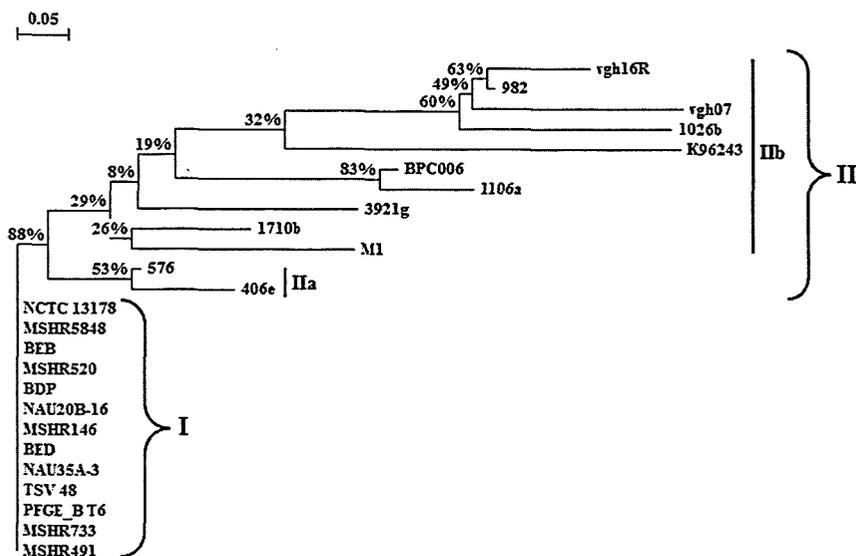
Установлено, что все выявленные локусы являлись вариабельными и со-держали по два аллельных варианта. Результаты INDEL-типирования 25

Таблица 1. INDEL-локусы, выявленные в геномах штаммов *Burkholderia pseudomallei* при проведе-нии компьютерного анализа

Локус	Кодируемый признак	Праймеры для проведения амплификации	Размеры аллелей (п.о.)
RS30420	ABC транспортер сульфоната (Sulfonate ABC transporter)	ATGACAACGACGCACTCG GAATTTCCACGCGAGCAC	114/102
RS22905	Субъединица SecA белка-транслоказы (Protein translocase subunit SecA)	GAGTTCAGCAGCCGATT ATCGCGTGGCCAACCATCT	98/86
RS29185	Гипотетический белок (Hypothetical protein)	GCAGGCGCGTTTTCTCGT GGGCGGCGAAAATCATAGC	116/106
RS11930	Гипотетический белок (Hypothetical protein)	AAGTCGACGGCAGCTGAG ACGGATAGCGCTCGAACCG	153/141
RS23965	Белок MutL репарации ДНК (DNA mismatch repair protein MutL)	GTTCGGCCGCAAGGACAC CGGCATGGTCGCGTAGAG	127/118
RS12365	Гидролаза (Hydrolase)	GATCTCGCCTCCGATCTTGC CGGCGTGTGCGCATCGTC	81/75
RS07305	Ацилтрансфераза (Acyltransferase)	ATCTGGCCGATGCTTTC TGCGACACATGATCTCGAC	79/70
RS16330	Субстрат-связывающий катион ABC транспортера (Cation ABC transporter substrate-binding)	ACGCATGTTTTGCCTTGTT ATTTTGAGTGTGCGTCTCG	153/135
RS26065	Субъединица С экзонуклеазы ABC (Excinuclease ABC subunit C)	CTCGCGGGCGATATCGAAG TCACGGTCTTCGCCTCAGTC	136/124
RS12945	Нерибосомальная пептид-синтетаза (Non-ribosomal peptide synthetase)	CCGAGGTCGAACCTGGGAAC GGCCCTGAACCCGACCTC	74/62
RS27835	Трансфераза (Transferase)	CCGTTACGCCGCAACCG CGAGATCTGCACGAATTGC	146/140

Таблица 2. Результаты INDEL-типирования штаммов *Burkholderia pseudomallei*

Штаммы	INDEL-спектры штаммов <i>B. pseudomallei</i> (размер ампликона, п.н.)											INDEL-генотип
	RS 30420	RS 22905	RS 29185	RS 11930	RS 23965	RS 12365	RS 07305	RS 16330	RS 26065	RS 12945	RS 27835	
MSHR491	114	98	116	153	118	75	79	153	136	62	146	
MSHR733	114	98	116	153	118	75	79	153	136	62	146	
PFGE_B T6	114	98	116	153	118	75	79	153	136	62	146	
TSV 48	114	98	116	153	118	75	79	153	136	62	146	
NAU35A-3	114	98	116	153	118	75	79	153	136	62	146	
BED	114	98	116	153	118	75	79	153	136	62	146	
MSHR146	114	98	116	153	118	75	79	153	136	62	146	
NAU20B-16	114	98	116	153	118	75	79	153	136	62	146	
BEB	114	98	116	153	118	75	79	153	136	62	146	G1
MSHR5848	114	98	116	153	118	75	79	153	136	62	146	
BDP	114	98	116	153	118	75	79	153	136	62	146	
MSHR520	114	98	116	153	118	75	79	153	136	62	146	
NCTC 13178	114	98	116	153	118	75	79	153	136	62	146	
576	114	86	116	153	118	75	79	153	136	62	146	G2
406e	114	86	116	153	127	75	79	153	136	62	146	G3
K96243	114	98	116	141	127	81	70	135	124	62	146	G4
3921g	114	98	116	153	118	75	70	153	124	74	146	G5
1710b	114	98	116	153	118	75	70	153	136	62	140	G6
1026b	102	86	106	141	127	81	79	153	136	62	146	G7
1106a	102	98	106	153	127	75	79	153	136	74	146	G8
M1	114	98	116	153	127	75	79	153	124	62	140	G9
982	102	86	106	153	118	81	79	153	136	62	146	G10
vgh16R	102	86	106	153	118	81	79	153	136	62	140	G11
vgh07	102	86	106	153	118	81	70	135	136	62	146	G12
BPC006	102	98	106	153	118	75	79	153	136	74	146	G13



Дендрограмма, построенная на основе данных INDEL-типирования *B. pseudomallei*. Кластеры — римские цифры: I — австралийский кластер, II — юго-восточноазиатский кластер. В узлах дендрограммы показаны значения индексов бутстрепа.

штаммов *B. pseudomallei* по 11 локусам RS30420, RS22905, RS29185, RS11930, RS23965, RS12365, RS07305, RS16330, RS26065, RS12945 и RS27835 продемонстрировали наличие 13 генотипов (табл. 2).

В результате исследованные штаммы образовали два четко разделенных кластера: австралийский и юго-восточноазиатский (рис.). В первый кластер вошли 13 штаммов *B. pseudomallei* из различных регионов Австралии с одинаковым спектром аллелей INDEL-маркеров (INDEL-генотип G1). Второй кластер, включающий штаммы юго-восточноазиатского происхождения, представлен двумя субкластерами — IIa и IIb. Субкластер IIa содержал штаммы *B. pseudomallei* 576 (INDEL-генотип G2) и *B. pseudomallei* 406e (INDEL-генотип G3), географически приуроченные к территории Таиланда, с внутригрупповым коэффициентом генетической дистанции 0,091. Основу субкластера IIb также составили изоляты таиландского происхождения, сформировавшие отдельные группы со штаммами из Малайзии, Тайваня и Китая (INDEL-генотипы G4-G13). При попарном сравнении INDEL-спектров таиландских штаммов из субкластера IIb величина генетической дистанции варьировала от 0,273 до 0,818, такого же порядка дистанции были получены при сравнении этих штаммов с изолятами из Малайзии (0,182 — 0,727), Тайваня (0,364 — 0,636) и Китая (0,364 — 0,818). Исключением являлись штаммы *B. pseudomallei* 1106a и *B. pseudomallei* BPC006, коэффициент генетической дистанции между которыми составил 0,091. Средние значения попарных генетических расстояний между выявленными кластерами/субкластерами составили: 0,341 (пара I — II), 0,136 (пара I — IIa), 0,382 (пара I — IIb) и 0,409 (пара IIa — IIb).

Полученные результаты свидетельствовали о существовании определенного спектра INDELs, характерного для австралийских изолятов возбудителя мелиоидоза. Присутствие штаммов *B. pseudomallei*, приуроченных к территории Таиланда, во всех группах юго-восточноазиатского кластера свидетель-

ствуется о значительной генетической гетерогенности их популяции и затрудняет оценку эволюционных взаимоотношений при проверке достоверности данных с помощью бутстрэп-анализа, что выражается снижением бутстрэп-индексов от «предка к потомку». Вместе с тем, при анализе дендрограммы можно отметить, что штаммы *V. pseudomallei* 576, *V. pseudomallei* 406e и *V. pseudomallei* 1710b, обладающие соответствующими INDEL-генотипами G2, G3 и G6, возможно, имеют более раннее в эволюционном плане происхождение и способствовали формированию субкластеров IIa и IIb. При этом дивергенция генотипов данных штаммов от общего предка происходила по разным INDEL-локусам, что предполагает существование определенных филогеографических паттернов тайландских изолятов возбудителя мелиоидоза.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Вид *V. pseudomallei* имеет длительную эволюционную историю, сопряженную с высокой скоростью рекомбинации по отношению к скорости мутаций и значительными темпами горизонтального переноса генов, способными приводить к гомоплазии [8, 12]. В связи с этим, для определения принадлежности штаммов *V. pseudomallei* к определенным филогенетическим линиям требуется использование генетических маркеров, полиморфизм которых минимизирует потенциальную возможность конвергентной эволюции. Поиск подобных локусов является насущной проблемой, решение которой позволит с большей степенью достоверности осуществлять выявление источника и региона происхождения вновь выделяемых штаммов *V. pseudomallei*. Очевиден и значительный теоретический интерес, поскольку генетические маркеры с низким уровнем гомоплазии позволяют выявлять основные пути формирования современных границ ареала возбудителя мелиоидоза, имевших место в период образования вида *V. pseudomallei*.

Несмотря на традиционное использование данных MLVA-типирования при расшифровке вспышек мелиоидоза, сложное и непредсказуемое эволюционное поведение снижают полезность VNTR-маркеров для выявления возможного географического региона происхождения изолятов *V. pseudomallei*. Если тандемные повторы изменчивы в числе копий и динамичны, то вставки/делеции нескольких нуклеотидов являются гораздо более стабильными элементами генома, что свидетельствует о перспективе их применения в филогенетическом аспекте. Кластеризация 25 штаммов *V. pseudomallei*, выявленная в ходе проведенного INDEL-типирования *in silico*, свидетельствует о потенциальной возможности разработки системы амплификационных маркеров, позволяющих учитывать географическую локализацию. Дендрограмма, построенная с использованием 11 INDEL-локусов, продемонстрировала наличие австралийского и юго-восточноазиатского кластера, включающего штаммы из Таиланда, Малайзии, Тайваня и Китая. Австралийский кластер, общей численностью 13 штаммов, обладал 100% гомологией INDEL-профилей. Тайландские штаммы характеризовались значительной генетической вариабельностью и вместе с изолятами из других географических регионов Юго-Восточной Азии сформировали гетерогенный кластер с коэффициентами генетической дистанции от 0,091 до 0,818. Эти результаты согласуются с ранее полученными данными, которые свидетельствовали о более высоком уровне рекомбинации тайландских штаммов по сравнению с австралийскими изолятами [8].

Таким образом, выявленные INDEL-локусы подтверждают разделение изолятов *V. pseudomallei* на две географические популяции, соответствующие

штаммам из Австралии и Юго-Восточной Азии. Конструирование на основе изученных INDEL-маркеров амплификационных систем и их комбинирование с существующей 4-локусной схемой MLVA-типирования [5] позволит определять источник вспышки мелиоидоза и пути распространения возбудителя.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Мишанькин Б.Н., Олейников И.П. Алгоритм компьютерного VNTR-типирования на основе неполных сиквенсов ДНК-штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных на Гаити в 2010 г. ЗНиСО. 2013, 3: 28-30.
2. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Олейников И.П., Мишанькин Б.Н., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Зубкова Д.А., Ежова М.И. INDEL- и VNTR-типирование штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных в 2013 году из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации. ЗНиСО. 2015, 5: 41-44.
3. Онищенко Г.Г., Сандахчиев Л.С., Нетесов С.В., Мартынюк Р.А. Биотерроризм: национальная и глобальная угроза. Вестник РАМН. 2003, 3: 195-204.
4. Badran S., Pedersen T.I., Roed C. et al. Imported melioidosis in Danish travellers: a diagnostic challenge. *Scand. J. Infect. Dis.* 2010, 42: 445-449.
5. Currie B.J., Haslem A., Pearson T. et al. Identification of melioidosis outbreak by multilocus variable number tandem repeat analysis. *Emerg. Infect. Dis.* 2009, 15: 169-174.
6. Hesstvedt L., Wilhelmsen M., Mengshoel A.G. et al. Two Norwegian patients with melioidosis presenting with bacteraemia and splenic and prostatic abscesses. *J. Travel. Med.* 2011, 18: 418-421.
7. Larsson P., Svensson K., Karlsson L. et al. Canonical insertion-deletion markers for rapid DNA typing of *Francisella tularensis*. *Emerg. Infect. Dis.* 2007, 13: 1725-1732.
8. Liguori A.P., Warrington S.D., Ginther J.L. et al. Diversity of 16S-23S rDNA Internal Transcribed Spacer (ITS) reveals phylogenetic relationships in *Burkholderia pseudomallei* and its near-neighbors. *PLoS One.* 2011, 6: e29323.
9. Limmathurotsakul D., Golding N., Dance D.A. et al. Predicted global distribution of and burden of melioidosis. *Nat. Microbiol.* 2016, 1: 15008.
10. Oka K., Asari M., Omura T. et al. Genotyping of 38 insertion/deletion polymorphisms for human identification using universal fluorescent PCR. *Mol. Cell. Probes.* 2014, 28: 13-18.
11. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 1987, 4: 406-425.
12. Santos E.P., Vinuesa P., Martínez-Aguilar L. et al. Phylogenetic analysis of *Burkholderia* species by multilocus sequence analysis. *Curr. Microbiol.* 2013, 67: 51-60.
13. Sawana A., Adeolu M., Gupta R.S. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. *Front. Genet.* 2014, 5: 1-22.
14. Sokal R.R., Michener C.D. A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Science Bulletin.* 1958, 38: 1409-1438.

*Поступила 15.01.17*

Контактная информация: Леденева Маргарита Леонтьевна,  
400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7, р.т. (8442)39-33-48

С.С.Бочкарева<sup>1</sup>, А.В.Алешкин<sup>1</sup>, О.Н.Ершова<sup>2</sup>, Л.И.Новикова<sup>1</sup>, С.С.Афанасьев<sup>1</sup>,  
И.А.Киселева<sup>1</sup>, Э.Р.Зулкарнеев<sup>1</sup>, Е.О.Рубальский<sup>1</sup>, О.Ю.Борисова<sup>1</sup>, А.В.Караулов<sup>3</sup>

## ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ФАГОТЕРАПИИ ИНФЕКЦИЙ, СВЯЗАННЫХ С ОКАЗАНИЕМ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ, В ОТДЕЛЕНИИ НЕЙРОРЕАНИМАЦИИ

<sup>1</sup>Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского; <sup>2</sup>НИИ нейрохирургии им. акад. Н.Н.Бурденко, Москва; <sup>3</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова

*Цель.* Оценить влияние антифагового гуморального иммунного ответа на эффективность фаготерапии инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП). *Материалы и методы.* 42 пациента, находящиеся на продленной искусственной вентиляции легких (ИВЛ) в отделении нейрореанимации, один раз в 2014 г., 4 раза в 2015 г. и один раз в 2016 г. получали коктейль бактериофагов per os по 20 мл, в том числе 6 пациентов — повторно от 3 до 5 раз. Эффективность фаготерапии оценивали по высеву штаммов-возбудителей ИСМП из проб эндотрахеального аспирата, крови, мочи и кала пациентов до и после окончания курса. *Результаты.* Исходно из 87,5% проб пациентов были выделены грамотрицательные патогены (*Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*). В первых эпизодах фаготерапии эффективная санация была подтверждена в 54 — 62,5% случаев. Фармакокинетические исследования указывали на системный механизм действия энтеральных форм бактериофагов. Повторные курсы фаготерапии не привели к существенной эрадикации патогенов. Антифаговый иммунитет после однократного применения коктейля бактериофагов конкретного штаммового состава детектировали с помощью ИФА по наличию титра специфических IgG в диапазоне от 1/16 до 1/4096 (у пациентов, не принимавших коктейль бактериофагов, антитела отсутствовали). *Заключение.* Снижение санирующего эффекта бактериофага может возникать при проведении повторного курса у одного и того же пациента из-за образования антифаговых антител. Для сохранения результативности фаготерапии необходимо изменение штаммового состава коктейля бактериофагов.

Журн. микробиол., 2017, № 4, С. 42—48

Ключевые слова: бактериофаги, ИСМП, антибиотикорезистентность, гуморальный иммунный ответ, антифаговые антитела

S.S.Bochkareva<sup>1</sup>, A.V.Aleshkin<sup>1</sup>, O.N.Ershova<sup>2</sup>, L.I.Novikova<sup>1</sup>, S.S.Afanasiev<sup>1</sup>,  
I.A.Kiseleva<sup>1</sup>, E.R.Zulkarnееv<sup>1</sup>, E.O.Rubalsky<sup>1</sup>, O.Yu.Borisova<sup>1</sup>, A.V.Karaulov<sup>3</sup>

## IMMUNOLOGIC ASPECTS OF PHAGE THERAPY OF INFECTIONS RELATED TO MEDICAL CARE IN NEUROREANIMATION

<sup>1</sup>Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology; <sup>2</sup>Burdenko Research Institute of Neurosurgery, Moscow; <sup>3</sup>Sechenov First Moscow State Medical University, Russia

*Aim.* Evaluate the effect of anti-phage humoral immune response on effectiveness of phage therapy of infections related to medical care (IRMC). *Materials and methods.* 42 patients on extended mechanical ventilation (MV) in neuroreanimation, 1 time in 2014, 4 times in 2015 and 1 time in 2016 had received bacteriophage cocktail per os — 20 ml including 6 patients — additionally 3-5 times. Effectiveness of phage therapy was evaluated by seeding of IRMC strains from samples of endotracheal aspirate, blood, urine and feces of patients before and after treatment. *Results.* 87.5% of samples from the patients initially had gram-negative pathogens (*Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*). Effective sanitation for the first episodes of phage therapy was confirmed in 54 — 62.5% of cases. Pharmacokinetic studies have indicated a systemic mechanism of action for enteral forms of bacteriophages. Repeated courses of phage therapy did not result in significant eradication of pathogens. Antiphage immunity after a single

administration of the cocktail of bacteriophages with a certain strain composition was detected using ELISA by the presence of specific IgG titers in a range from 1/16 to 1/4096 (in patients not receiving the cocktail antibodies were not detected). *Conclusion.* Reduction of sanitation effect of bacteriophage could be due to formation of anti-phage antibodies after a repeated course in the same patient. Changes of strain composition of phage cocktail of bacteriophages is necessary to preserve results of phage therapy.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 4, P. 42—48

Key words: bacteriophage, IRMC, antibiotics resistance, humoral immune response, anti-phage antibodies

## ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на то, что современная фаготерапия базируется на вековом опыте использования бактериофагов в клинической практике, до сих пор не существует единого алгоритма проведения такой терапии при тяжелых, длительно протекающих нозокомиальных инфекциях. Результаты лечения с помощью фаговых препаратов, полученные на этой категории пациентов, противоречивы, а клиническая картина не всегда соответствует микробиологическим данным. Оценивая эффективность клинического применения ведущей на сегодняшний день энтеральной лекарственной формы фагов с точки зрения доказательной медицины, необходимо учитывать различные аспекты взаимодействия бактериофага с макроорганизмом (организмом больного) и штаммом-возбудителем ИСМП, в том числе фармакокинетику, биодоступность и возможный ответ иммунной системы человека на бактериофаги, что, в конечном итоге, определяет безопасность и результативность антибактериальной фаготерапии. Цель нашей работы заключалась в оценке влияния антифагового гуморального иммунного ответа на эффективность фаготерапии и фагопрофилактики ИСМП у пациентов отделения нейрореанимации.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились совместно с коллегами из отделения нейрореанимации и интенсивной терапии НИИ нейрохирургии им. акад. Н.Н.Бурденко. Были обследованы пациенты, находящиеся в постоперационном периоде, отягощенном инфекцией ИСМП и вызванной возбудителями множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ). 42 пациента, находящиеся на продленной искусственной вентиляции легких в отделении нейрореанимации, получали лечебно-профилактический продукт (ЛПП) на основе коктейля бактериофагов per os по 20 мл в 2014 г. (1 эпизод), 2015 г. (4 эпизода) и 2016 г. (один эпизод), в том числе 6 пациентов — повторно от 3 до 5 раз. В состав ЛПП были включены по два штамма фага на каждый из видов бактерий: *A.baumannii* (фаги — AP22, AM24), *K.pneumoniae* (фаги — KPV15, KPV811), *P.aeruginosa* (фаги — PA5, PA10) и *Staphylococcus aureus* (фаги — SCH1, SCH111), обладающих суммарным спектром литической активности (73%) в отношении антибиотикорезистентных штаммов, выделенных от пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ). Подбор бактериофагов осуществляли в сотрудничестве с коллегами из Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии. Нарработку стерильных фильтратов фаголизатов с высоким титром фаговых частиц, очищенных от токсинов, проводили по собственной оригинальной технологии. Титр каждого фага в ЛПП составлял  $10^8$  БОЕ/мл. Размер ДНК фагов, включенных в

ЛПП, колебался от 18 до 167 тпн. Уникальность, вирулентная природа и отсутствие нежелательных генов в ДНК фагов были подтверждены биоинформационным анализом [6].

Доклинические испытания, проводившиеся в соответствии с [4] и включавшие оценку острой и хронической токсичности, фармакокинетические исследования и определение эффективности коктейля бактериофагов на модели экспериментальной острой летальной клебсиеллезной инфекции, вызванной у беспородных мышей, продемонстрировали безопасность и высокую профилактическую и терапевтическую эффективность лечебно-профилактического продукта [1].

В процессе клинического исследования проводили бактериальный посев проб эндотрахеального аспирата (ЭТА), крови, мочи и кала пациентов с целью идентификации и оценки исходного титра штамма-возбудителя ИСМП до курса фаготерапии и оценки результативности ЛПП через сутки после окончания приема коктейля бактериофагов. Фармакокинетические исследования включали определение бактериофагов, входящих в разработанный коктейль, в крови пациентов и привлекаемых для этих исследований здоровых добровольцев через сутки после окончания приема фагосодержащего продукта с использованием метода ПЦР со специфическими праймерами [2], а также в кале, моче и ЭТА — с помощью спот-теста на штамме-хозяине и метода Грация [5].

Антифаговый иммунитет после применения коктейля бактериофагов конкретного штаммового состава детектировали методом ИФА с помощью сконструированной тест-системы по наличию титра специфических IgG в сыворотке крови обследованной группы больных из отделения нейрореанимации, а также у лиц, работа которых связана с производством бактериофагов, условно здоровых детей до 3 лет и в отечественных препаратах, полученных из крови человека — внутривенном иммуноглобулине «Габриглобин» (ООО «Иммуно-Гем») и «Комплексном иммуноглобулиновом препарате» (ООО «Иммуно-Гем»), предназначенном для перорального применения. Иммуноферментная тест-система для обнаружения антифаговых IgG была построена следующим образом: антиген (бактериофаг) сорбировали в лунках полистиролового планшета, затем в лунки вносили исследуемый образец, а связавшиеся с антигеном IgG выявляли с помощью конъюгата Protein A-Peroxidase (Sigma) по ферментной реакции с добавленным затем субстратом. Положительным контролем служила кроличья антисыворотка к бактериофагу, заведомо содержащая соответствующие антитела, а отрицательным контролем — физиологический раствор.

Кроличьи моноспецифические антисыворотки были получены с учетом иммуногенности конкретных бактериофагов. Основной цикл иммунизаций

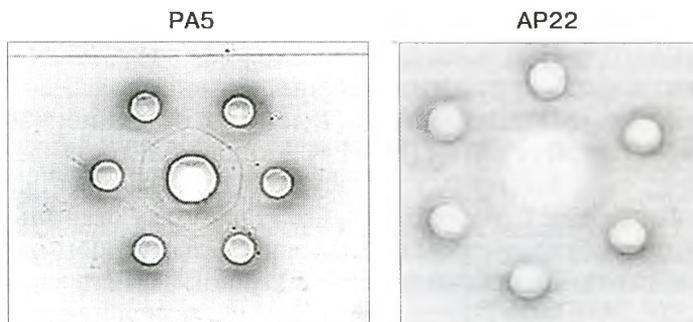


Рис. 1. Иммунохимическая характеристика антифаговых сывороток с помощью иммунопреципитации по Оухтерлони (центральные лунки — фаг PA5 или фаг AP22 в титре  $10^{10}$  БОЕ/мл, периферические лунки — соответствующая кроличья моноспецифическая антисыворотка).

состоял из четырех внутримышечных инъекций животных-продуцентов фаголизатам с титром  $10^{10}$  БОЕ/мл с интервалом в 10 дней. На одну иммунизацию одного животного использовали соответственно 0,5; 0,25; 0,125 и 0,5 мл раствора антигена, смешанного с полным (первая и последняя иммунизации) или неполным (остальные иммунизации) адъювантом Фрейнда. При необходимости проводили дополнительную иммунизацию в той же дозе, как и четвертую иммунизацию основного цикла. Иммунохимическая характеристика полученных антисывороток была выполнена с помощью иммунопреципитации по Оухтерлони [9] (рис. 1) и в реакции нейтрализации фагов [3] (рис. 2). Необходимо отметить, что перекрестной реактивности антисыворотки, полученной к фагу PA5, в отношении ацинетобактерного фага AP22 не выявлено ни одним из использованных методов. Выбор конъюгата был обусловлен способностью Protein A взаимодействовать с IgG как человека, так и разных видов животных, в частности, кроликов. Ввиду различий физико-химических и биологических свойств бактериофагов между собой необходимо было отработать условия сорбции конкретных бактериофагов как антигенов в лунках планшета. Также были подобраны условия проведения иммуноферментной реакции (температура и длительность инкубации, необходимость встряхивания содержимого планшета во время инкубации, концентрации компонентов реакции), причем особое внимание было уделено подбору концентрации конъюгата.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В исходных бактериологических посевах проб эндотрахеального аспирата, крови, мочи и кала, полученных от исследованного контингента пациентов отделения нейрореанимации, выделяли грамтрицательные патогены (*A.baumannii*, *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa*) в доле до 87,5%. Назначение 3-дневного курса лечебно-профилактического продукта обследованным пациентам в 2014 г. и первом эпизоде 2015 г. привело к эффективной санации инфицированных локусов в 54 — 62,5% случаев, что подтверждалось результатами исследований аналогичного клинического материала, полученного у больных через сутки после окончания курса фаготерапии.

Фармакокинетические исследования ЛПП указывали на системный механизм действия фагов, проникавших у лиц, которые принимали коктейль бактериофагов (как у пациентов, так и у здоровых добровольцев) через ЖКТ в кровь, кал, мочу и ЭТА [7].

Повторные курсы ЛПП, назначение которых было вызвано как профилактической необходимостью снижения риска возникновения ИСМП, так и

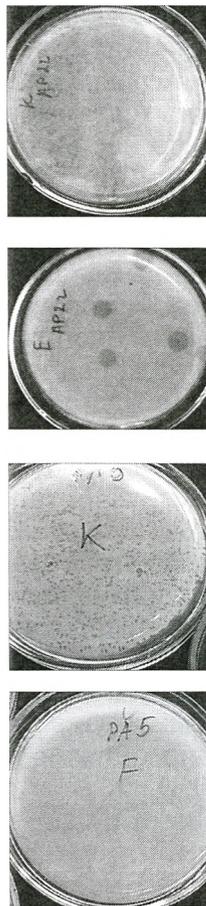


Рис. 2. Сравнение результатов реакции нейтрализации иммунизированных (ИМ) и интактных (контроль — К) животных, исходный титр фаголизатов PA5 и AP22 —  $10^6$  БОЕ/мл.

Сверху вниз: AP22, К,  $10^2$ ; AP22, ИМ, 5; PA5, К,  $10^3$ ; PA5, ИМ, 0.

регистрацией новых эпизодов эпидемиологического неблагополучия в отделении нейрореанимации, не привели к существенной эрадикации патогенов, относящихся к тем же видам, хотя *in vitro* была продемонстрирована чувствительность выделенных штаммов-возбудителей к бактериофагам, входящим в коктейль, что навело нас на предположение о формировании адаптивного антифагового иммунного ответа у пациентов, получавших лечебно-профилактический продукт исходного фагового состава повторно.

Поскольку не существует коммерчески доступных диагностических наборов, предназначенных для определения антифаговых антител, первый этап наших исследований был посвящен конструированию соответствующих тест-систем, позволяющих оценить уровень IgG к фагам иммуноферментным методом в сыворотке крови или любой биологической жидкости пациента. Тест-системы, сконструированные по принципу, описанному в разделе «Материалы и методы», были апробированы при анализе IgG к соответствующим бактериофагам в образцах сывороток крови, полученных от неиммунизированных и иммунизированных кроликов (табл. 1). При внесении в лунки с сорбированным бактериофагом кроличьих антифаговых сывороток развивалась интенсивная цветная реакция. Например, было показано, что разведение до 1:32 000 кроличьей антисыворотки, полученной путем иммунизации бактериофагом PA5, лизирующим *Paeruginosa*, и до 1:8000 антисыворотки, полученной путем иммунизации бактериофагом AP22, лизирующим *A. baumannii*, давало оптическую плотность около 0,35. В то же время, сыворотка интактного (неиммунизированного) кролика не вызывала появления окрашивания содержимого лунки (оптическая плотность на уровне отрицательного контроля — 0,1).

Далее на наличие антифаговых антител к PA5 и AP22 были проанализированы сыворотки крови, полученные от разных контингентов испытуемых, как взрослых, так и детей. Выявлено, что в сыворотках крови лиц, работа которых связана с бактериофагами, обнаруживаются антитела к ним в титре 1:64 — 1:128, что можно было ожидать, исходя из данных литературы, свидетельствующих об обнаружении антител к бактериофагам даже у значительной части интактных людей [10]. В то же время, в сыворотках крови детей до 3 лет IgG к данным бактериофагам либо не были обнаружены, либо были обнаружены в невысоких титрах — 1:10. IgG к бактериофагам были обнаружены также в препаратах, полученных из крови человека — «Габригло-

Таблица 1. Определение IgG к бактериофагам PA5 и AP22 методом ИФА в сыворотках крови, полученных от неиммунизированных и иммунизированных кроликов

Разведения сыворотки	Оптическая плотность, Ед.			
	PA5		AP22	
	Иммунизированный кролик	Интактные кролики	Иммунизированный кролик	Интактные кролики
Без разведения	> максимально возможного значения	0,1	> максимально возможного значения	0,1
1:1000	3,40	—	1,10	—
1:2000	3,39	—	0,81	—
1:4000	2,36	—	0,49	—
1:8000	1,33	—	0,35	—
1:16000	0,30	—	0,18	—
1:32000	0,35	—	0,15	—

бин» и «Комплексном иммуноглобулиновом препарате». Титр антител в них не превышал 1:64. Наличие антител такой специфичности в препаратах, полученных из донорской крови, свидетельствует об определенной напряженности антифагового иммунитета в популяции, что согласуется с данными [8].

Анализ антифагового гуморального иммунитета у обследованной категории пациентов отделения

нейрореанимации представлен в табл. 2. Было обнаружено, что пероральная фаготерапия уже на 2 — 3 неделе после приема препарата обязательно приводит к появлению антифаговых IgG, сохраняющихся в титрах 1:16 — 1:4096, по крайней мере, до года. Повторный курс приема фагов сопровождается более быстрым подъемом уровня соответствующих антител. Анализируя связь эффективности фаготерапии

Таблица 2. Определение антифаговых IgG у пациентов отделения нейрореанимации до (14.04.2016) и после (10.05.2016) последнего курса фаготерапии

№ пациента	Первичный или повторный курс фаготерапии (дата первого курса)	Титр IgG к бактериофагу PA5
1	Повторная фаготерапия (12.2015)	титр до приема (14.04.2016) 1/16 титр после приема (10.05.2016) 1/256
2	Повторная фаготерапия (12.2015)	титр до приема (14.04.2016) 1/1024 титр после приема (10.05.2016) 1/1024
3	Повторная фаготерапия (07.2015)	титр до приема (14.04.2016) 1/16 титр после приема (10.05.2016) 1/256
4	Повторная фаготерапия (12.2015)	титр после приема (10.05.2016) 1/1024
5	Повторная фаготерапия (11.2015)	титр до приема (14.04.2016) 1/4096 титр после приема (10.05.2016) 1/4096
6	Первичная фаготерапия (7—9.05.2016)	АТ отсутствуют (10.05.2016)
7	Повторная фаготерапия (11.2015)	титр после приема (10.05.2016) 1/1024

и интенсивности антифагового иммунного ответа, можно отметить, что первичная фаготерапия характеризовалась выраженным клиническим эффектом у обследуемого контингента больных, выразившимся, в том числе, и в санации исходно инфицированных возбудителями ИСМП локусов. Однако повторный курс терапии тем же штаммом фага уже не давал удовлетворительного эффекта. Отметим, что в этот период в крови больных обязательно находились соответствующие антитела.

Таким образом, полученные нами результаты подтвердили необходимость детекции соответствующих антител в крови больных для корректировки штаммового состава препаратов при проведении повторных курсов фаготерапии. Кроме того, очевидно, что применение препаратов бактериофагов у больных с ИСМП, находящихся на продленной ИВЛ, представляет отдельную проблему. Полученные в рамках проведенных исследований результаты подтвердили наши предположения, что при разработке энтеральных лекарственных форм бактериофагов для борьбы с ИСМП нельзя придерживаться классического пайп-лайна разработки лечебно-профилактических продуктов — стратегии фиксированного штаммового состава бактериофагового коктейля. Во-первых, влияние антибиотиков и дезинфектантов на патогенные микроорганизмы, особенно в замкнутой экологической нише больничных учреждений, ускоряет эволюционный процесс в направлении формирования штаммов, обладающих множественной лекарственной устойчивостью. Изменение штаммовозбудителя в ряде случаев влечет за собой внесение изменений и в штаммовый состав фагового коктейля для поддержания необходимого уровня спектра его литической активности. А во-вторых, снижение клинической эффективности используемого фагового коктейля может возникать при проведении повторного курса у одного и того же пациента при образовании специфических антифаговых антител к используемым в данном препарате штаммам бактериофагов. Выходом из создавшегося положения может быть закрепление видового состава коктейля бактериофагов в комбинации с услугой по подбору (или смене на новые в случае повторного применения у одного и того же пациента) фаговых штаммов, активных в отношении актуальных, персистирующих в данном ЛПУ в настоящий момент бактериальных патогенов из имеющейся фенотипически охарактеризованной коллекции бактриофагов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Алешкин А.В., Светоч Э.А., Воложанцев Н.В. и др. Инновационные направления использования бактериофагов в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации. *Бактериология*. 2016, 1 (1): 22-31.
2. Борисова О.Ю., Рубальский Е.О., Алешкин А.В. и др. Применение молекулярно-генетических технологий для индикации фагов в крови пациентов с инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи. *В: Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности*. 2016, с. 60-61.
3. Иммунологические методы. Под ред. Г.Фримеля. М., Медицина, 1987.
4. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты). Часть 2. Под ред. А.Н.Миронова. М., Гриф и К, 2013.
5. Adams MH. Methods of study of bacterial viruses. *In: Bacteriophages*. New York, Interscience, 1959b: p. 443-522.
6. Aleshkin A., Ershova O., Volozhantsev N. et al. Phagebiotics in treatment and prophylaxis of healthcare-associated infections. *In: Bacteriophages: An overview and synthesis of a re-emerging field*. Ed. Harrington D. New York, Nova Science Publishers Inc., 2016, ISBN: 978-1-63485-455-9, p. 105-122.
7. Aleshkin A.V., Ershova O.N., Volozhantsev N.V. et al. Phagebiotics in treatment and prophylaxis of healthcare-associated infections. *Phagebiotics in treatment and prophylaxis of healthcare-associated infections. Bacteriophage*. 2016, 6: e1251379.
8. Dąbrowska K., Miernikiewicz P., Piotrowicz A. et al. Immunogenicity studies of proteins forming the t4 phage head surface. *J. Virol*. 2014, 88 (21): 12551-12557.
9. Łusiak-Szelachowska M., Żaczek M., Weber-Dąbrowska B. et al. Phage neutralization by sera of patients receiving phage therapy. *Viral. Immunol*. 2014, 27 (6): 295-304. doi: 10.1089/vim.2013.0128.
10. Żaczek M., Łusiak-Szelachowska M., Jonczyk-Matysiak E. et al. Antibody production in response to staphylococcal ms-1 phage cocktail in patients undergoing phage therapy. *Front. Microbiol*. 2016, 7: 1681.

Поступила 15.01.17

Контактная информация: Бочкарева Светлана Сергеевна, к.б.н., 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, р.т. (495)452-18-16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

С.А.Гуляев<sup>1</sup>, И.А.Потемкин<sup>2,3</sup>, В.С.Кичатова<sup>2,3</sup>, А.А.Карлсен<sup>2,3</sup>, О.В.Исаева<sup>2,3</sup>, Т.В.Гуляева<sup>1</sup>, М.А.Ваннус<sup>1</sup>, И.В.Гордейчук<sup>1</sup>, К.К.Кюрегян<sup>2,3</sup>, М.И.Михайлов<sup>2,3</sup>

## МОДЕЛИРОВАНИЕ ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА Е НА КАРЛИКОВЫХ ДОМАШНИХ СВИНЬЯХ

<sup>1</sup>Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П.Чумакова, <sup>2</sup>Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, <sup>3</sup>НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, Москва

*Цель.* Экспериментальное воспроизведение ВГЕ-инфекции на домашних карликовых свиньях (минипигах) и сравнительный анализ вирусологических и иммунологических характеристик экспериментальной инфекции. *Материалы и методы.* Минипиги породы Визенау (2 самки и 4 самца возрастом 50 — 60 дней и весом 5 — 10 кг) были инфицированы штаммом ВГЕ генотипа 3, выделенным из фекалий свиней в Белгородской обл. в 2013 г. Вирус вводили в виде 10% осветленного фекального экстракта (800 мкл). В течение 49 дней эксперимента у животных брали кровь (еженедельно) и фекалии ежедневно. Анти-ВГЕ IgG определяли в образцах сыворотки крови с помощью тест-системы ДС-ИФА-ANTI-HEV-G (Диагностические системы), РНК ВГЕ в образцах фекальных экстрактов и в сыворотке крови — в ОТ-ПЦР. *Результаты.* Минипиги породы Визенау оказались вос-

приимчивы к заражению ВГЕ генотипа 3, у всех животных после введения вируса развилась инфекция, сопровождавшаяся присутствием РНК ВГЕ в фекалиях на протяжении двух недель и сероконверсией по анти-ВГЕ. Сравнительный анализ вирусологических характеристик экспериментальной ВГЕ-инфекции у миниатюрных и стандартных свиней показал, что у минипигов продолжительность инфекции короче, а сероконверсия по анти-ВГЕ происходит раньше. *Заключение.* Восприимчивость к ВГЕ генотипа 3 и меньший вес делают карликовых свиней удобной альтернативой обычным домашним свиньям и приматам для моделирования ВГЕ-инфекции *in vivo*.

Журн. микробиол., 2017, № 4, С. 48—54

Ключевые слова: вирус гепатита Е, гепатит Е, экспериментальная инфекция

*S.A.Gulyaev<sup>1</sup>, I.A.Potemkin<sup>2,3</sup>, V.S.Kichatova<sup>2,3</sup>, A.A.Karlsen<sup>2,3</sup>, O.V.Isaeva<sup>2,3</sup>, T.V.Gulyaeva<sup>1</sup>, M.A.Vannus<sup>1</sup>, I.V.Gordeichuk<sup>1</sup>, K.K.Kyuregyan<sup>2,3</sup>, M.I.Mikhailov<sup>2,3</sup>*

## MODELLING OF HEPATITIS E IN MINI-PIGS

<sup>1</sup>Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, <sup>2</sup>Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, <sup>3</sup>Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

*Aim.* Experimental reproduction of HEV-infection in mini-pigs and comparative analysis of virological and immunological characteristics of experimental infection. *Materials and methods.* Wiesenauer minipigs (2 females and 4 males, age 50 — 60 days, weight 5 — 10 kg) were infected by HEV genotype 3 strain isolated from swine feces in Belgorod region in 2013. The virus was administered as a 10% clarified feces extract (800 µl). Blood (weekly) and feces (daily) were sampled from the animals for 49 days. Anti-HEV IgG were determined in sera samples using DS-EIA-ANTI-HEV-G (Diagnostic Systems) system, HEV RNA in samples of feces extracts and blood sera — RT-PCR. *Results.* Wiesenauer minipigs were sensitive to HEV genotype 3 infection, infection developed in all the animals after administration of the virus, that was accompanied by the presence of HEV RNA in feces for 2 weeks and seroconversion by anti-HEV. Comparative analysis of virological characteristics of experimental HEV-infection in mini- and standard pigs has shown, that the duration of the infection in mini-pigs is shorter, and seroconversion by anti-HEV occurs earlier. *Conclusion.* Sensitivity to HEV genotype 3 and lower weight make mini-pigs a comfortable alternative to standard swine and primates for modelling HEV infection *in vivo*.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 4, P. 48—54

Key words: hepatitis E virus, hepatitis E, experimental infection

## ВВЕДЕНИЕ

Инфекция, вызванная вирусом гепатита Е (ВГЕ), представляет серьезную проблему здравоохранения. По оценкам ВОЗ, ежегодно регистрируется до 20 миллионов случаев гепатита Е (ГЕ) и около 70 000 смертей, вызванных этой инфекцией [12]. ВГЕ относится к семейству *Непевігідае*, представляет собой мелкий безоболочечный вирус диаметром 30 — 32 нм с геномом, представленным одноцепочечной РНК позитивной полярности длиной около 7200 нуклеотидов.

Эпидемиологические особенности распространения ВГЕ-инфекции во многом зависят от генотипа (ГТ) вируса. ГТ1 и ГТ2 инфицируют только человека и вызывают эпидемии в эндемичных регионах (преимущественно странах тропического пояса), при этом источником инфекции на эндемичных территориях являются инфицированные лица [12]. ГТ3 и ГТ4 способны инфицировать как человека, так и животных (свиньи, олени), при этом с ГТ3 связано

подавляющее большинство случаев автохтонного ГЕ в развитых странах, в том числе в России. По-видимому, инфекция ВГЕ ГТ3 и ГТ4 является зоонозом и может иметь широкий спектр клинических проявлений от бессимптомной инфекции до острого гепатита, а также хронической инфекции у пациентов с иммуносупрессией [2, 4, 5].

Успешные эксперименты по заражению приматов и свиней ВГЕ были проведены еще в начале 1990-х годов. Было установлено, что свиньи восприимчивы к ВГЕ ГТ3 и ГТ4, но не к ГТ1 и ГТ2, а приматы восприимчивы ко всем генотипам вируса [9, 14]. С помощью моделирования ВГЕ-инфекции на свиньях изучали возможные факторы передачи данной инфекции, а также локализацию репликации ВГЕ [3, 6].

Открытие ВГЕ кроликов, близкого к патогенному для человека ГТ3, позволило использовать этих животных в качестве экспериментальной модели ВГЕ-инфекции. В экспериментах была продемонстрирована ограниченная восприимчивость кроликов, помимо кроличьих штаммов, к штаммам ВГЕ ГТ4, выделенных от людей [10]. Также в экспериментах была продемонстрирована восприимчивость приматов к кроличьему ВГЕ [7]. С помощью кроличьей модели ВГЕ-инфекции были изучены протективные свойства китайской вакцины против ГЕ [8]. Тем не менее, данные о восприимчивости кроликов к ВГЕ ГТ3, основной причине автохтонного ГЕ в промышленных странах, отсутствуют. Таким образом, наиболее часто применяемой в исследованиях животной моделью ВГЕ-инфекции являются домашние свиньи стандартных размеров, что затрудняет экспериментальную работу.

Целью данного исследования являлось экспериментальное воспроизведение ВГЕ-инфекции на домашних карликовых свиньях (минипигах) и сравнительный анализ вирусологических и иммунологических характеристик экспериментальной инфекции на карликовых и стандартных породах животных.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В эксперименте использовались минипиги породы Визенау в количестве 6 голов (2 самки и 4 самца) возрастом 50 — 60 дней и весом 5 — 10 кг. Все животные содержались в индивидуальных вольерах со свободным доступом к корму и воде.

До начала экспериментов все животные по результатам предварительного скрининга не имели антител к ВГЕ (анти-ВГЕ IgG) в сыворотке крови и были отрицательны по РНК ВГЕ в фекалиях.

Все процедуры с животными в исследовании проведены в соответствии с правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных.

Для инфицирования использовали штамм ВГЕ ГТ3, выделенный из фекалий свиней в Белгородской области в 2013 г. Генотипическая принадлежность штамма была подтверждена секвенированием фрагмента вирусного генома, кодирующего открытую рамку считывания 2 (ORF2 ВГЕ). Вирус вводили животным в виде 10% осветленного фекального экстракта, пропущенного через стерилизующий фильтр 0,22 мкм.

Всем 6 животным вводили внутривенно, в плюсневую вену, по 800 мкл стерилизованного фекального экстракта, содержащего ВГЕ ГТ3. Животные наблюдались в течение 49 дней после заражения. На протяжении эксперимента у всех животных брали образцы крови (еженедельно) и фекалий (ежедневно). Кровь брали из передненаружной плюсневой вены, расположенной на наружной поверхности голени. В образцах фекалий определяли РНК ВГЕ, в образцах сыво-

ротки крови также определяли РНК ВГЕ и анти-ВГЕ, а также уровень активности биохимических маркеров функционального состояния печени — аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП), общего билирубина.

Анти-ВГЕ IgG определяли в образцах сыворотки крови свиней с помощью коммерческой тест-системы ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G (производство НПО «Диагностические системы») с применением видоспецифичного конъюгата (козы антитела к IgG свиньи, меченные пероксидазой хрена (производство Pierce).

РНК ВГЕ в образцах фекальных экстрактов и сыворотки крови животных определяли в полимеразной цепной реакции, совмещенной с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с вырожденными праймерами к ОРС2 ВГЕ. Выделение вирусной РНК из образцов проводили по принципу обратимого связывания нуклеиновых кислот на поверхности магнитных частиц с помощью набора для выделения ДНК/РНК MP@SiO<sub>2</sub> («Sileks», Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Для амплификации использовали следующие олигонуклеотиды: внешняя пара праймеров — 5'-aayatgcmcagtaccgggttg-3' (прямой) и 5'-cccttatcctgctgagcattctc-3' (обратный), внутренняя пара праймеров — 5'-gtyatgytytgacatacatggct-3' (прямой) и 5'-agccgacgaaatyaattctgtc-3' (обратный).

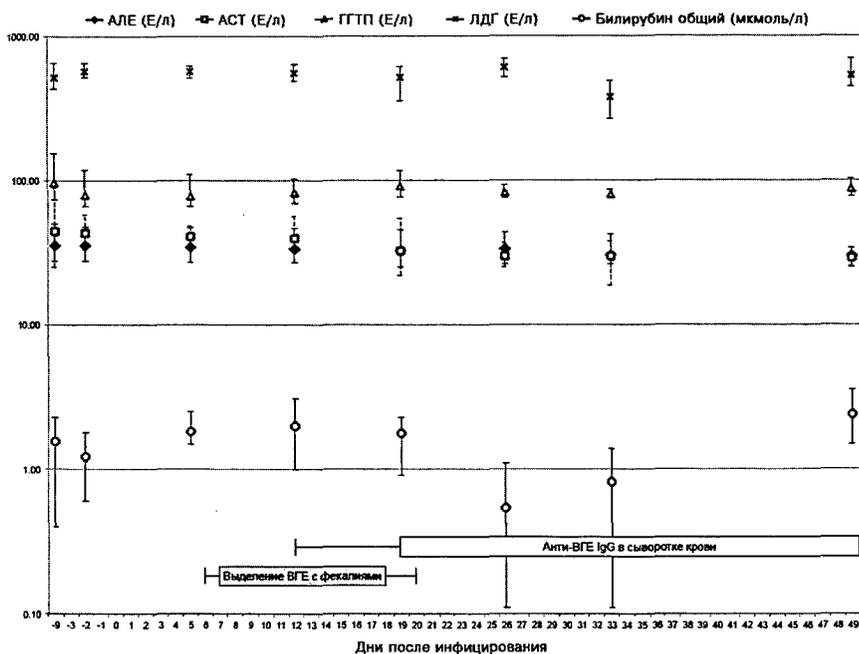
Первый раунд ПЦР проводили совместно с ОТ, условия реакции были следующими: 42°C — 1 час, затем 5 мин. — 94°C (денатурация и инактивация фермента обратной транскриптазы), затем 35 циклов: 94°C — 30 сек., 45°C — 30 сек., 72°C — 45 сек., финальная элонгация — 72°C — 7 мин. Условия для второго раунда ПЦР — 35 циклов: 94°C — 30 сек., 45°C — 30 сек., 72°C — 45 сек., финальная элонгация — 72°C — 7 мин. Полученные продукты ПЦР, соответствующие ВГЕ, определяли в 1,5% агарозном геле в ТВЕ. Величина продукта амплификации для ВГЕ составляла 350 пар оснований.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментальное заражение ВГЕ карликовых свиней (минипигов) было удачным. У всех шести животных после внутривенного введения 800 мкл стерилизованного фекального экстракта, содержащего ВГЕ ГТЗ, наблюдалось выделение ВГЕ с фекалиями и сероконверсия по анти-ВГЕ. РНК ВГЕ появилась в фекалиях, начиная с 6 дня после заражения и выявлялась до 18 дня после заражения включительно (рис.). Анти-ВГЕ появлялись в сыворотке крови, начиная с 12 дня после заражения, и сохранялись до окончания периода наблюдения. Для подтверждения идентичности штамма, выделенного от свиней в ходе экспериментальной инфекции, штамму ВГЕ, использованному для заражения животных, сравнивали последовательности участка ОРС2 вирусного генома, выделенные из инокула и от инфицированных животных. Степень сходства нуклеотидных последовательностей составила более 99%, что подтвердило идентичность ВГЕ ГТЗ, использованного для заражения минипигов, вирусу, выделенному от животных в ходе эксперимента.

На протяжении экспериментальной ВГЕ-инфекции у минипигов не наблюдали повышение уровней активности печеночных ферментов, у всех шести животных уровень АЛТ, АСТ, ГГТП, ЛДГ и билирубина оставался стабильным и не отличался достоверно от исходного, регистрируемого до заражения (рис.). Клинические симптомы заболевания у животных отсутствовали, изменений в поведении животных и снижения массы тела не наблюдали.

Результаты анализа вирусологических характеристик экспериментальной ВГЕ-инфекции в сравнении с данными, полученными другими исследовате-



Экспериментальная инфекция ВГЕ ГТЗ у карликовых домашних свиней. Обобщенные данные для шести животных. Планки погрешностей соответствуют предельным значениям индивидуальных показателей.

лями на животных миниатюрных и стандартных пород, приведены в табл. При внутривенном заражении ВГЕ ГТЗ у стандартных свиней выделение вируса с фекалиями начинается раньше и продолжается дольше по сравнению с минипигами. Сероконверсия по анти-ВГЕ у миниатюрных свиней наступает несколько раньше, чем у животных стандартных пород.

Целью данного исследования являлась отработка удобной и адекватной модели ВГЕ-инфекции *in vivo* для дальнейших испытаний кандидатных вакцинных препаратов против ГЕ. Стандартной экспериментальной моделью для ВГЕ-инфекции являются приматы и домашние свиньи, воспроизводимость этой инфекции на грызунах (крысах и мышах) оказались невысокой. Значение кроликов как модели ВГЕ-инфекции ограничено из-за отсутствия данных по восприимчивости этих животных к ВГЕ ГТЗ.

Различия в параметрах экспериментальной инфекции ВГЕ ГТЗ у миниатюрных и стандартных свиней при внутривенном заражении

Дни (среднее, минимум-максимум)	Миниатюрные свиньи, порода Визенау	Миниатюрные свиньи, порода Бама [14]	Стандартные свиньи [4]
До начала выявления РНК ВГЕ в фекалиях	6,6 (6–7)	7	3,2 (2,0–4,3)
Продолжительность выявления РНК ВГЕ в фекалиях	12,5 (12–13)	10	39,9 (27,7–52,1)
Сероконверсия по анти-ВГЕ относительно первого появления РНК ВГЕ в фекалиях	7,3 (6–12)	7	12,5 (10,4–14,6)

Нами отработана модель ВГЕ-инфекции на карликовых свиньях (минипигах) породы Визенау, эти животные оказались восприимчивы к заражению ВГЕ. Перед заражением животные были проверены на маркеры ВГЕ-инфекции, поскольку ВГЕ ГТЗ широко распространен среди поголовья домашних свиней на территории России [1]. В ходе эксперимента у

всех животных после введения ВГЕ ГТЗ развилась инфекция, сопровождавшаяся выделением вируса с фекалиями и сероконверсией по анти-ВГЕ.

Описанные ранее эксперименты по заражению свиней ВГЕ ГТЗ и ГТ4 проводились на домашних свиньях стандартных размеров. Тот факт, что миниатюрные свиньи относятся к тому же биологическому виду (*Sus scrofa domestica*), что и обычные домашние свиньи, а также сообщение о наличии естественной инфекции ВГЕ ГТЗ у карликовых свиней [11] позволяют предполагать, что миниатюрные свиньи, имеющие массу тела до 10 кг, послужат более удобной моделью ВГЕ-инфекции, чем домашние свиньи стандартных размеров. Первое сообщение об экспериментальном воспроизведении ВГЕ-инфекции на миниатюрных свиньях появилось в 2016 году. Tang Z.-M. et al. в эксперименте на миниатюрных свиньях породы Бама при заражении ВГЕ ГТЗ получили результаты, аналогичные нашим [13]. Описанные в этой работе сроки развития и продолжительность экспериментальной инфекции, а также сроки сероконверсии совпадают с наблюдавшимися нами.

Сравнительный анализ вирусологических характеристик экспериментальной ВГЕ-инфекции у миниатюрных и стандартных свиней показал, что у миниатюрных продолжительность инфекции короче, а сероконверсия по анти-ВГЕ происходит раньше. Тем не менее, в целом динамика инфекции у миниатюрных свиней сходна с наблюдаемой у стандартных животных.

Таким образом, восприимчивость к ВГЕ ГТЗ и меньший вес делают карликовых свиней удобной альтернативой обычным домашним свиньям и приматам для моделирования ВГЕ-инфекции *in vivo*. Пригодность кроликов для экспериментального воспроизведения ВГЕ-инфекции представляется ограниченной.

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

## ЛИТЕРАТУРА

1. Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Молекулярно-биологические основы контроля вирусных гепатитов. М., Икар, 2013.
2. Behrendt P., Steinmann E., Manns M.P., Wedemeyer H. The impact of hepatitis E in the liver transplant setting. *J. Hepatol.* 2014, 61: 1418-1429.
3. Bouwknegt M., Rutjes S.A., Reusken C.B. et al. The course of hepatitis E virus infection in pigs after contact-infection and intravenous inoculation. *BMC Vet. Res.* 2009, 4; 5: 7. doi: 10.1186/1746-6148-5-7.
4. Kamar N., Bendall R., Legrand-Abravanel F. et al. Hepatitis E. *Lancet.* 2012, 379: 2477-2488.
5. Kamar N., Selves J., Mansuy J.M. et al. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *New Engl. J. Med.* 2008, 358: 811-817.
6. Lee Y.H., Ha Y., Ahn K.K., Chae C. Localisation of swine hepatitis E virus in experimentally infected pigs. *Vet. J.* 2009, 179: 417-421.
7. Liu P., Bu Q-N., Wang L. et al. Transmission of hepatitis E virus from rabbits to cynomolgus macaques. *Emerg. Infect. Dis.* 2013, 19 (4): 559-565. doi:10.3201/eid1904.120827.
8. Liu P., Du R., Wang L. et al. Management of hepatitis E Virus (HEV) zoonotic transmission: Protection of rabbits against HEV challenge following immunization with HEV 239. *Vaccine. PLoS ONE.* 2014, 9 (1): e87600.
9. Meng X.J., Halbur P.G., Haynes J.S. et al. Experimental infection of pigs with the newly identified swine hepatitis E virus (swine HEV), but not with human strains of HEV. *Arch. Virol.* 1998, 143: 1405-1415.
10. Ma H., Zheng L., Liu Y. et al. Experimental infection of rabbits with rabbit and genotypes 1 and 4 hepatitis E viruses. *PLoS One.* 2010, 5 (2): e9160.
11. Morozov V.A., Morozov A.V., Rotem A. et al. Extended microbiological characterization of

göttingen minipigs in the Context of xenotransplantation: Detection and vertical transmission of hepatitis E virus. PLoS One. 2015, 14; 10 (10): e0139893. doi: 10.1371/journal.pone.0139893.

12. Rein D.B., Stevens G.A., Theaker J. et al. The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005. Hepatology 2012, 55: 988-997.
13. Tang Z-M., Wang S-L., Ying D. et al. The Bama miniature swine is susceptible to experimental HEV infection. Sci. Rep. 2016, 6:31813. doi:10.1038/srep31813.
14. Zhang J., Ge S.X., Huang G.Y. et al. Evaluation of antibody-based and nucleic acid-based assays for diagnosis of hepatitis E virus infection in a rhesus monkey model. J. Med. Virol. 2003, 71: 518-526.

Поступила 28.12.16

Контактная информация: Гуляев Станислав Анатольевич,  
142782, поселение Московский, поселок института полиомиелита,  
27 км Киевского шоссе, р.т. (495)841-19-07

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

*М.А.Макарова, Л.В.Сужаева, Л.А.Кафтырева*

## **ДЕТИ РАННЕГО ВОЗРАСТА С ДИСБИОЗОМ КИШЕЧНИКА КАК НОСИТЕЛИ ЭНТЕРОАГГРЕГАТИВНЫХ *ESCHERICHIA COLI***

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

*Цель.* Изучение распространенности диареогенных *E.coli* энтероаггративной группы у детей с дисбиозом кишечника. *Материалы и методы.* Методом ПЦР были изучены факторы вирулентности у 511 штаммов *E. coli*, выделенных при бактериологическом исследовании проб фекалий 393 детей в возрасте до 2 лет. Чувствительность к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом, интерпретация результатов — согласно клиническим рекомендациям «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» 2015 г. *Результаты.* Идентифицированы 23 штамма энтероаггративных *E.coli* (EAggEC). Все штаммы содержали ген *aaf*, кодирующий агрегативно-адгезивные фимбрии и четыре других гена (*aggR*, *ast*, *aap*, *aatA*) в различных комбинациях, кодирующие факторы вирулентности EAggEC. 19 штаммов (87%) были нечувствительны к антимикробным препаратам. Резистентность к цефалоспорином расширенного спектра была обусловлена продукцией бета-лактамазой расширенного спектра (БЛРС) генетического семейства СТХ-М и цефалоспоринозой AmpC. *Заключение.* Результаты исследования показали, что 6 % детей с дисбиозами кишечника являются носителями EAggEC, что свидетельствует о необходимости детекции штаммов EAggEC — новой группы диареогенных *E. coli* не только у пациентов с диарейным синдромом, но и при дисбиозе кишечника.

Журн. микробиол., 2017, № 4, С. 54—58

Ключевые слова: энтероаггративные *Escherichia coli* (EAggEC), факторы вирулентности, резистентность к антимикробным препаратам, дети

*М.А.Makarova, L.V.Suzhaeva, L.A.Kaftyreva*

## **YOUNG AGE CHILDREN WITH INTESTINE DYSBIOSIS AS CARRIERS OF ENTEROAGGREGATIVE *ESCHERICHIA COLI***

Pasteur St. Petersburg Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Russia

*Aim.* Study the prevalence of diarrhea-genic *E. coli* of the enteroaggregative group in children with intestine dysbiosis. *Materials and methods.* PCR method was used to study virulence factors in 511 strains of *E. coli* isolated during bacteriologic study of feces samples from 393 children aged

less than 2 years. Sensitivity to antibiotics was determined by disc-diffusion method, results interpretation — according to clinical recommendations Determination of sensitivity of microorganisms to antimicrobial preparations, 2015. *Results.* 23 enteroaggregative *E. coli* strains were identified (EAggEC). All the strains had aaf gene coding aggregative-adhesion fimbriae and 4 other genes (aggR, ast, aap, aatA) in various combinations coding virulence factors EAggEC. 19 strains (87%) were not sensitive to antimicrobial preparations. Resistance to extended spectrum cephalosporins was determined by the production of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) of CTX-M genetic family and AmpC cephalosporinase. *Conclusion.* Results of the study have shown that 6% of children with intestine dysbiosis are EAggEC carriers, that gives evidence on the necessity of detection of EAggEC strains — a novel group of diarrhea-genic *E. coli* not only in patients with diarrhea syndrome, but also using intestine dysbiosis.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 4, P. 54—58

Key words: entero-aggregative *Escherichia coli* (EAggEC), virulence factors, resistance to antimicrobial preparations, children

## ВВЕДЕНИЕ

Известно, что патогенные для человека штаммы *E. coli* отличаются от типичных представителей нормальной микробиоты кишечника наличием генов вирулентности, которые определяют особенности патогенеза и клинических проявлений эшерихиозов. В настоящее время установлено, что *E. coli* — возбудители острых кишечных инфекций (ОКИ) подразделяются на шесть групп [7]. Представители каждой группы различаются по ключевым механизмам патогенеза и наличию специфических факторов вирулентности, делающих возможной их реализацию: энтеропатогенные (ЕРЕС), энтероинвазивные (ЕИЕС), энтеротоксигенные (ЕТЕС), энтерогеморрагические (ЕНЕС), энтероаггративные (ЕАggЕС), диффузно-адгерентные (ДАЕС).

Энтероаггративные *E. coli* (ЕАggЕС) как возбудители диарейных заболеваний являются новой, мало изученной группой диареогенных *E. coli* (DEC), способные вызывать персистирующие диареи, продолжающиеся более 14 дней. С середины 80-х годов эти возбудители выделены в отдельную группу в пределах DEC [6, 7, 8]. Эпидемиологические исследования, проведенные во многих странах, свидетельствуют о том, что ЕАggЕС являются возбудителями спорадических случаев ОКИ и групповых вспышек среди детей и взрослых. В крупных вспышках диарейных заболеваний, обусловленных ЕАggЕС, нередко факторами передачи являются контаминированные пищевые продукты и вода. ЕАggЕС часто становятся причиной ОКИ туристов, посещающих развивающиеся страны, детей и ВИЧ-инфицированных лиц, проживающих в развивающихся и развитых регионах мира [5, 6]; [Jun Yatsuyanagi et al., 2002; Koichi Tokuda et al., 2010; Thiago Azevedo Feitosa Ferro et al., 2012]. Обусловленные ими заболевания характеризовались легким, но длительным течением, что связано с выраженной адгезией и колонизацией эпителиальных клеток слизистой оболочки тонкого кишечника у лиц с ослабленным иммунитетом [Koichi Tokuda et al., 2010]. Популяция штаммов ЕАggЕС, выделенных в странах, где налажена их идентификация, характеризовалась широким набором маркеров вирулентности и резистентности к антимикробным препаратам (АМП). Показано, что штаммы ЕАggЕС содержат больше маркеров резистентности к АМП, по сравнению с другими DEC [4]. Значимость ЕАggЕС в этиологии ОКИ у детей в нашей стране продемонстрирована в нескольких работах: в Москве и Санкт-Петербурге применение ПЦР-диагностики показало, что у госпитализированных пациентов около 30% ОКИ эшерихиозной этиологии были обусловлены ЕАggЕС, при этом классическое бактериологическое исследование показало отрицательный результат [1, 3]. Получена достоверная

информация о распространенности DEC, включая EAggEC, при других заболеваниях желудочно-кишечного тракта, в частности, при дисбиотических состояниях [2]. В связи с вышеизложенным, целью настоящего исследования явилось изучение распространенности диареогенных *E.coli* энтероаггративной группы у детей с дисбиозом кишечника.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено бактериологическое исследование проб фекалий 393 детей в возрасте до двух лет согласно отраслевому стандарту 91500.11.0004-2003 «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника». Выделение и идентификацию штаммов *E. coli* проводили общепринятыми методами. Для дальнейшего изучения методом случайной выборки были отобраны 511 штаммов. Принадлежность к патогруппам DEC определяли набором реагентов «АмплиСенс® Эшерихиозы-FL» (ЦНИИ эпидемиологии) методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием амплификатора CFX 96™ Real-Time System (Bio-Rad, США). Выявление генов вирулентности EAggEC (aaf, aggR, pet, ast, aap, aatA) и генов, кодирующих продукцию бета-лактамаз, проводили, используя специфические олигонуклеотидные праймеры (ЗАО «Евроген», Москва), в ПЦР в мультиплексном формате с последующей электрофоретической детекцией [4]; [Koichi Tokuda et al., 2010]. ДНК выделяли в соответствии с методическими указаниями МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I — IV групп патогенности». Чувствительность к АМП: аминокеницилинам, цефалоспорином расширенного спектра (ЦРС), карбапенемам, аминогликозидам, хинолонам, ко-тримоксазолу, хлорамфениколу, тетрациклину определяли диско-диффузионным методом. Интерпретацию результатов проводили согласно клиническим рекомендациям «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» 2015 г.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При бактериологическом исследовании фекалий 393 детей в возрасте до 2 лет с диагнозом «дисбиоз кишечника» штаммы *E. coli* с типичными свойствами (подвижные, лактозоположительные) обнаружили в 77% проб. Из каждой пробы были отобраны по 1 — 2 колонии (всего 511) для детекции факторов вирулентности DEC. У 40 (10,2%) детей в геномах штаммов методом ПЦР-РВ с использованием набора реагентов «АмплиСенс® Эшерихиозы-FL» идентифицированы гены вирулентности, характерные для DEC (EPEC — 3,0%; EAggEC — 5,9%; DAEC — 1,3%). Гены вирулентности ETEC, EIEC и EHEC не были обнаружены. Детальному изучению были подвергнуты 23 штамма *E. coli*, идентифицированные как EAggEC, присутствующие в фекалиях детей в значительном количестве от  $10^5$  до  $10^9$  КОЕ/г. Идентифицировать серологическую группу выделенных EAggEC отечественным набором диагностических ОК-сывороток не удалось, так как штаммы не агглютинировались в ОК-сыворотках в реакции агглютинации, развернутой и на стекле. Штаммы имели различия по ферментации лактозы и сахарозы, подвижности и гемолитической активности. Более 90% были подвижные с типичными ферментативными свойствами.

Используя специфические олигонуклеотидные праймеры в мультиплексном формате ПЦР с последующей электрофоретической детекцией, мы выявили гены вирулентности EAggEC: aaf, aggR, aap, aatA, ast (табл.). Все штаммы имели основной ген aaf, кодирующий агрегативно-адгезивные фимбрии, и четыре других гена в различных комбинациях, которые кодируют факторы

вирулентности: *aggR* — активатор транскрипции, необходимый для экспрессии фимбрий (21 штамм — 91,3%), *aar* — секреторный белок дисперзин (21 штамм — 91,3%), *aatA* — эффлюксный белок (21 штамм — 91,3%), *ast* — термостабильный энтероагрегативный (EAST-1) токсин (6 штаммов — 26,3%). Ген *pet*, ответственный за продукцию термолабильного токсина в изучаемых штаммах, не был обнаружен.

Выявлены четыре комбинации генов вирулентности в штаммах EAggEC. В 23 штаммах EAggEC присутствовали от

одного (*aaf*) до пяти генов вирулентности. Большая часть штаммов (65,2%) содержала четыре гена при отсутствии гена, ответственного за продукцию EAST-1. Шесть штаммов (26,1%) содержали пять генов (*aaf*, *aggR*, *aar*, *aatA*, *ast*), в одном штамме (4,3%) присутствовали три гена (*aaf*, *aar*, *ast*).

Четыре штамма (17,4%) EAggEC характеризовались чувствительностью к 14 тестируемым АМП. Остальные 19 штаммов были нечувствительны к различным АМП (бета-лактамам, хлорамфениколу, ко-тримоксазолу, тетрациклину, налидиксовой кислоте, гентамицину и тобрамицину, но сохраняли чувствительность к карбапенемам, фторхинолонам и амикацину. Каждый второй штамм (56,5%) характеризовался множественной устойчивостью к АМП. Резистентность к ЦРС была обусловлена продукцией бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) генетического семейства СТХ-М и продукцией *AmpC* — цефалоспорины. БЛРС продуцирующие штаммы характеризовались сочетанной резистентностью к ко-тримоксазолу, хлорамфениколу и тетрациклину.

*E. coli* являются представителями нормальной факультативно-анаэробной микрофлоры толстого кишечника человека и животных. Обоснование их этиологической значимости при ОКИ, даже при массивном выделении из проб фекалий, является сложной задачей и требует применения дополнительных критериев. В настоящее время рутинная лабораторная диагностика, основанная на определении принадлежности штаммов *E. coli* к серологической O-группе, не позволяет достоверно оценить этиологическую значимость их при ОКИ. Наши исследования показали, что 6,0% детей раннего возраста, страдающие «дисбиотическим состоянием кишечника», являются бактерионосителями EAggEC, которые находятся в фекалиях в значительном количестве —  $10^5$  —  $10^9$  КОЕ/г. Штаммы содержали комплекс генов вирулентности и по этой характеристике соответствовали EAggEC, циркулирующим в разных

Гены вирулентности штаммов EAggEC

Штаммы EAggEC	гены вирулентности					
	<i>aggR</i>	<i>aaf</i>	<i>aar</i>	<i>aatA</i>	<i>pet</i>	<i>ast</i>
1	+	+	+	+	—	—
2	+	+	+	+	—	+
3	+	+	+	+	—	—
4	+	+	+	+	—	+
5	+	+	+	+	—	—
6	+	+	+	+	—	+
7	+	+	+	+	—	—
8	+	+	+	+	—	—
9	—	+	—	—	—	—
10	+	+	+	+	—	+
11	+	+	+	+	—	+
12	+	+	+	+	—	—
13	—	+	+	—	—	+
14	+	+	+	+	—	—
15	+	+	+	+	—	—
16	+	+	+	+	—	—
17	+	+	+	+	—	—
18	+	+	+	+	—	—
19	+	+	+	+	—	—
20	+	+	+	+	—	—
21	+	+	+	+	—	—
22	+	+	+	+	—	—
23	+	+	+	+	—	—
Всего	21 (91,3%)	23 (100%)	21 (91,3%)	21 (91,3%)	0	6 (26,3%)

Примечание. + Ген присутствует в геноме штамма; — ген отсутствует в геноме штамма.

странах [4]; [Koichi Tokuda et al., 2010]. Выделенные нами подвижные, лактозоположительные штаммы EAggEC по существующим критериям оценки Отраслевого стандарта 91500.11.0004-2003 «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» расцениваются как представители нормальной факультативно-анаэробной микробиоты кишечника человека, а пациенты, являющиеся реальными источниками патогенных *E.coli*, резистентных к АМП, продуцирующих БЛРС, остаются вне поля зрения клиницистов, инфекционистов и эпидемиологов — не получают адекватной этиотропной терапии, эпидемиологи не проводят профилактические мероприятия по ограничению циркуляции данных возбудителей.

Идентификация EAggEC в настоящее время невозможна без детекции генов вирулентности. При проведении диагностических исследований классическим бактериологическим методом скрининг на носительство DEC не может быть проведен из-за отсутствия необходимого большого набора сывовороток для типирования O- и H-антигенов, что, в свою очередь, связано с высокими экономическими и трудозатратами. В России разработаны тест-системы для ПЦР-диагностики DEC, включая EAggEC, но в рутинной лабораторной практике этот метод пока используется в ограниченном объеме [1, 3]. Методы с использованием некультуральных методик, такие как ПЦР, дают большие надежды на повышение чувствительности и достоверности диагностического исследования. Рутинные исследования, традиционно считающиеся «золотым стандартом», будут иметь решающее значение для определения чувствительности к АМП.

*Три штамма EAggEC, впервые выделенные в России, депонированы в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» (№ В-7739, 7740, 7741).*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Горелов А. В., Бондарева А. В., Подколзин А.Т. Клинико-эпидемиологическая характеристика энтероагрегативного эшерихиоза у детей. *Инфекционные болезни*. 2013, 11 (3): 22-26.
2. Оришак Е.А., Щеглов В.С., Бойцов А.Г. Обоснование расширения спектра выявляемых микроорганизмов при исследовании на дисбиоз кишечника. *Проблемы медицинской микологии*. 2013, 15 (3): 18-21.
3. Соколова Е. Д., Галтаева А. М., Замурий О. Ю., Дидиченко О. В., Соколова Ю. В., Муратова В. А., Лигорова О. Ю., Журавлева И. Н., Макарова М. А., Кафтырева Л. А. Полимеразная цепная реакция в диагностике острых кишечных инфекций в детском инфекционном стационаре: возможности и проблемы. *Инфекция и иммунитет*. 2016, 6 (3): 225-231.
4. Aslani M. M., Alichani M. Y., Zavari A. et al. Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) clinical isolates and their antibiotic resistance pattern. *Int. J. Infect. Dis.* 2011, 15 (2): 136-139.
5. Geser N., Stephan R., Korczak B. M. et al. Molecular identification of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase genes from Enterobacteriaceae isolated from healthy human carriers in Switzerland. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012, 56: 1609-1612.
6. Knutton S., Shaw R., Phillips A. D. et al. Phenotypic and genetic analysis of diarrhea-associated *Escherichia coli* isolated from children in the United Kingdom. *J. Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2001, 33 (1): 32-40.
7. Nataro J. P., Kaper J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 1998, 11 (1): 142-201.
8. Nataro J. P., Steiner T., Guerrant R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases*. 1998, 4 (2): 251-261.

*Поступила 20.02.17*

Контактная информация: Макарова Мария Александровна, к.м.н., 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14, р.т. (812) 232-48-83

*А.В.Семенов<sup>1,2,3</sup>, Ю.В.Останкова<sup>1</sup>, М.А.Чурина<sup>1</sup>, Н.А.Никитина<sup>1</sup>, А.П.Росоловский<sup>4</sup>,  
Е.В.Гребенкина<sup>4</sup>, Т.Н.Ткаченко<sup>5</sup>, Т.А.Жандармова<sup>5</sup>, Арег А.Тотолян<sup>1,2</sup>*

## **МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ПРИ РАССЛЕДОВАНИИ СЛУЧАЯ ПЕРЕДАЧИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ**

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, <sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П.Павлова, <sup>3</sup>Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова, <sup>4</sup>Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Новгородской области, <sup>5</sup>Новгородский Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями «Хелпер»

*Цель.* Эпидемиологическое расследование случая группового инфицирования ВИЧ-1 на основании данных, полученных общепринятыми методами диагностики, для подтверждения следственной гипотезы об умышленном инфицировании ВИЧ при гетеросексуальном контакте. *Материалы и методы.* Были использованы образцы плазмы крови 8 пациентов с ВИЧ-инфекцией (5 женщин и 3 мужчин) из г. Великий Новгород, направленные для проведения эпидемиологического расследования. Определение проводили на основе анализа нуклеотидных последовательностей участка гена полимеразы (pol) протяженностью 1285 нт. *Результаты.* Проведенное исследование позволило идентифицировать ВИЧ в клинических образцах, отправленных на экспертизу, и установить филогенетические связи между изолятами вируса, полученными как от пациентов целевой группы, так и от пациентов контрольной группы. При анализе полученных результатов можно выделить образцы, сгруппированные в отдельный кластер, что указывает на тесные родственные связи изолятов вируса, выделенного из клинического материала этих пациентов, между собой. Пациенты целевой группы заражены изолятом ВИЧ-1 циркулирующей рекомбинантной формы CRF03\_AB, происходящим из одного источника, что подтверждается высокой гомологией нуклеотидных последовательностей. *Заключение.* В ходе эпидемиологического расследования случая группового инфицирования ВИЧ-1 было определено, что заражение женщин целевой группы произошло из одного источника. Результаты филогенетического анализа указывают на наличие эпидемиологической связи внутри обследуемой группы, что подтверждает случай передачи ВИЧ-инфекции и выводы, сделанные в ходе следствия. Использование для молекулярно-филогенетического анализа данных, полученных методами лабораторной диагностики резистентности ВИЧ к антиретровирусным препаратам, позволяет в сочетании с анамнестической и следственной информацией (в контексте имеющихся доказательств) расследовать случаи инфицирования ВИЧ.

Журн. микробиол., 2017, № 4, С. 59—66

**Ключевые слова:** передача ВИЧ-инфекции, молекулярная эпидемиология, ген pol, протеаза, обратная транскриптаза, субтип, молекулярно-эпидемиологическое расследование

*A.V.Semenov<sup>1,2,3</sup>, Yu.V.Ostankova<sup>1</sup>, M.A.Churina<sup>1</sup>, N.A.Nikitina<sup>1</sup>, A.P.Rosolovsky<sup>4</sup>,  
E.V.Grebenkina<sup>4</sup>, T.N.Tkachenko<sup>5</sup>, T.A.Zhandarmova<sup>5</sup>, Areg A.Totolyan<sup>1,2</sup>*

## **MOLECULAR-BIOLOGICAL METHODS OF DIAGNOSTICS FOR INVESTIGATION OF HIV INFECTION TRANSMISSION**

<sup>1</sup>Pasteur St. Petersburg Research Institute of Epidemiology and Microbiology, <sup>2</sup>Pavlov St. Petersburg State Medical University, <sup>3</sup>Mechnikov Northwestern State Medical University, <sup>4</sup>Administration of the Rospotrebnadzor for Novgorod Region, <sup>5</sup>Novgorod Centre for Prophylaxis and Control of AIDS and Infectious Diseases «Helper», Novgorod, Russia

*Aim.* Epidemiologic examination of the case of group HIV-1 infection based on data obtained by general diagnostics methods for confirmation of the investigation hypothesis of deliberate HIV infection during heterosexual intercourse. *Materials and methods.* Sera samples from 8 HIV infected patients (5 female and 3 male) from Veliky Novgorod sent for epidemiologic investigation were used. Determination was carried out based on 1285 nt sequence analysis of polymerase gene segment (pol). *Results.* The study allowed to identify HIV in clinical samples sent to the expertise and establish phylogenetic connections between virus isolates obtained from both target and control group patients. Analysis of the results allowed to isolate samples grouped in a separate cluster that indicates tight cordial connections between the virus isolates from clinical material of these patients. Patients of the target group were infected with HIV-1 isolate of the circulating recombinant form CRF03\_AB from the same origin that is confirmed by high homology of the nucleotide sequences. *Conclusion.* Epidemiologic investigation of a group case of HIV-1 infection has determined that the infection of the women of the target group occurred from the same source. Phylogenetic analysis results indicate the presence of an epidemiologic connection within the examined group that confirms the HIV infection transmission and conclusions of the investigation. Use of molecular-phylogenetic analysis of data obtained by laboratory diagnostics methods of HIV resistance to antiretroviral preparations allows with anamnestic and investigation information (in the context of available evidence) to investigate cases of HIV infection.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 4, P. 59—66

Key words: HIV infection transmission, molecular epidemiology, pol gene, protease, reverse transcriptase, subtype, molecular-epidemiologic investigation

## ВВЕДЕНИЕ

В Российской Федерации на 31 декабря 2015 г. зарегистрированы 1 006 388 человек, инфицированных ВИЧ, что составляет около 0,7% населения страны. При этом пораженность составляет 541,8 на 100 тыс. населения, а заболеваемость в 2015 г. составила 63,6 на 100 тыс. населения [1]. В последние годы наблюдается тенденция к увеличению доли гетеросексуального пути передачи в распространении вируса и активного участия женщин в эпидемическом процессе [5]. Среди впервые выявленных в 2015 г. ВИЧ-положительных больных с установленными факторами риска заражения 44% были инфицированы при гетеросексуальных контактах. Особое место занимают случаи умышленного инфицирования ВИЧ посредством половых контактов.

Как известно, поведение ВИЧ-инфицированных принято рассматривать на двух уровнях: с точки зрения последствий для самого больного и последствий для окружающих его людей. При этом, в качестве ответа на психологическую травму больной может демонстрировать опасное для общества поведение, в том числе намеренно распространяя инфекцию, стремясь заразить как можно большее число людей, известны случаи намеренного заражения как мести за собственное инфицирование [7]. При этом показано, что у мужчин с увеличением возраста уменьшается положительная переоценка ситуации и корреляция с самоконтролем. У мужчин выражен высокий уровень такого механизма психологической защиты, как вытеснение, ведущее к низкому уровню осознания опасности для больного и окружающих его людей нестабильного рискованного поведения, включающего в себя употребление алкоголя, наркотических веществ и беспорядочные половые связи. ВИЧ-инфицированные с высоким уровнем такого типа психологической защиты могут демонстрировать агрессивное и враждебное поведение. Одним из вариантов такого поведения является поиск новых половых партнеров с дальнейшим намеренным инфицированием их ВИЧ.

При анализе полового поведения ВИЧ-инфицированных было выявлено

большое количество больных, знавших о наличии ВИЧ-инфекции, но при этом имевших сексуальных партнеров, в том числе случайных, что указывает на высокий уровень сексуальной активности и рискованное для окружающих поведение больных [4].

Следует отметить, что ВИЧ-инфицированные больные, ведущие активную половую жизнь с постоянными и случайными партнерами, часто не задумываются о возможности заражения партнера. Кроме того, в большинстве случаев, ВИЧ-инфицированные не знают или не осознают в полной мере, что в отсутствии согласия их партнеров на принятие риска, половые контакты могут быть квалифицированы как уголовное преступление на основании ст. 122 действующего УК РФ [8].

Таким образом, в случае обнаружения групповых случаев ВИЧ-инфекции возникает необходимость выявления общего источника инфицирования. При этом желательно использование стандартизированных методов лабораторной диагностики.

Целью нашей работы было эпидемиологическое расследование случая группового инфицирования ВИЧ-1 на основании данных, полученных общепринятыми методами диагностики, для подтверждения следственной гипотезы об умышленном инфицировании ВИЧ при гетеросексуальном контакте.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы образцы плазмы крови 8 пациентов с ВИЧ-инфекцией (5 женщин и 3 мужчин) из г. Великий Новгород, направленные в Северо-Западный Окружной Центр по профилактике и борьбе со СПИД (СЗО Центр СПИД) на базе Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера в 2016 г. для проведения эпидемиологического расследования. Исследованный материал представлен двумя группами: клинический материал из предполагаемого очага инфицирования (4 человека, в т.ч. 3 женщины и 1 мужчина, который был предполагаемым источником инфицирования, далее целевая группа), а также клинический материал от заведомо не вовлеченных в предполагаемый очаг пациентов с ВИЧ-инфекцией (4 человека, в т.ч. 2 женщины и 2 мужчин, образцы сравнения).

Для всех образцов проводили предварительное концентрирование вируса ультрацентрифугированием плазмы крови в течение 1 часа при 24 000g, +4°C. Выделение РНК ВИЧ-1 из клинического материала и обратную транскрипцию для получения кДНК проводили с использованием коммерческих наборов «РИБО-золь-Е» (ЦНИИЭ, Москва). Определение субтипов ВИЧ-1 проводили на основе анализа нуклеотидных последовательностей участка гена полимеразы (pol) протяженностью 1285 нт., кодирующего ген протеазы (PR) протяженностью 465 нт. и участок гена обратной транскриптазы (RT) протяженностью 820 нт. Для обратной транскрипции и амплификации использовали коммерческие наборы «ОТ-ПЦР-комплект-Pro/Rev» и «ПЦР-комплект-Pro/Rev» (ЦНИИЭ, Москва) в трех повторностях, согласно инструкции производителя.

Продукты первичной амплификации и секвенирующей реакции очищали с помощью набора реагентов «Ампли-Сорб». Для контроля качества очищения продуктов амплификации проводили оценку в 1,5% агарозном геле с добавлением раствора бромистого этидия (0,5 мкг/мл), визуализировали в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе. Концентрацию НК дополнительно измеряли на флуориметре Qubit 2.0 по стандартной методике, рекомендован-

ной производителем. Очищенный фрагмент достаточной концентрации использовали для постановки секвенирующих реакций.

Секвенирующую реакцию проводили согласно инструкции к набору «АмплиСенс® HIV-Resist-Seq» (ЦНИИЭ, Москва). Для анализа продукта секвенирующей реакции очищенный осадок денатурировали в формамиде и помещали в генетический анализатор ABI Prism 3500 (Applied Biosystems, США).

Для определения филогенетических связей изолятов был проведен филогенетический анализ, где в качестве контрольных образцов группы сравнения использовали 20 изолятов ВИЧ-1 от больных, проживающих в соответствующем географическом регионе, полученные ранее НИИЭМ им. Пастера в период 2014 — 2016 гг. из Новгородского центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями «Хелпер».

Обработка данных, полученных в ходе секвенирования фрагментов, и получение консенсусной нуклеотидной последовательности проводили с помощью программного обеспечения ДЕОНА (ООО «МедАйтиГрупп», Россия). Первичный анализ полученных консенсусных нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы NCBI Blast в сравнении с нуклеотидными последовательностями, представленными в GenBank. Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили в программе MEGA версия 5, используя алгоритм ClustalW. В связи с тем, что для исследуемого региона ВИЧ-1 показана высокая скорость молекулярной эволюции с неравномерной фиксацией нуклеотидных замен, оценку эволюционного расстояния между последовательностями проводили по модифицированной формуле Тамуры-Ней, для построения филогенетических деревьев и последующего филогенетического анализа применяли алгоритм Neighbor-joining, позволяющий оптимизацию деревьев в соответствии с критерием «сбалансированной минимальной эволюции», при оценке достоверности филогенетических связей использовали бутстреп анализ для 500 независимых построений каждого филогенетического дерева [17].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для всех образцов была получена нуклеотидная последовательность искомого региона удовлетворительного качества, пригодная для дальнейшего анализа. Группа сравнения была подобрана согласно рекомендованным международным критериям: совпадающий географический регион проживания, близкие сроки инфицирования, однородный социальный контекст, оптимальная численность 20 — 50 образцов [10]. Применение молекулярно-эпидемиологических методов для расследования случаев инфицирования осложняется тем, что зачастую в относительно гомогенной группе проводится анализ изолятов, полученных спустя различное время от первичного инфицирования и с неизвестным промежутком времени между заражением и временем проведения анализа, в то время как эволюция вируса зависит, в том числе, от индивидуальных особенностей хозяина и от стадии заболевания [12]. Проведенное исследование позволило идентифицировать ВИЧ в клинических образцах, отправленных на экспертизу, и установить филогенетические связи между изолятами вируса, полученными как от пациентов целевой группы, так и от пациентов контрольной группы.

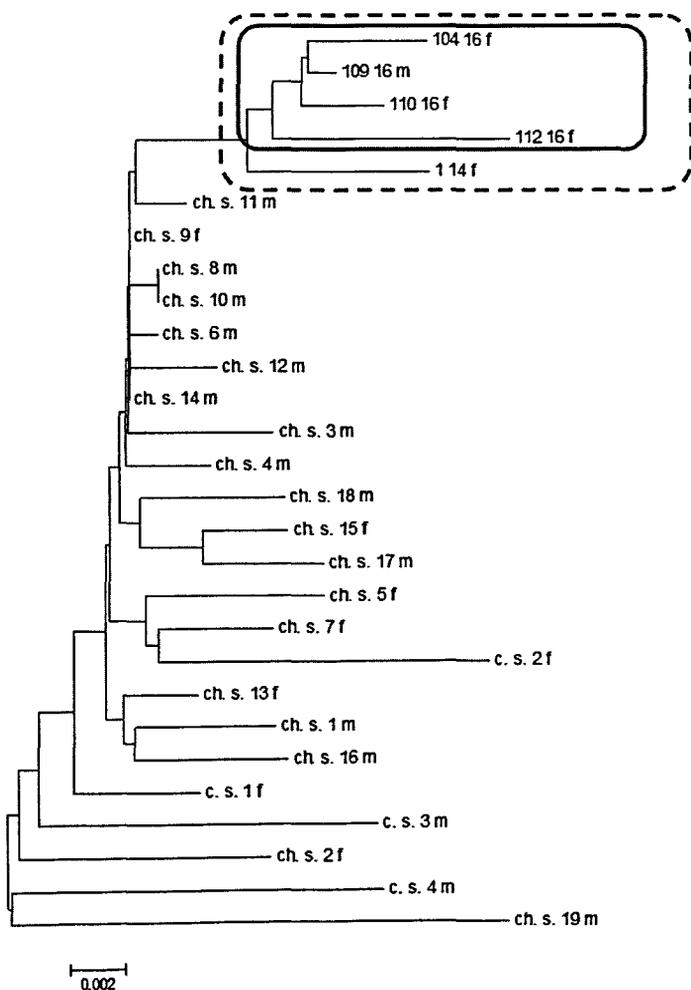
Результат филогенетического анализа графически представлен на рис.

При анализе полученных результатов можно выделить сгруппированные в отдельный кластер образцы рег. № 104\_16\_f, № 109 16 m, № 110 16 f, № 112

16 f, что указывает на тесные родственные связи изолятов вируса, выделенного из клинического материала этих пациентов, между собой. На рис. этот кластер обведен сплошной линией. Весьма близко к описанной группе примыкает образец, выделенный от пациентки рег. № 1\_14\_f, что может указывать на общность происхождения изолятов вируса у всех этих пациентов (кластер обведен пунктирной линией). Остальные проанализированные изоляты ВИЧ-1 кластеризуются в отдельные от вышеописанных образцов группы. Это позволяет достоверно утверждать, что между целевой группой и группой контроля отсутствует тесная филогенетическая связь. Таким образом, можно утверждать, что пациенты контрольной группы и пациенты целевой группы рег. № 104 16 f, № 109 16 m, № 110 16 f, № 112 16 f, № 1 14 f заражены ВИЧ-1 из независимых друг от друга источников.

Пациенты с рег. № 104 16 f, № 109 16 m, № 110 16 f, № 112 16 f, № 1 14 f заражены изолятом ВИЧ-1 циркулирующей рекомбинантной формы CRF03\_AB, происходящим из одного источника, что подтверждается высокой гомологией нуклеотидных последовательностей, полученных в результате анализа из клинического материала пациентов. Нуклеотидная идентичность в пределах группы составила 97,25%, тогда как между ближайшими образцами целевой группы и группы сранения, относящихся к субтипу A1, не превышала 90%. Следует отметить, что причиной выявленных различий в пределах целевой группы является, вероятнее всего, разное время инфицирования, реинфекция, влияние антиретровирусной терапии в двух случаях и высокая скорость эволюции ВИЧ.

Выявленный в целевой группе ВИЧ-1 варианта CRF03\_AB в Российской Федерации впервые опи-



Дендрограмма, характеризующая филогенетические отношения изолятов ВИЧ-1, выделенных на территории Новгородской области в 2014 — 2016 гг. Выделена целевая группа, относительно которой проводили анализ.

**Естественные полиморфные варианты в регионах протеазы и обратной транскриптазы, выявленные в целевой и контрольной группах**

Группы	Естественные полиморфные варианты, выявленные в регионе протеазы	Естественные полиморфные варианты, выявленные в регионе обратной транскриптазы
Целевая	L10I, I13V/IV, K14R, G16E, E35D, M36I, N37T, R41K, R57K, I62IT, L63V/S/FS, H69K, K70R, L89M, I93L	E6EK, T7P, K11T/A, V35IT/T, E36D, T39N/M/LMR, K122P, I135RT, I142T, V148VG, S162SN, K173Q/KQ, D177E, Q207E/EG, V245VM/M
Контрольная	L10LI/V, K14RT/R, I15V, E34Q, E35D, M36I, N37D, R41K, Q61E, L63IM/V, I64IM, H69K, A71I, V77I, L89M, I93L	P9K, K11KT, P14A, V35T, E36D, T39N/GR/K/TN, V60I, S68G, T69N, K102Q, V106I, D121H, K122E, D123S/N, I135T, I142IV, K154KE, P157PA, A158AS, S162C/SC, S163SN, K173L/V/S, Q174K, D177E, I178IL, V189VI, T200A/I, E203D, Q207A, R211S, F214FL, L228LH, V245M/Q, E248D, V254VG, A272AP

сан в 1996 г. в связи с эпидемической вспышкой, связанной с употреблением инъекционных наркотиков. В Северо-Западном Федеральном округе (СЗФО) данная форма вируса широко распространена в Калининградской области и в единичных случаях описана за ее пределами (например, в г.Череповец Вологодской области) [16]. Уже в 2009 г. в Новгородской области показано преобладание доли пути передачи вируса посредством гетеросексуальных контактов по сравнению с другими путями [6], а распространенность варианта CRF03\_AB, исключая ранее упомянутые регионы эпидемических вспышек, в СЗФО очень низка даже в более поздние годы в самых пораженных эпидемией ВИЧ регионах [2, 3]. При этом у мужчины, являющегося предполагаемым источником инфицирования, 1 положительный иммуноблот — в 2004 г., с 2006 г. больной поставлен на учет в Новгородский центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями «Хелпер». У женщин (предположительных реципиентов) 1 положительный иммуноблот — в 2016 г. (половая связь с предполагаемым источником инфицирования 2013 — 2015 гг., 2014 — 2015 гг., 2015 г.), за исключением пациентки рег. № 1 14 f, 1 положительный иммуноблот которой — в 2011 г. Мужчина и женщины рег. № 104 16 f, № 112 16 f не получали антиретровирусную терапию (АРВТ). Пациентка рег. № 110 16 f впервые начала принимать АРВТ в 2016 г. Пациентка рег. № 1 14 f трижды начинала терапию антиретровирусными препаратами (АРВП), однако низкая приверженность к лечению привела к прогрессированию заболевания до стадии 4Б.

Ни в одном из образцов целевой группы не были выявлены значимые мутации лекарственной устойчивости, однако показан ряд естественных полиморфных вариантов в проанализированных регионах генов протеазы и обратной транскриптазы как сходные у всех членов группы, так и отличающиеся. При этом наряду с мутациями, встречающимися среди ВИЧ-инфицированных лиц контрольной группы (PR: E35D, M36I, R41K, H69K, L89M, I93L; RT: K11T, V35T, E36D, T39M, D177E), обнаружены полиморфные варианты, характерные только для целевой группы (табл.).

Так, полиморфный вариант G16GE, показанный у мужчины в регионе протеазы и выявленный у всех пациенток в форме G16E, ни у одного ВИЧ-инфицированного из Великого Новгорода отмечен не был. R57K и K70R, показанные у мужчины, выявлены у всех женщин, кроме рег. № 1 14 f, и также не встречаются в контрольной группе. Следует отметить, что полиморфные варианты G16E и R57K относят к мутациям, связанным с частичной лекарственной устойчивостью или поддерживающим лекарственную устойчивость ВИЧ-1 субтипа В [9]. При этом, замена R57K ассоциирована с вирусологиче-

ской неэффективностью АРВТ у АРВТ-наивных пациентов [13], а сочетание полиморфных вариантов E35D + R57K, обнаруженное у всех ВИЧ-инфицированных целевой группы, может возникать за счет воздействия лекарственных веществ и приводить к фармакорезистентности вируса не-В субтипа, что, очевидно, особенно актуально в случае рекомбинантной формы CRF03\_AB [Liu Z. et al., 2016]. Учитывая, что трое пациентов, включая мужчину, являющегося предполагаемым источником инфицирования, не принимали АРВТ, вероятнее всего, данная мутация (или сочетание мутаций) была получена из первичного источника инфекции. Обращает на себя внимание мутация L63FS, наличествующая у всех женщин в варианте L63S, за исключением рег. № 1 14 f, у которой присутствует в варианте L63V, при этом такая же форма выявлена в контрольной группе у трех ВИЧ-инфицированных с неэффективной АРВТ. Полиморфный вариант I13IV, показанный у мужчины, был выявлен только у пациентки рег. № 1 14 f в форме I13V, но при этом встречается среди пациентов контрольной группы.

При анализе мутаций в регионе обратной транскриптазы обращают на себя внимание полиморфные варианты K122P, K173Q и Q207E, присутствующие у всех больных целевой группы, тогда как среди пациентов контрольной группы мутации в этих регионах встречаются только в виде K122E, K173L/V/S и Q207A соответственно. При этом мутации K122E и Q207E описаны как полиморфные варианты, вероятно, связанные с лекарственной устойчивостью ВИЧ [11, 14, 15]. Полиморфный вариант V245VM в гене обратной транскриптазы, показанный у мужчины, был выявлен только у пациентки рег. № 1 14 f в форме V245M, но при этом встречается среди пациентов контрольной группы.

Описанная выше ситуация, при которой мутации, обнаруженные в изоляте, полученном от мужчины, наличествуют у всех женщин целевой группы, кроме пациентки рег. № 1 14 f, или, напротив, отсутствуют у всех, кроме нее, объясняется существенным промежутком времени между заражениями, за которое в ходе молекулярной эволюции вируса могла произойти утрата полиморфных вариантов изолятом, полученным от пациентки рег. № 1 14 f, либо возникновением данных мутаций ВИЧ у пациента рег. № 109 16 m на более поздних этапах развития вируса.

В ходе эпидемиологического расследования случая группового инфицирования ВИЧ-1 было определено, что заражение женщин целевой группы произошло из одного источника. Результаты филогенетического анализа указывают на наличие эпидемиологической связи внутри обследуемой группы, что подтверждает случай передачи ВИЧ-инфекции и выводы, сделанные в ходе следствия. Показана безусловная общность изолятов ВИЧ-1, выделенных из клинического материала пациентов целевой группы и пациентки рег. № 1 14 f, ранее не привлекавшейся в качестве потерпевшей в данном уголовном деле.

Использование для молекулярно-филогенетического анализа данных, полученных методами лабораторной диагностики резистентности ВИЧ к антиретровирусным препаратам, позволяет в сочетании с анамнестической и следственной информацией (в контексте имеющихся доказательств) расследовать случаи инфицирования ВИЧ.

## ЛИТЕРАТУРА

1. ВИЧ-инфекция в Российской Федерации на 31 декабря 2015 г. Федеральный центр СПИД. URL: <http://www.hivrussia.ru/news/index.shtml>. Дата обращения 24.02.2016.
2. Дементьева Н.Е., Сизова Н.В., Лисицина З.Н. и др. Анализ субтипов и фармакорези-

- стентных вариантов ВИЧ, циркулирующих среди ВИЧ-инфицированных пациентов Санкт-Петербурга. ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2011, 3 (4): 34-44.
3. Зайцева Н.Н., Пекшева О.Ю., Парфенова О.В. и др. Современные молекулярно-генетические технологии в надзоре за циркуляцией субтипов ВИЧ-1. Современные технологии в медицине. 2016, 8 (1): 121-127.
  4. Плавинский С.Л., Барина А.Н., Бобрик А.В. и др. Сексуальное поведение ВИЧ-инфицированных лиц группы риска. Необходимость дальнейшего усиления профилактической работы. ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2009, 1: 102-108.
  5. Смольская Т.Т., Огурцова С.В. ВИЧ-инфекция в Северо-Западном федеральном округе РФ в 2009 г. Инфекция и иммунитет. 2011, 1 (4): 311-318.
  6. Смольская Т.Т., Огурцова С.В. Обзор состояния эпидемии ВИЧ-инфекции в Северо-Западном федеральном округе РФ в 1987-2009 гг. ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2011, 3 (1): 27-36.
  7. Тулупьева Т.В., Тулупьев А.Л., Пашенко А.Е. и др. Психологическая защита и копинг-стратегии ВИЧ-инфицированных с позиции опасности для общественного здоровья: автоматизация сбора данных и итоги исследования. Труды СПИИРАН. 2007, 4: 357-387.
  8. Фаргиев И. Уголовно-правовая оценка заражения венерической болезнью. Уголовное право. 2010, 1: 42-44.
  9. Azam M., Malik A., Rizvi M. et al. Emergence of drug resistance-associated mutations in HIV-1 subtype C protease gene in North India. Virus Genes. 2013, 47 (3): 422-428.
  10. Bernard E.J., Azad Y., Vandamme A.M. et al. HIV forensics: pitfalls and acceptable standards in the use of phylogenetic analysis as evidence in criminal investigations of HIV transmission. HIV Med. 2007, 8 (6): 382-387.
  11. Krishnan K.M., Amsavathani S. Polymorphisms of HIV RT gene among the ART naive native drug exposed rural PLHA. J. Glob. Infect. Dis. 2012, 4 (2): 110-113.
  12. Machuca R., Jørgensen L.B., Theilade P. et al. Molecular investigation of transmission of human immunodeficiency virus type 1 in a criminal case. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2001, 8 (5): 884-890.
  13. Masquelier B., Droz C., Dary M. et al. R57K polymorphism in the human immunodeficiency virus type 1 protease as predictor of early virological failure in a cohort of antiretroviral-naive patients treated mostly with a nelfinavir-containing regimen. Antimicrob. Agents Chemother. 2003, 47 (11): 3623-3626.
  14. Mohanakrishnan K., Kasthuri A., Amsavathani S.K. et al. HIV reverse transcriptase gene mutations in anti-retroviral treatment naive rural people living with HIV/AIDS. Indian J. Med. Microbiol. 2015, 33 (4): 565-567.
  15. Shanmugasundaram U., Solomon S., Madhavan V. et al. Analysis of selection pressure and mutational pattern of HIV type 1 reverse transcriptase region among treated and nontreated patients. AIDS Res. Hum. Retroviruses. 2010, 26 (10): 1093-1096.
  16. Smolskaya T., Liitsola K., Zetterberg V. et al. HIV epidemiology in the Northwestern Federal District of Russia: Dominance of HIV type 1 subtype A. AIDS Res. Hum. Retroviruses. 2006, 22 (11): 1074-1080.
  17. Tamura K., Peterson D., Peterson N. MEGA 5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol. Biol. Evol. 2011, 28 (10): 2731-2739.

*Поступила 20.02.17*

Контактная информация: Останкова Ю.В.,  
197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14, р.т. (812)233-20-92

П.А.Савинков<sup>1,2</sup>, Т.Н.Рыбалкина<sup>1</sup>, Н.В.Каражас<sup>1</sup>,  
Р.Е.Бошьян<sup>1,3</sup>, М.Ю.Калугина<sup>1</sup>, М.Н.Корниенко<sup>1</sup>,  
Е.В.Русакова<sup>1</sup>, Е.М.Бурмистров<sup>1</sup>, И.А.Солдатова<sup>2</sup>

## **ВЫЯВЛЕНИЕ МАРКЕРОВ ГЕРПЕСВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ И ПНЕВМОЦИСТОЗА У ДЕТЕЙ, РОЖДЕННЫХ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫМИ МАТЕРЯМИ**

<sup>1</sup>Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи, <sup>2</sup>Инфекционная клиническая больница № 2, Москва; <sup>3</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова

*Цель.* Изучить роль герпесвирусов и пневмоцист в инфекционных осложнениях у детей, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями. *Материалы и методы.* Исследованы сыворотки и клетки крови от 59 детей, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями, на наличие различных маркеров герпесвирусных инфекций и пневмоцистоза комплексом методов современной лабораторной диагностики. *Результаты.* Частота выявления маркеров герпесвирусных инфекций составила от 10% для вируса ветряной оспы у детей с неокончательным тестом на ВИЧ до 93% для вируса простого герпеса у ВИЧ-инфицированных детей из закрытых организованных коллективов. Признаки активной инфекции у детей с ВИЧ-инфекцией, подтвержденной лабораторно, в 2,5 раза чаще диагностировали для ВПГИ и ветряной оспы и в 1,8 раза чаще для ВГЧИ-6 и пневмоцисты, чем у детей с неокончательным тестом на ВИЧ. У детей с подтвержденной ВИЧ-инфекцией обнаружены маркеры различных стадий заболевания оппортунистическими инфекциями (ОИ): первичной острой и латентной формы инфекции, реактивации, реконвалесценции, тогда как у детей с неокончательным тестом на ВИЧ преобладали материнские антитела к герпесвирусам и пневмоцисте. Маркеры активных инфекций, за исключением ВПГИ и ВГЧИ-6, чаще выявляли у детей, проживающих в семьях, чем у детей из закрытых организованных коллективов. *Заключение.* Выявленная особенность — более низкий процент обнаружения маркеров активных форм ОИ у ВИЧ-инфицированных детей из социальных учреждений — обусловлена тем, что наблюдение за этими детьми осуществляют медицинские работники, имеющие необходимые знания и опыт профилактики инфекционных осложнений у ВИЧ-инфицированных, тогда как в отношении домашних детей с ВИЧ-инфекцией противоэпидемический режим должным образом часто не соблюдается. Другим фактором, способствующим распространению оппортунистических инфекций, является асоциальный образ жизни взрослых из большинства обследованных семей. Такие данные диктуют необходимость совершенствования противоэпидемического режима и профилактики оппортунистических инфекций в семейных очагах. Для этого целесообразно обследовать на маркеры герпесвирусных инфекций и пневмоцистоза не только ВИЧ-инфицированных детей, но и всех членов семьи с целью выявления источников инфекции и своевременного проведения профилактических мероприятий.

Журн. микробиол., 2017, № 4, С. 67—74

**Ключевые слова:** ВИЧ-инфекция, оппортунистические инфекции, герпесвирусные инфекции, пневмоцистоз, маркеры активной или острой инфекции, реактивация инфекции

P.A.Savinkov<sup>1,2</sup>, T.N.Rybalkina<sup>1</sup>, N.V.Karazhas<sup>1</sup>,  
R.E.Boshyan<sup>1,3</sup>, M.Yu.Kalugina<sup>1</sup>, M.N.Kornienko<sup>1</sup>,  
E.V.Rusakova<sup>1</sup>, E.M.Burmistrov<sup>1</sup>, I.A.Soldatova<sup>2</sup>

## **DETECTION OF MARKERS OF HERPES VIRUS INFECTION AND PNEUMOCYSTOSIS IN CHILDREN FROM HIV-INFECTED MOTHERS**

<sup>1</sup>Gamaleya Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology, <sup>2</sup>Infectious Clinical Hospital No. 2, Moscow; <sup>3</sup>Sechenov First Moscow State Medical University, Russia

*Aim.* Study the role of herpes viruses and pneumocystis in infectious complications in children from HIV-infected mothers. *Materials and methods.* Sera and blood cells from 59 children from HIV-infected mothers were studied for the presence of various markers of herpes virus infections and pneumocystosis by a complex of methods of modern laboratory diagnostics. *Results.* Frequency of detection of markers of herpes virus infection was from 10% for chicken pox in children with non-final HIV test to 93% for herpes simplex virus in HIV-infected children from closed organized groups. Signs of active infection in children with laboratory confirmed HIV infection were diagnosed 2.5 times more frequently for HSV infection and chicken pox and 1.8 times more frequently for HHV-6 and pneumocystis than in children with non-final HIV test. Markers of various disease stages with opportunistic infections (OI) were detected in children with confirmed HIV-infection: primary acute and latent forms of the infection, reactivation, reconvalescence, whereas in children with non-final HIV test maternal antibodies against herpes virus and pneumocystis predominated. Markers of active infections excluding HSV and HHV-6 were more frequently detected in children from families than in children from closed organized groups. *Conclusion.* The feature detected — a lower percentage of detection of markers of active forms of OI in HIV-infected children from social institutions — is determined by the fact that observation of these children is carried out by medical personnel that have the knowledge and experience of prophylaxis of infectious complications in HIV-infected children, whereas quality anti-epidemic regimen is frequently not maintained regarding home children with HIV infection. Another factor facilitating spread of opportunistic infections is the asocial lifestyle of most of the examined families. These data dictate the necessity of enhancement of anti-epidemic regimen and prophylaxis of opportunistic infections in family loci. Not only HIV-infected children, but also all the family members should be examined for markers of herpes virus infection and pneumocystosis in order to detect sources of the infection and timely execution of the prophylaxis measures.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 4, P. 67—74

Key words: HIV-infection, opportunistic infections, herpes virus infections, pneumocystosis, markers of active and acute infection, infection reactivation

## ВВЕДЕНИЕ

По данным федерального научно-методического Центра по профилактике и борьбе со СПИД, заболеваемость ВИЧ-инфекцией во всех субъектах Российской Федерации ежегодно возрастает. Среди инфицированных 73% составляют лица в возрасте от 15 до 29 лет. Несмотря на разработанные меры профилактики, с каждым годом увеличивается число ВИЧ-положительных детей, рожденных от ВИЧ-инфицированных матерей. В России также, как и в остальном мире, вертикальный путь передачи вируса является преобладающим путем инфицирования детей. Однако из-за увеличения доли инъекционных наркоманов среди подростков, употребляющих наркотики, в последние годы заметно возросло число подростков, инфицированных ВИЧ парентеральным путем [Ермак Т.Н. и др., 2006; Ермак Т.Н. и др., 2011; Покровский В.В. и др., 2001; Рахманова А.Г. и др., 2003]. За последнее десятилетие заметно увеличилось количество летальных исходов из числа ВИЧ-инфицированных, как взрослых, так и детей. Гибель 90% из них прямо или косвенно обусловлены оппортунистическими инфекциями (ОИ), что подчеркивает важную роль их профилактики и лечения. Чаще всего инфекционные осложнения вызваны такими возбудителями ОИ, как *Pneumocystis jirovecii*, *Mycobacterium avium-intracellulare*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida spp.*, *Toxoplasma gondii* и др. Немаловажное значение в инфекционной патологии имеют заболевания, вызванные ДНК-содержащими вирусами, например, цитомегаловирусом, вирусом простого герпеса, вирусом гепатита В [Адельман Д., 1993]. Роль таких герпесвирусов, как вирус Эпштейна-Барр и вирус герпеса человека 6 типа, в этиологии инфекционных осложнений у детей с ВИЧ-инфекцией еще мало изучена [4].

Цель исследования: изучить роль герпесвирусов и пневмоцист в инфекционных осложнениях у детей, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Основным материалом для исследований стали образцы сывороток и клеток крови, полученные от детей, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями.

В исследование вошли 59 детей с ВИЧ-инфекцией в возрасте от 1 месяца до 15 лет. Дети проходили лечение в Детском боксированном отделении ИКБ № 2 в условиях мельцеровской системы боксирования. Уход за больным ребенком оказывал медицинский персонал или один родитель (опекун). Все дети были разделены на 2 группы. Первую группу составили младенцы от месяца до полутора лет с диагнозом: «неокончательный тест на ВИЧ». Это дети с положительным результатом исследования на антитела методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) — иммуноблотт и отрицательным результатом на ДНК ВИЧ, полученным в полимеразной цепной реакции (ПЦР). Вторая группа образована детьми, у которых лабораторно подтвержден диагноз «ВИЧ-инфекция» (стадия 3, 4А, 4Б, 4В), выставленный на основании обнаружения IgG в ИФА — иммуноблотт и ДНК ВИЧ в ПЦР. Все дети с диагнозом «ВИЧ-инфекция» постоянно получают антиретровирусную терапию (АРВТ). АРВТ назначается по клиническим, иммунологическим и вирусологическим показаниям [Idele P. et al., 2014]. При снижении показателей иммунного статуса, тромбоцитопении, при клинических проявлениях инфекционных заболеваний, а также для профилактики их развития помимо АРВТ назначают иммунозаместительную терапию, которую проводят такими препаратами как октагам, пентаглобин, ИГ-Вена. Для неспецифической медикаментозной профилактики пневмоцистоза используют бисептол (котримоксазол + триметоприм). В отношении вируса Варицелла Зостер проводится вакцинопрофилактика.

Группа ВИЧ-инфицированных, в свою очередь, была подразделена на две подгруппы: дети из закрытых организованных коллективов (дом ребенка, детский дом, интернат) и дети, проживающие в семье.

Все пациенты, вошедшие в исследование, имели клинические проявления различных инфекционных заболеваний, такие как лихорадка, лимфаденопатия, гепатоспленомегалия. У трети детей была заподозрена внебольничная пневмония, у 45% — герпесвирусные инфекции. Тем не менее, из-за полиморфизма клинических проявлений, а также большой вероятности микстинфекции постановка этиологического диагноза и выявление активной инфекции невозможны без применения комплекса методов лабораторной диагностики.

Поэтому все образцы сывороток крови и клеток крови пациентов исследовали на маркеры герпесвирусных инфекций (ГВИ) и пневмоцистоза. Методом ИФА определяли IgM и IgG к вирусу простого герпеса (ВПГ), вирусу Варицелла Зостер (ВВЗ), цитомегаловирусу (ЦМВ), вирусу Эпштейна-Барр (ВЭБ), вирусам герпеса человека 6 и 8 типов (ВГЧ-6 и ВГЧ-8) с использованием наборов реагентов производства «Вектор-Бест» (Новосибирск). IgM и IgG к пневмоцисте в исследуемых образцах сывороток крови выявляли с помощью набора реагентов «ПневмоцистоСтрип» производства ФНИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи (филиал Медгамал).

Методом непрямой реакции иммунофлюоресценции (НРИФ) исследова-

ли клетки крови на наличие указанных возбудителей и их антигенов. Для выявления ранних антигенов ЦМВ, ВГЧ-6 и репродукции вирусов ВПГ и ВЭБ применяли быстрый культуральный метод (БКМ).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью компьютерной программы, рассчитывающей достоверность различия долей признака в двух группах по критерию Стьюдента ( $t$ ) [1].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

О широте распространения герпесвирусов и пневмоцист среди детей, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями, можно судить по суммарному выявлению различных маркеров инфекций: IgM и IgG (ИФА), возбудителей и их антигенов (НРИФ), а также репродукции вирусов (БКМ). Необходимо отметить, что выявляемость маркеров этих инфекций была достаточно высокой во всех изучаемых группах. Наиболее часто определяли маркеры ВПГИ и ВЭБИ. У детей с неокончательным тестом на ВИЧ эти показатели составили 70% и 60% соответственно. У детей с ВИЧ-инфекцией из организованных коллективов они достигали 93% при ВПГИ и 86% при ВЭБИ, а у детей, проживающих в семье — 86% и 74% соответственно. В группах детей с ВИЧ, воспитывающихся и в социальных учреждениях, и в семье также установлена высокая инфицированность ЦМВ (86% и 80%). Однако у детей с неокончательным тестом на ВИЧ этот показатель был значительно ниже, маркеры ЦМВИ определили только у 30% обследованных. Следует отметить, что маркеры ГВИ у детей этой группы выявляли намного реже, чем у детей с ВИЧ-инфекцией, как организованных, так и домашних. Маркеры ветряной оспы имели всего лишь 10% детей с неокончательным тестом на ВИЧ, а ВГЧИ-6 — 20%. Также у 30% детей этой группы обнаружены антитела к пневмоцисте как изолированные класса М, так и сочетанные с IgG. Анализ результатов обследования детей с ВИЧ-инфекцией показал, что частота выявления суммарных маркеров ГВИ преобладала среди детей из закрытых организованных коллективов по сравнению с детьми, проживающими дома. Максимальные отличия были установлены в отношении ВГЧИ-6 (64% и 40% соответственно), когда маркеры инфекции в 1,6 раза чаще определяли у детей из социальных учреждений, чем у детей, проживающих в семье. Исключение составили ветряная оспа и пневмоцистоз, маркеры, которых в 3 и 2,5 раза реже выявляли у детей из закрытых коллективов по сравнению с домашними детьми. Данные отличия, возможно, связаны с тем, что медицинскими работниками в детских социальных учреждениях регулярно и более эффективно проводятся профилактические и противоэпидемические мероприятия в отношении этих инфекций, что предотвращает занос этих инфекций извне.

Активно протекающая инфекция, обусловленная первичным острым заболеванием или ее реактивацией и требующая немедленного назначения этиотропного лечения, чаще диагностировалась у ВИЧ-инфицированных детей, чем у детей с неокончательным тестом на ВИЧ. Показатели различались в 2,5 раза в отношении ВПГИ и ветряной оспы (25 и 25% и 10 и 10% соответственно), а в отношении ВГЧИ-6 и пневмоцистоза — в 1,8 раза (18 и 18% и 10 и 10% соответственно). Треть детей как одной, так и другой группы имели маркеры активной ВЭБИ (35 и 30% соответственно). Реже всего встречалась активная форма ЦМВИ, только 10% обследованных детей из каждой группы имели маркеры острой ЦМВИ или ее реактивации.

Для своевременного назначения адекватной этиотропной терапии и про-

ведения профилактических мероприятий огромное значение имеет установление стадии заболевания: первичной острой инфекции, стадии реактивации, реконвалесценции или латентно протекающей инфекции.

Следует отметить, что в наших исследованиях на острое течение заболевания указывает наличие следующих маркеров: изолированных IgM; сочетание IgM с IgG; сочетание IgM с выявлением возбудителя и его антигенов методом НРИФ и репродукции герпесвирусов в БКМ; сочетанное обнаружение IgM и IgG с возбудителем, его антигенами и репродукцией вируса.

Нередко первичное инфицирование герпесвирусами и пневмоцистами происходит уже в раннем детском возрасте, и у большинства детей, как правило, заболевание протекает бессимптомно. Ослабление иммунитета вызывает активизацию возбудителей ОИ, что приводит к смещению соотношения латентных и активных форм инфекции в сторону последних, нарастают клинические проявления заболеваний. При этом инфекция, вызванная вирусом гриппа, парагриппа, аденовирусом, может быть ко-фактором активации оппортунистической инфекции. В этот момент этиотропное лечение оказывается максимально эффективным. Поэтому помимо острой стадии к активной инфекции относят и реактивацию латентно протекающей инфекции. Знание этих особенностей ОИ помогает выбрать правильную и эффективную лечебную и противоэпидемическую тактику [3, 5].

При реактивации инфекции мы чаще всего в сыворотке крови пациентов определяли IgG в диагностической сероконверсии (это 4-кратное нарастание диагностического титра) в сочетании с наличием в клетках крови герпесвирусов и их антигенов, выявленных методами НРИФ и БКМ.

У детей с ВИЧ-инфекцией реконвалесценцию как завершение первичного острого заболевания или стадии реактивации персистирующей инфекции устанавливали на основании обнаружения одних только антител класса G в титре выше диагностического в 4 и более раз.

Следует отметить, что в исследуемой группе «неокончателный тест на ВИЧ» среди пациентов с активными формами преобладали дети с первичной острой инфекцией. Принимая во внимание возраст детей (от 1 месяца до 1,5 лет) с большой вероятностью можно утверждать о реализации вертикального пути инфицирования возбудителями ОИ этих детей. Всего лишь у одного ребенка из этой группы была установлена реактивация ВЭБИ и у другого — реконвалесценция пневмоцистоза. Выявление IgG в титрах, не превышающих диагностические значения, у большого числа обследованных детей с неокончательным тестом на ВИЧ (учитывая младенческий возраст) свидетельствует о наличии у них материнских антител к герпесвирусам и пневмоцисте, а не о латентных инфекциях. Так, 60% детей имели материнские антитела к ВПГ, 30% — к ВЭБ, 20% — к ЦМВ, по 10% приходится на детей с антителами к ВГЧ-6, ВГЧ-8 и пневмоцисте.

Обследование детей с лабораторно подтвержденной ВИЧ-инфекцией показало, что пациенты этой группы имели маркеры всех стадий заболеваний, включая и латентную инфекцию. Наиболее часто диагностировали острую форму ВЭБ-инфекции (20,4%) и острый пневмоцистоз (18,4%). У 18,4% ВИЧ-инфицированных детей имела место реактивация ВПГИ, у 14,3% — ветряной оспы, ВЭБ и ВГЧ-6 инфекций. Лабораторные исследования позволили у части пациентов установить стадию реконвалесценции. Наименьшее число реконвалесценто (2%) выявлено при ветряной оспе, наибольшее (26,5%) при инфекции, вызванной вирусом простого герпеса.

Очень часто клиницисты не обращают внимания на детей с латентными

формами инфекции, на которые указывает наличие антител класса G в диагностическом титре, но не превышающем диагностическую сероконверсию. Нельзя выпускать из виду такую форму латентной инфекции как носительство, когда в слюне, моче и других биологических материалах обнаружен сам возбудитель, его антигены или ДНК инфекционного агента. Также на латентную инфекцию указывают и IgG в титрах ниже диагностических, которые свидетельствуют об инфицировании без развития заболевания и лишь о встрече с возбудителем в прошлом. Вместе с тем, наблюдение за детьми с латентными инфекциями очень важно, так как, с одной стороны, дети-носители — это источники инфекции для окружающих, а с другой стороны — латентная инфекция при неблагоприятных условиях в любой момент может перейти в активную форму [2]. Нашими исследованиями показано, что в 65,3% случаев у ВИЧ-инфицированных детей была выявлена латентно протекающая ЦМВИ, в 36,7% — ВПГИ и ВЭБИ, в 24,5% — ветряная оспа, в 20,4% — пневмоцистоз. В 15,9% случаев латентная инфекция была обусловлена вирусом герпеса человека 6 типа, реже всего (в 4,1% случаев) имела место латентная инфекция, вызванная вирусом герпеса человека 8 типа.

Разделение ВИЧ-инфицированных детей по социальной принадлежности на две подгруппы (детей из закрытых организованных коллективов и детей, проживающих в семье) позволило установить преобладание активных форм ВЭБИ почти в 2 раза (40,0% и 21,4%), ЦМВИ — в 1,6 раза (11,4% и 7,1%) и пневмоцистоза в 3,2 раза (22,8% и 7,1%) у домашних детей по сравнению с детьми из социальных учреждений. Активные формы ветряной оспы у организованных детей не выявлены совсем, а у детей из семей их количество было весьма существенным — 34,3%. Иная тенденция: превышение в 1,8 раза активных форм инфекций у детей из закрытых коллективов над таковыми, выявленными у домашних детей, установлена в отношении ВПГИ (35,7% и 20,0%) и в 2 раза — в отношении ВГЧИ-6 (28,6% и 14,3%).

Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что у детей обеих групп вне зависимости от их социального статуса обнаружены маркеры всех стадий заболевания ГВИ и пневмоцистозом, за исключением ВГЧИ-8. Данную инфекцию не диагностировали совсем у детей из закрытых организованных коллективов, а у детей, проживающих в семье, в 5,7% случаев была обнаружена только латентная форма ВГЧИ-8. В наших исследованиях у ВИЧ-инфицированных детей как одной, так и другой группы также установлена следующая закономерность: у пациентов, у которых преобладала активная инфекция, обусловленная первичным острым заболеванием или реактивацией, значительно реже выявляли латентную инфекцию. Следует обратить внимание на то, что у детей, поступивших в Детское боксированное отделение ИКБ № 2 из семей, значительно чаще диагностировали первичную острую инфекцию, чем у детей из закрытых коллективов. Исключение составили две инфекции: ВПГИ и ВГЧИ-6, где случаев острого заболевания выявлено больше у детей, поступивших из социальных учреждений.

Сравнительный анализ данных по отдельным инфекциям у организованных и домашних детей показал, что статистически достоверных отличий при обнаружении маркеров острой ВПГ-инфекции не выявлено (7,1% и 5,7% соответственно): В то же время, у детей из закрытых коллективов в 2 раза чаще встречали реактивацию ВПГИ (28,6% и 14,3%) и в 1,5 раза чаще диагностировали стадию реконвалесценции (35,7% и 22,8%), а частота латентных форм

ВПГИ в этой группе была в 2 раза ниже, чем в группе детей, поступивших в стационар из семей (21,4% и 42,8%).

У детей, проживающих в семье, выявляли все стадии заболевания, вызванного вирусом Варицелла Зостер. При этом большая часть случаев активной инфекции (20,0%) была обусловлена ее реактивацией, 14,3% случаев приходилось на первичную инфекцию. Латентная инфекция составляла 25,7%, а стадия реконвалесценции была выявлена всего у 1 ребенка (2,8%). У детей из социальных учреждений маркеры ветряной оспы (антитела класса G при отсутствии других маркеров инфекции) определяли всего у 3 больных (21,4%), что свидетельствовало о латентной инфекции у них. Вероятнее всего, это можно объяснить отсутствием заноса этой инфекции извне в закрытые коллективы, в то время как дети, проживающие в семьях, имеют гораздо более широкий круг контактов вне дома и, как следствие, более высокую заболеваемость.

Также, у домашних детей значительно чаще выявляли острую ВЭБ-инфекцию — в 25,7% по сравнению с 7,1% случаев, имевшими место в группе организованных детей. У детей последней группы более чем в 5 раз чаще наблюдали стадию реконвалесценции ВЭБИ и в 1,6 раз чаще — латентную форму этой инфекции.

Стоит отметить, что маркеры ЦМВ-инфекции, характерные для первичной острой и латентной инфекции, а также стадии реконвалесценции, несколько реже диагностировали у ВИЧ-инфицированных детей из организованных коллективов. В обеих группах нами не было выявлено ни одного случая реактивации ЦМВИ, тогда как маркеры всех стадий заболевания ВГЧ-6 инфекцией чаще встречали у детей из организованных коллективов.

При пневмоцистозе выявлена противоположная тенденция: количество острых и латентных форм инфекции устанавливали значительно чаще у детей из семьи (22,8% и 25,7%). Количество случаев острого и латентно протекающего пневмоцистоза у детей из социальных учреждений не превышало 7,1%. По одному ребенку в каждой группе было выявлено с инфекцией в стадии реконвалесценции, а реактивацию пневмоцистоза у обследованных больных обеих групп мы не наблюдали совсем. Большое количество случаев как первичного острого, так и латентно протекающего пневмоцистоза свидетельствует о широкой распространенности возбудителя среди детей с ВИЧ-инфекцией, проживающих в семьях. Это обусловлено не только их более широким кругом контактов, но и формированием семейных очагов с более интенсивной циркуляцией пневмоцист в них. Этому способствует и то обстоятельство, что большинство обследованных семей являются социально неблагополучными. В то же время, усилия медицинских работников детских закрытых учреждений направлены на предупреждение заноса и распространения пневмоцист в закрытых организованных коллективах детей.

В данной работе определена ширина распространения маркеров герпесвирусных инфекций от 10% при ветряной оспе у детей с неокончательным тестом на ВИЧ до 93% при инфекции, вызванной вирусом простого герпеса у детей из закрытых организованных коллективов.

Показано, что активные инфекции у детей с ВИЧ-инфекцией, подтвержденной лабораторно, в 2,5 раза чаще диагностировали при ВПГИ и ветряной оспе и в 1,8 раза чаще выявляли при ВГЧИ-6 и пневмоцистозе, чем у детей с неокончательным тестом на ВИЧ. При этом у детей с подтвержденной ВИЧ-инфекцией обнаружены маркеры различных стадий заболевания: первичного

острого, реактивации, реконвалесценции, латентной формы инфекции. А среди младенцев с неокончательным тестом на ВИЧ преобладали дети с материнскими антителами к герпесвирусам и пневмоцисте.

Вопреки ожиданиям маркеры активных инфекций, за исключением ВПГИ и ВГЧИ-6, чаще выявляли у ВИЧ-инфицированных детей, проживающих в семьях, чем у детей из закрытых организованных коллективов. Возможно, это связано с тем, что наблюдение за детьми из социальных учреждений осуществляют медицинские работники, которые имеют знания и опыт по профилактике оппортунистических инфекций. В отношении домашних детей противоэпидемический режим должным образом не соблюдается, так как родители и опекуны не обладают в полной мере подобными навыками. Другим фактором, способствующим интенсификации эпидемического процесса, является асоциальный образ жизни взрослых большинства обследованных семей. Выявленная особенность диктует необходимость разработки и распространения в семьях, где находятся ВИЧ-инфицированные дети, памяток, содержащих информацию и рекомендации по противоэпидемическому режиму и профилактике ОИ. В сложившейся ситуации целесообразно проводить плановые обследования на маркеры ГВИ и пневмоцистоза не только ВИЧ-инфицированных детей, но и всех членов семьи с целью выявления источников инфекции и своевременного проведения лечебных и профилактических мероприятий.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Кремер Н.Ш. Теория вероятностей и математическая статистика. Проверка гипотез о равенстве долей признака в двух и более совокупностях. 2004.
2. Рыбалкина Т.Н., Каражас Н.В., Калугина М.Ю. и др. Лабораторная диагностика оппортунистических инфекций при длительных субфебрилитетах и обструктивных бронхитах у детей при микст-инфекциях. *Детские инфекции*. 2013, 12 (3): 40-43.
3. Рыбалкина Т.Н., Каражас Н.В., Калугина М.Ю. и др. Роль возбудителей оппортунистических инфекций в этиологии обструктивного бронхита и длительного субфебрилитета у детей. *Журн. микробиол.* 2012, 4: 121-125.
4. Савинков П.А., Рыбалкина Т.Н., Каражас Н.В., Корниенко М.Н., Калугина М.Ю., Русакова Е.В., Солдатова И.А., Пчелкина Д.С., Крупенио Т.В., Цирульников И.Е., Силина О.В. Роль герпесвирусов и пневмоцист в этиологии инфекционных заболеваний у детей с иммуносупрессией различной природы. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2015, 17 (4): 254-261.
5. Тимченко В.Н., Архипова Ю.А., Джангавадзе Н.Д. Клинико-эпидемиологические особенности ВИЧ-инфекции у детей первого года жизни. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессия*. 2012, 4: 80-87.

*Поступила 22.02.17*

Контактная информация: Рыбалкина Татьяна Николаевна, к.м.н.,  
123098, Москва, ул. Гамалеи, 18, р.т. (499)193-43-91

---

## ПРОБЛЕМНАЯ СТАТЬЯ

---

© О.П.ЧЕРНЯВСКАЯ, Н.И.БРИКО, 2017

*О.П.Чернявская, Н.И.Брико*

### **ПРОБЛЕМЫ ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНОГО ЭТАПА ПРОГРАММЫ ЛИКВИДАЦИИ ПОЛИОМИЕЛИТА**

Первый московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова

Никогда еще мировое сообщество не было так близко к цели — ликвидации полиомиелита. В 2016 году в мире зарегистрировано всего 37 случаев заболевания в трех эндемичных странах: Пакистане, Афганистане и Нигерии. Несмотря на большие успехи на заключительном этапе ликвидации полиомиелита возник ряд проблем: появление и циркуляция вакцинородственных полиовирусов и связанных с ними заболеваний, вакциноассоциированный паралитический полиомиелит, социальные и политические проблемы, влияющие на качество проведения вакцинации.

Журн. микробиол., 2017, № 4, С. 75—81

**Ключевые слова:** полиомиелит, вакциноассоциированный паралитический полиомиелит (ВАПП), вакцинородственный полиовирус (ВРПВ), инактивированная полиомиелитная вакцина (ИПВ), оральная полиомиелитная вакцина (ОПВ)

*O.P.Chernyavskaya, N.I.Briko*

### **PROBLEMS OF FINAL PHASE POLIOMYELITIS ERADICATION PROGRAMME**

Sechenov First Moscow State Medical University, Russia

Never before has the world community were not so close to the goal — poliomyelitis eradication. In 2016, the world recorded only 37 cases in the three endemic countries: Pakistan, Afghanistan and Nigeria. Despite the great progress in the final stages of poliomyelitis eradication have problems: the emergence and circulation of vaccine-derived poliovirus and related diseases, vaccine-associated paralytic poliomyelitis, social and political factors affecting of vaccination.

Zh. Mikrobiol. (Moskow), 2017, No. 4, P. 75—81

**Key words:** poliomyelitis, vaccine-associated paralytic poliomyelitis (VAPP), vaccine-derived poliovirus (VDPV), inactivated poliovirus vaccine (IPV), oral poliovirus vaccine (OPV)

В 1988 году на 41 сессии Всемирной ассамблеи здравоохранения была принята резолюция о ликвидации полиомиелита в мире. Это положило начало Глобальной инициативе по ликвидации полиомиелита (ГИЛП). Основные стратегии ликвидации полиомиелита, рекомендованные Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ): достижение и поддержание высокого уровня охвата профилактическими прививками, проведение дополнительной, «подчищающей», иммунизации и национальных дней иммунизации (НДИ), организация и проведение эффективной системы эпидемиологического надзора за острыми вялыми параличами (ОВП) у детей до 15 лет.

Успех почти тридцатилетней работы по глобальной ликвидации полиомиелита очевиден. Первым в 1994 г. стал свободным от полиомиелита Американский регион ВОЗ. За ним последовали: в 2000 г. — Западно-Тихоокеанский, в 2002 г. — Европейский, в 2014 г. — регион стран Юго-Восточной Азии. Сегодня 80% мирового населения проживает на территориях, свободных от полиомиелита, дикий вирус полиомиелита продолжает циркулировать только в Африканском и Восточно-Средиземноморском регионах.

С 1988 г. число случаев заболевания полиомиелитом уменьшилось с 350 тысяч случаев до 37, зарегистрированных в 2016 году. В мире остаются три страны, эндемичные по полиомиелиту — это Пакистан, Афганистан и Нигерия, в то время как в 1988 году число таких стран превышало 125. Последние годы выделяется только один дикий серотип (полиовирус типа 1); в 2015 г. было официально объявлено о ликвидации дикого полиовируса типа 2, и с ноября 2012 г. в мире не было обнаружено ни одного случая паралитического полиомиелита, вызванного диким полиовирусом типа 3. Эксперты считают, что мировое сообщество как никогда близко к цели — глобальной ликвидации полиомиелита. Но достигнутый прогресс очень хрупок. Это показала ситуация на северо-востоке Нигерии в августе 2016 г., когда были зарегистрированы три новых подтвержденных случая паралитического полиомиелита, вызванного диким полиовирусом типа 1. В результате Нигерия вновь вернулась в число стран, эндемичных по дикому полиомиелиту [1].

Идея ликвидации инфекционных болезней человека родилась еще в конце XIX века в 1875 году у Ф.Ф.Эрисмана, который писал: «История дает нам надежду, что благодаря всеобщему распространению образования, улучшению социальных условий и развитию науки удастся все более и более оттеснить на задний план и наши господствующие эпидемические болезни, а может быть, и вовсе освободить от них род человеческий». С тех пор прошло более 140 лет и можно с уверенностью утверждать, что идеи и предсказания Ф.Ф.Эрисмана сбываются. Однако на сегодняшний день человечеству удалось ликвидировать лишь одну инфекцию — натуральную оспу. Почему же последующие программы ликвидации инфекций в глобальном масштабе до сих пор заканчивались неудачами? Возможна ли ликвидация полиомиелита?

Для полиомиелита имеются все предпосылки к ликвидации — заболевание носит антропонозный характер, биологическое разнообразие вируса ограничено всего тремя типами вируса полиомиелита, существует удобная в применении и дешевая живая оральная полиомиелитная вакцина (ОПВ) [5]. Массовое применение ОПВ позволило снизить заболеваемость полиомиелитом в мире и поставить цель ликвидации инфекции в глобальном масштабе. Именно ОПВ стала «вакциной выбора» в программе ликвидации полиомиелита благодаря низкой стоимости, легкости введения, способности вырабатывать кишечный иммунитет и тем самым прерывать передачу вируса на уровне популяции в дополнение к индивидуальной защите. Но на заключительном этапе ликвидации полиомиелита ОПВ стала препятствием на пути ликвидации инфекции.

Программа ликвидации полиомиелита в России была утверждена приказом Министерства здравоохранения и Государственного комитета санитарно-эпидемиологического надзора Российской Федерации от 10 сентября 1996 г. № 336/142. Цель Программы — ликвидация полиомиелита в стране. Цель

ликвидация заболеваемости полиомиелитом, вызванным диким вирусом, в России была достигнута, и наша страна с 2002 года в составе Европейского региона является страной, свободной от дикого вируса полиомиелита. Последний случай заболевания полиомиелитом, вызванным местным диким вирусом, был зарегистрирован в нашей стране в 1995 году в Чеченской Республике [3]. В 2010 году на территории европейского региона была зарегистрирована одна из крупнейших вспышек полиомиелита в Таджикистане. Учитывая поток трудовых мигрантов из этой страны, риск завоза инфекции в Российскую Федерацию был велик. И это подтвердилось: в 2010 году в России было зарегистрировано 14 случаев полиомиелита, вызванного диким завозным вирусом. При этом помимо трудовых мигрантов, заболели и российские дети, которые не были привиты против полиомиелита [4].

Несмотря на огромные успехи Программы ликвидации полиомиелита решить задачу ликвидации в глобальном масштабе никак не удастся. Какие же существуют проблемы? Одна из проблем — вакциноассоциированный паралитический полиомиелит (ВАПП). Это очень редкое заболевание, возникающее у реципиентов живой оральной полиомиелитной вакцины или у неиммунных лиц, контактирующих с недавно привитыми этой вакциной. Несмотря на то, что частота встречаемости таких больных составляет, по некоторым оценкам, от 1 на 750 тыс. до 1 на 2,5 млн привитых, каждый такой случай бросает тень на Программу иммунизации [15]. Именно эта проблема заставила российское здравоохранение перейти на комбинированную схему вакцинации — первые две прививки инактивированной полиомиелитной вакциной (ИПВ) и далее ОПВ. Две первые дозы ИПВ полностью исключают возникновение ВАПП у реципиентов вакцины. После введения в 2008 г. ИПВ в Национальный календарь профилактических прививок количество случаев ВАПП значительно снизилось и составило 1 случай на 4,9 млн доз вакцины, или 1,4 случая на 1 млн новорожденных по сравнению с периодом исключительного применения ОПВ — 1 случай на 1,9 млн доз, или 4,9 случая на 1 млн новорожденных [2]. Однако проблема возникновения случаев ВАПП у контактных остается. С целью профилактики ВАПП в условиях применения ОПВ необходимо обеспечить разобщение непривитых детей и недавно привитых. Группами и объектами риска остаются дети домов ребенка и детские дома, где между детьми всегда тесные контакты и, несмотря на то, что в этих учреждениях применяется только ИПВ, риск заноса вируса полиомиелита остается.

За период 2010 — 2016 гг. в России было зарегистрировано 17 случаев ВАПП (14 случаев — у контактных и 3 — у реципиентов вакцины). За этот же период в Европейском регионе ВОЗ зарегистрировано 33 случая таких заболеваний (17 из которых российские — 51,5%).

Еще одной проблемой заключительного этапа являются вакцинородственные полиовирусы (ВРПВ) и связанные с ними заболевания. Известно, что живая оральная полиомиелитная вакцина сделана на основе живого ослабленного полиовируса (штамма Сэбина). Но этот полиовирус может распространяться среди популяции с низким охватом вакцинацией и вызывать заболевания у неиммунных лиц. То, что аттенуированные штаммы предрасположены к мутациям и возврату нейровирулентности, было известно давно [11, 12]. Вирусы-ревертанты с повышенной вирулентностью выделялись как от больных ВАПП, так и от здоровых. На этапе внедрения живой вакцины считалось, что такие штаммы не способны к циркуляции и поэтому не пред-

ставляют значительной угрозы. Но оказалось, что это не так. Вспышка на Гаити, вызванная вирусом, производным от штамма Сэбина 1 типа, и последовавшие за ней другие аналогичные вспышки, вызванные производными от всех трех штаммов вируса, наглядно показали, что ликвидация полиомиелита возможна только тогда, когда будет выведена из обращения живая ОПВ [9]. В 2015 году в мире было зарегистрировано 24 случая заболеваний полиомиелитом, связанных с ВРПВ (из них 22 — в неэндемичных по полиомиелиту странах), заболевания регистрировались в Пакистане (2), Гвинее (2), Мадагаскаре (10), Мьянме (2), Нигерии (1), Украине (2), Лаосской народной республике (5). В 2016 году официально сообщено о пяти случаях полиомиелита, связанных с циркулирующими ВРПВ — в Лаосской народной республике (3), Пакистане (1) и Нигерии (1) [[http://polioeradication.org/wp-content/uploads/2017/02/WPV\\_2011-2016\\_07FEB17.pdf](http://polioeradication.org/wp-content/uploads/2017/02/WPV_2011-2016_07FEB17.pdf)]. Причем в Нигерии и Пакистане циркулировал ВРПВ 2 типа, что с момента перехода на бивалентную ОПВ является чрезвычайным событием. В Нигерии циркулирующий полиовирус типа 2 вакцинного происхождения был дважды обнаружен в штате Борно — в пробе из окружающей среды (в марте 2016 г.) и в образцах кала (в августе 2016 г.) [1]. Заболевания полиомиелитом детей в Украине в 2015 году связаны с очень низким уровнем охвата вакцинацией и появлением циркулирующих ВРПВ. В 2009 году показатель вакцинации против полиомиелита в этой стране составлял около 80 %, в 2014 году — только 49%, а в первые шесть месяцев 2015 года — всего 14% [Большот Ю.К. и др., 2015]. В то же время, общеизвестно, что необходимый охват вакцинацией детей должен составлять не менее 95%. Все эти примеры говорят о том, что огромное количество детей и взрослых могут быть носителями вируса: инфицированный человек может не болеть, но являться источником инфекции. Ведь особенность полиомиелита в том, что на один случай паралитического полиомиелита регистрируется от 100 до 1000 бессимптомных форм инфицирования.

Учитывая, что компонент ОПВ, содержащий 2 тип полиовируса, является причиной 30% случаев ВАПП, в 90% случаев является причиной циркулирующих ВРПВ и мешает формированию иммунного ответа на полиовирусы 1 и 3 типов, а также в связи с тем, что 2 тип дикого полиовируса не выделяется с 1999 года, ВОЗ предложила изъять из трехвалентной ОПВ компонент, содержащий 2 тип полиовируса. Трехвалентная ОПВ (т-ОПВ) была выведена из обращения во всем мире. Все страны, применявшие эту вакцину, осуществили переход в течение 2 недель (с 17 апреля по 1 мая 2016 года) на бивалентную ОПВ (б-ОПВ). Глобальная синхронизация перехода должна была сократить риск нового появления ВРПВ 2 типа и вспышек заболеваний, связанных с применением т-ОПВ. Еще одним требованием ВОЗ было, что все страны должны ввести в свои календари как минимум 1 дозу ИПВ; на ноябрь 2016 г. таких стран насчитывалось 173 [9].

Глобальная инициатива по искоренению полиомиелита активно отслеживает распространение полиовируса типа 2 вакцинного происхождения из любого источника. Ожидалось, что такие штаммы будут выявляться в первые 6 — 12 месяцев после перехода от т-ОПВ на б-ОПВ от детей, ранее получавших трехвалентную вакцину. Каждый случай выявления вируса типа 2 из любого источника расценивается ВОЗ как чрезвычайная ситуация, требует оценки риска и принятия ответных мер, в том числе, получения доступа к глобальному запасу моновалентной ОПВ 2 типа (м-ОПВ 2 типа) [1, 9].

Риск появления и циркуляции ВРПВ высок в странах, применяющих живую ОПВ и имеющих «прорехи» в плановой вакцинации. Большинство индустриально развитых стран, в которых циркуляция дикого полиовируса давно прервана, перешли на вакцинацию только ИПВ в целях профилактики ВАПП и циркулирующих ВРПВ. Некоторые страны перешли сразу на ИПВ, другие перешли сначала на комбинированную схему — ОПВ + ИПВ. Например, в США перешли на последовательную схему 2 дозы ИПВ, а затем 2 ОПВ в 1997 году, с последующим переходом на 4 ИПВ в 2000 году [7, 16]. Российская Федерация относится к числу 10 стран Европы, которые используют ОПВ в первичном вакцинальном комплексе (наряду с Украиной, Таджикистаном, Узбекистаном, Киргизией и Туркменистаном). При существующей в нашей стране схеме иммунизации (2 дозы ИПВ + 4 ОПВ) российские дети, получают лишь 2 дозы трехвалентной ИПВ. Существует опасность, что эти дети не сформируют поствакцинальный иммунитет ко 2 типу полиовируса, и в случае возобновления циркуляции дикого или вакцинородственного вируса полиомиелита 2 типа существует риск заболевания этих детей полиомиелитом, вызываемым этими вирусами.

В стратегическом плане завершающего этапа ликвидации полиомиелита 2013 — 2018 гг. подробно описаны сроки и направления этого этапа. Цели плана: завершение ликвидации дикого полиовируса; поэтапный глобальный переход от ОПВ к ИПВ, а также укрепление систем плановой иммунизации; безопасное хранение полиовирусов в лабораториях и на предприятиях (контейнмент); использование ресурсов и уроков инициативы ликвидации полиомиелита для других задач здравоохранения. Планом предусматривается, что после искоренения дикого полиовируса иммунизация будет осуществляться только ИПВ [6]. Достоинства ИПВ в том, что она не вызывает ВАПП, циркуляцию ВРПВ и вызывает стойкий нейропротективный гуморальный иммунитет. Однако ИПВ является более дорогостоящей, обеспечивает меньший кишечный иммунитет и технически ее труднее вводить, особенно труднодоступным группам населения. Кроме того, применение только ИПВ не будет достаточно для прекращения циркуляции полиовирусов (в случае их завоза или возобновления циркуляции). Но все же России необходимо уже сегодня готовиться к отказу от ОПВ, для этого нужно увеличить количество доз ИПВ в Национальном календаре профилактических прививок Российской Федерации (замена 3 ОПВ на ИПВ) с последующим полным переходом на ИПВ. Также нужно решить вопрос с количеством и сроками проведения ревакцинаций против полиомиелита, учитывая опыт других стран.

Еще одним препятствием на пути ликвидации полиомиелита является возможность длительного выделения вирусов полиомиелита лицами с иммунодефицитами [8, 13, 14]. Обычно это люди с В-клеточным иммунодефицитом, которые не способны вырабатывать антитела. Они являются источником полиовируса и могут стать причиной вспышек полиомиелита, если уровень иммунитета в популяции окажется ниже необходимого. В Англии вот уже 29 лет пациент с иммунодефицитом выделяет ВРПВ, и остановить выделение этого вируса никак не удается [10].

Социальные факторы также активно влияют на эволюцию эпидемического процесса полиомиелита. Военные конфликты, миграционные процессы, социальные потрясения встают на пути ликвидации инфекции. Оставшиеся

три эндемичные страны — Нигерия, Пакистан и Афганистан характеризуются высокой плотностью населения, высоким уровнем рождаемости, низкими охватами иммунизацией и низким уровнем санитарных условий жизни населения, а также непрекращающимися военными конфликтами. Во всех этих странах очень молодое население. Так, в Нигерии доля населения до 15 лет составляет 44% при общей численности более 182 млн человек; в Пакистане — 34% (более 188 млн человек); в Афганистане — 47% (более 32 млн человек). Если предположить, что в течение одного года в этих странах по каким либо причинам не будет проводиться вакцинация детей до года, то за этот год все усилия по контролю над инфекцией могут свестись к нулю. Усугубляет ситуацию гуманитарный кризис в этих государствах, особенно в Нигерии, где проблема голода населения стоит выше проблем ликвидации полиомиелита. Эксперты ВОЗ считают, если не удастся достигнуть цели — ликвидации полиомиелита, возникнет существенный риск и серьезные последствия. Будучи болезнью, способной вызывать эпидемии, полиомиелит вновь распространится за пределы территории, на которой он встречается в настоящее время, и через 10 лет в мире снова будут регистрироваться более 200 000 новых случаев этого заболевания [1].

В то время, как развивающиеся страны борются за то, чтобы получить вакцины для детей, в развитых странах возникают другие проблемы: население успокоилось в связи с низким уровнем заболеваемости, и родители необоснованно отказываются от проведения прививок детям. На фоне большого количества отказов от вакцинации, увеличения количества мигрирующего населения из стран, неблагополучных по полиомиелиту, увеличивается риск заболевания детей при контакте с больными или с бессимптомными вирусосносителями из числа мигрантов.

Успех Программы ликвидации полиомиелита не вызывает сомнений. По оценкам ВОЗ, глобальные мероприятия по искоренению полиомиелита уже позволили сэкономить более 27 млрд долл. США, а глобальная ликвидация полиовируса приведет к дополнительной экономии 20 — 25 млрд долл. США [1]. Но задача ликвидации полиомиелита оказалась сложнее, чем это представлялось на начальном этапе. Возникли трудности, связанные с особенностью вируса полиомиелита. Оральная полиомиелитная вакцина, являющаяся вакциной выбора на первых этапах Программы, на завершающем этапе явилась тормозом. Решение этих проблем потребовало изменения подхода к иммунопрофилактике полиомиелита, в частности полный глобальный переход на ИПВ.

До тех пор, пока остаются эндемичные по полиомиелиту страны, риск завоза полиомиелита на территорию нашей страны сохраняется. Поэтому поддержание эффективной системы эпиднадзора за острыми вялыми параличами и за циркуляцией вирусов в окружающей среде остается актуальным. Также российскому здравоохранению необходимо готовиться к отказу от ОПВ и пересмотру Национального календаря профилактических прививок в отношении вакцинации против полиомиелита.

Так достижима ли цель ликвидации полиомиелита? Этот вопрос остается открытым. Теоретические предпосылки ликвидации полиомиелита существуют, но практический опыт осуществления Программы, несмотря на успехи, до сих пор не привел к достижению цели. Но будем оставаться оптимистами и надеяться, что цель все же будет достигнута и будущие поколения никогда не столкнутся с этой тяжелой инфекцией.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Доклад секретариата «Полиомиелит». Исполнительный комитет ВОЗ 140 сессия п.7.3. [http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/EB140/B140\\_13-ru.pdf](http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/EB140/B140_13-ru.pdf).
2. Иванова О.Е., Еремеева Т.П., Морозова Н.С. и др. Вакциноассоциированный паралитический полиомиелит в Российской Федерации в период изменения схемы вакцинации (2006-2013 гг.). Вопросы вирусологии. 2016, 61 (1): 9-15.
3. Иванова О.Е., Сейбиль В.Б., Липская Г.Ю. и др. Вирусологическое и серологическое исследование вспышек полиомиелита в Чеченской Республике в 1995 г. Журн. микробиол. 1996, 3: 11-13.
4. Онищенко Г.Г., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А. и др. Полиомиелит в Таджикистане. Защита территории России от заноса и распространения дикого вируса полиомиелита. Журн. микробиол. 2011, 2: 12-22.
5. Онищенко, Г.Г., Дроздов С.Г. и др. Проблемы ликвидации полиомиелита. Санкт-Петербург, 2008.
6. Стратегический план ликвидации полиомиелита и осуществления завершающего этапа в 2013-2018 гг. <http://polioeradication.org>.
7. Alexander L.N., Seward J.F., Santibanez T.A. et al. Vaccine policy changes and epidemiology of poliomyelitis in the United States. JAMA. 2004, 292: 1696-1701.
8. Centers for Disease Control and Prevention. Prolonged poliovirus excretion in an immunodeficient person with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. MMWR. 1997, 46: 641-643.
9. Garon J., Patel M. The polio endgame: rationale behind the change in immunization. ADC Online First, published on January 17, 2017 as 10.1136/archdischild-2016-311171. <http://adc.bmj.com/Downloaded from on January 18, 2017>.
10. Glynis Dunn, Dimitra Klapsa, Thomas Wilton et al. Twenty-Eight years of poliovirus replication in an immunodeficient individual: Impact on the global polio eradication Initiative, Published: August 27, 2015, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1005114/>.
11. Henderson D.A., Witte J.J. Morris L.A., Langmuir D. Paralytic disease associated with oral polio vaccines. J. American Medical Association. 1964. 190: 41-48.
12. Kew O.M., Morris Glasgow V., Landaverde M. et al. Outbreak of poliomyelitis in Hispaniola associated with circulating type 1 vaccine-derived poliovirus. Science. 2002, 296: 356-359.
13. Kew O.M., Sutter R.W., Nottay B. et al. Prolonged replication of a type 1 vaccine-derived poliovirus in an immunodeficient patient. J. Clinical Microbiology. 1998, 36: 2893-2899.
14. Minor P. Characteristics of poliovirus strains from longterm excretors with primary immunodeficiencies. Developments in Biologicals. 2001, 105: 75-80.
15. Nkowane B.M., Wassilak S.G.F., Orenstein W.A. Vaccine-associated paralytic poliomyelitis. United States 1973 through 1984. J. Amer. Med. Assoc. 1987, 257: 1335-1340.
16. Poliomyelitis prevention in the United States: introduction of a sequential vaccination schedule of inactivated poliovirus vaccine followed by oral poliovirus vaccine. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR Recomm. Rep, 1997, 46 (RR-3): 1-25.

*Поступила 10.02.17*

Контактная информация: Чернявская Ольга Павловна, к.м.н.,  
119991, Москва, ул. Трубцкая, 8, стр. 2, р.т. (499) 248-69-28

---

© Н.Н.ОВЕЧКО, Н.Е.ЯСТРЕБОВА, 2017

*Н.Н.Овечко, Н.Е.Ястребова*

### **АНТИГЕНЫ ПОВЕРХНОСТНЫХ СТРУКТУР НАЕМОФИЛУС ИНФЛУЕНЗАЕ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ КАНДИДАТ-ВАКЦИНЫ**

НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, Москва

Несмотря на то, что вакцина против *Haemophilus influenzae* b (Hib) давно и успешно применяется, получение вакцины против нетипируемых штаммов *Haemophilus influenzae* (NTHi) находится только в стадии разработки. Сложности этой работы обусловлены отличительными чертами NTHi по сравнению с Hib: отсутствие полисахаридной капсулы, высокий уровень антигенной гетерогенности и особенности развития патогенеза, который включает распространение по организму со слизистых оболочек дыхательных путей. В настоящее время с целью создания вакцины активно проводятся исследования 15 поверхностных структур NTHi. Среди них белки PE, P2, P6, PD, пузырьки поверхности мембраны (OMVs) и другие. Практическое применение в настоящее время получил лишь белок PD, который был использован в качестве носителя с антигенной функцией в конъюгированных полисахаридных вакцинах против пневмонии (Prevenar; PHiD-CV). Вакцинация этими препаратами позволила снизить общую заболеваемость острым отитом у детей на 33 — 52%. Однако этот результат не может рассматриваться как окончательный, поэтому исследования и апробирование кандидат-вакцин продолжаются.

Журн. микробиол., 2017, № 4, С. 82—90

Ключевые слова: нетипируемые штаммы *Haemophilus influenzae*, поверхностные структуры, гетерогенные штаммы, кандидат-вакцины

*N.N.Ovechko, N.E.Yastrebova*

### **ANTIGENS OF SURFACE STRUCTURES OF *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* AS PERSPECTIVE VACCINE-CANDIDATES**

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Despite long and successful use of *Haemophilus influenzae* b (Hib) vaccine, production of the vaccine against non-typed strains of *Haemophilus influenzae* (NTHi) is only being developed. Difficulties of this work are determined by features of NTHi compared with Hib: lack of polysaccharide capsule, high level of antigenic heterogeneity and specialties of pathogenesis development that includes spread through the organism from mucosa of the respiratory tract. Currently, 15 surface structures of NTHi are being actively studied with the aim of creating the vaccine. PE, P2, P6, PD proteins, outer membrane vesicles (OMVs) and others are among them. Only PD protein currently has practical application, that was used as a carrier with antigenic function in conjugated polysaccharide vaccines against pneumonia (Prevenar; PHiD-CV). Vaccination with these preparations allowed to reduce the total morbidity with acute rhinitis on children by 33 — 52%. However, this result can not be examined as final, thus, research and approbation of the vaccine-candidates continues.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 4, P. 82—90

Key words: non-typed strains of *Haemophilus influenzae*, surface structures, heterogenic strains, vaccine candidates

Нетипируемые штаммы *Haemophilus influenzae* (NTHi) — это грам-отрицательные коккобактерии, входящие в состав синантропной флоры верхних дыхательных путей человека, которые способны вызывать широкий спектр инвазивных и локальных заболеваний как у детей, так и у взрослых.

Одним из препятствий на пути создания вакцины против бактерий NTHi является высокий уровень гетерогенности штаммов и отсутствие полисахаридной оболочки у микроорганизмов этой группы. В обзоре приведены данные о развитии исследований в области создания эффективной вакцины и, в частности, о проблеме поиска наиболее эффективной антигенной структуры с высокой степенью консервативности.

С момента введения капсульной полисахаридной конъюгированной вакцины против *Haemophilus influenzae* b (Hib) в конце 1980-х годов во многих развитых странах произошло резкое снижение количества заболеваний, вызванных этим микроорганизмом [24]. Однако эта вакцина не оказала никакого влияния на инфекции, вызванные NTHi, и в настоящее время инвазивные заболевания, вызванные NTHi, продолжают постоянно регистрироваться, а их относительная доля увеличивается. В связи с таким изменением эпидемиологической картины и повышением уровня смертности от заболеваний, вызванных NTHi, появился высокий спрос на эффективные вакцины, защищающие от этой инфекции. Задачей более высокого уровня может стать поиск одного или нескольких антигенов, иммунизация которыми приводила бы к стойкому иммунитету как против инфекции, вызванной Hib, так и гетерогенными штаммами NTHi, отличающимися высоким уровнем сероконверсии в зависимости от региона распространения.

Разработка вакцины против NTHi требует решения новых задач, которые не возникали при создании вакцины от заболеваний, вызванных Hib, так как эти две группы микроорганизмов наделены существенными для разработки вакцины отличиями: 1. Штаммы NTHi не имеют полисахаридной капсулы, что приводит к необходимости поиска новых протективных антигенов; 2. NTHi-штаммы проявляют высокий уровень гетерогенности, которая выражается в большом разнообразии структуры поверхностных антигенов [13,29] и, следовательно, приводит к необходимости поиска высоко консервативных компонентов, обладающих антигенными свойствами; 3. Штаммы типа Hib распространяются в организме гематогенным путем, в то время как патогенез инфекций, вызванных штаммами NTHi, включает распространение бактерий в организме при попадании на слизистую оболочку дыхательных путей.

Следовательно, новая вакцина должна эффективно индуцировать, кроме IgG, IgA.

Идеальный антиген для создания вакцины должен быть консервативным среди всего многообразия штаммов, характеризоваться поверхностным расположением и обилием эпитопов на мембране бактериальной клетки, а также индуцировать защитный иммунный ответ на высоком уровне.

В настоящее время перспективными кандидат-вакцинами могут считаться антигены, указанные в табл. [26].

Наиболее ранние исследования были сфокусированы на поиске поверхностных антигенов, содержащих полисахаридный компонент, так как способность этих молекул бактериальной мембраны вызывать специфический иммунитет многократно подтверждена эффективностью современных поли-

## Антигены NTHi, с которыми проводятся исследования в настоящее время

Антиген	Молекулярная масса (кДа)	Функция
Белок адгезин (Hap)	~155	Адгезин
Высокомолекулярные белки адгезии (HMW1, HMW2)	120—125	Адгезины
Большой адгезин (Hia)	~115	Адгезин
Белок D5	~80	Нуклеотидилтрансфераза
Белок (HtrA)	~46	Белок теплового шока
Белок P2	36—42	Порин
Белок (липопротеин) D	~42	Глицерофосфодиэстераза
Белок P5 (fimbrin)	27—35	Адгезин, белок внешней мембраны
Белок P4	~30	Кислая фосфатаза
Белок F	~30	Адгезин с АТФ-связывающей функцией
Белок внешней мембраны (OMP) 26	~26	Белок транслокации
Белок P6	~16	Пептидогликана-связанный липопротеин
Белок E	~16	Адгезин
Пили (тип IV)	~14	Адгезин
Детоксицированный липоолигосахарид	3—5	Эндотоксин

сахаридных вакцин (например, вакцина для профилактики пневмококковой инфекции и другие).

В экспериментах по изучению иммуногенности липоолигосахарида (ЛОС) конъюгированного со столбнячным анатоксином, удалось показать, что вакцинация шиншилл такими препаратами достоверно в более чем на 40% защищает животных от острого среднего отита (ОСО) при экспериментальном заражении. Иммуитет у животных формировался за счет индукции антител класса G, M и A как в сыворотке крови, так и в физиологической жидкости среднего уха [38]. Дальнейшая работа с конъюгатом ЛОС — столбнячный анатоксин включала изучение иммуногенности и безопасности препарата для здоровых взрослых людей. Результаты исследований показали, что в крови у всех волонтеров появились антитела класса G к ЛОС. У 52,5% испытуемых наблюдался более чем четырехкратный рост титра антител после двух инъекций. Через 38 недель среднегеометрический показатель уровня IgG анти-ЛОС был по-прежнему выше, чем до первой инъекции. Аналогичная картина реактивности наблюдалась для IgA и IgM анти-ЛОС [16].

С целью дальнейшего усовершенствования препарата на основе ЛОС в качестве белка-носителя был использован наружный мембранный белок NTHi P6, что предполагало усиление потенциала иммуногенности конъюгата. Исследования выполнялись на лабораторных животных, и полученные данные позволили сделать вывод о том, что конъюгаты ЛОС-P6 вызывают специфические иммунные реакции, а белок P6 может служить эффективным носителем для ЛОС или других молекул углеводов [39].

Однако дальнейшего продолжения работы по изучению ЛОС как перспективного препарата для вакцинации не получили, а подавляющее большинство исследований в настоящее время направлено на обнаружение консервативной белковой структуры NTHi.

Решающим фактором патогенеза *H. influenzae* предполагается механизм первоначальной адгезии на слизистые оболочки дыхательных путей. Если бактериальная клетка преодолевает мукоцилиарный поток и соприкасается с эпителием, создаются условия для начала колонизации и дальнейшего повреждения эпителиальных клеток. Следствием этих процессов будет распро-

странение воспаления как на поверхностном слое, так и в глубокие ткани [23]. Как правило, *H. influenzae* осуществляет адгезию с помощью многочисленных белков-адгезинов, расположенных на поверхности мембраны, в том числе с участием автотранспортеров [29], что дает основание для изучения и апробирования адгезинов в качестве перспективных кандидат-вакцин.

Выделенный и охарактеризованный белок E (PE) с мол. массой 16 кДа относится к таким адгезинам [32]. Регион, кодирующий участок белка, ответственный за связывание с эпителием, обязательно полностью сохраняется у различных штаммов, и ген PE характеризуется высоким уровнем консервативности как среди NTHi, так и среди инкапсулированных штаммов — Hib [36]. Идентичность последовательности находится на уровне 96,9 — 100% без учета последовательностей, кодирующих сигнальные пептиды, а область связывания (аминокислоты 84 — 108) с эпителиальными клетками присутствовала во всех исследованных образцах. Важно отметить, что PE экспрессировался во всех исследованных образцах NTHi (126 изолятов), независимо от фазы роста, в 98,4% случаев. Филогенетический анализ последовательности PE позволил разделить виды *Haemophilus* на 2 отдельных кластера. Изоляты Hib относились к 1 кластеру, а NTHi присутствовали в обоих. Далее было установлено, что самый важный для активного связывания с эпителиальными клетками домен PE (84 — 108 аминокислоты) необходим для связывания с молекулами полифункционального гликопротеина крови и внеклеточного матрикса — витронектина [17]. Несколько позже в экспериментах с мутантами NTHi было установлено, что PE одновременно связывает не только витронектин, но и другие физиологически важные молекулы, в том числе гликопротеин базальной мембраны — ламинин, что определяет многофункциональный характер PE как адгезина [18, 35]. В экспериментах, проведенных на мышах, иммунизированных фрагментом PE (84 — 108), было показано, что животные переносили экспериментальное заражение NTHi в значительно более легкой форме, по сравнению с животными в группе контроля [32].

Другая группа перспективных антигенов относится к белкам внешней мембраны бактерий, которые формируют каналы диффузии и позволяют небольшим полярным молекулам проникать внутрь клетки и привлекают внимание создателей вакцин по многим причинам. Эти белки — порины, являются основными компонентами внешней оболочки грамотрицательных бактерий, и *H. influenzae* в том числе. Внешняя оболочка этих микроорганизмов содержит от шести до восьми основных белков [3, 25] из которых наибольшая часть представлена белком P2. Такое распределение справедливо как для NTHi, так и для Hib [9].

Порины играют важную роль в бактериальном патогенезе и участвуют в обеспечении процессов присоединения бактериальной клетки, инвазии и устойчивости к сывороточным факторам иммунитета. Значительный прогресс в понимании функции поринов произошел после определения кристаллической структуры ряда белков этой группы [33, 39]. Было показано, что они представляют собой тример, в котором каждый мономер, как правило, представлен в виде 16 антипараллельных  $\beta$ -нитей, пересекающих внешнюю мембрану. На поверхности клеток располагается восемь петель, они крупные, их длина варьирует, периплазматически расположено восемь коротких изгибов (короткие петли). Во всех случаях сечение пор ограничивается одной большой петлей L3, которая уходит в канал и сужает его, что определяет размер поры,

ее физиологические свойства, проводимость. Сравнение последовательности генов, кодирующих P2, показали, что трансмембранные области этого белка относительно консервативны. В то же время, существует значительная неоднородность в участках, кодирующих область внешнего участка петли [2, 4, 11]. Далее было показано, что наибольшую стимуляцию антителообразования к NTHi определяла петля L5, которая, как считается, содержит штамм-специфичные иммунодоминантные эпитопы. Приведенные выше данные и результаты других исследований позволили заключить, что порин P2 NTHi является одним из лучших вакцин-кандидатов, с точки зрения его функциональных характеристик [40].

Продолжая работы в этом направлении, Cantisani M. et al. [7] определили пептиды комплементарные последовательности одной из петель (L7) P2, которые могут быть использованы для блокирования деятельности поринов. По мнению авторов, эта стратегия может представлять собой новый подход для разработки антибактериальных препаратов в отношении широкого спектра грамотрицательных бактерий.

Следующая группа широко исследуемых антигенов — это везикулы внешней мембраны (OMVs), которые являются продуктом естественной секреции грамотрицательных бактерий. Они возникают, когда части наружной мембраны выпячиваются и образуется перетяжка. В результате появляются сферические (двуслойные) пузырьки. Размер пузырьков варьирует от 10 до 300 нм в диаметре, а их состав представлен, в основном, компонентами наружной мембраны, такими как фосфолипиды, ЛПС или ЛОС. Кроме того, OMVs содержат перипластические компоненты, которые попадают в просвет мембраны в процессе выпячивания и образования везикул [22]. Таким образом, в составе везикул находятся многочисленные компоненты бактериальной клетки, бактериальные антигены [30]. Гетерогенный состав везикул обеспечивает мультииммуногенность и адьювантные свойства, что выделяет их из ряда антигенов, которые используются для разработки вакцин [21]. Наибольший успех был достигнут в работах с использованием OMVs, полученных из *Neisseria meningitidis*. В результате была создана эффективная и безопасная вакцина, которая широко используется в нескольких странах [34], [Holst J. et al., 2009].

Получение препарата OMVs из *H. influenzae* (штамм 86-028NP) было впервые описано для некапсулированного серотипа d еще в 1982 году [8]. В его составе было обнаружено 142 белка. Среди них: гема-утилизирующий белок, защитный поверхностный антиген D15, трансферин-связывающие белки, белки внешней мембраны (P1, P2, P5 и P6), обладающие высоким иммуногенным потенциалом [37]. Данные, полученные в современных экспериментах, позволили убедиться в том, что OMVs многих штаммов NTHi имеют аналогичный состав белков. На основании такой информации возникает необходимость решать вопрос о целесообразности поиска одного антигена в случае, когда можно использовать для иммунизации сочетание нескольких компонентов, так как поликомпонентный препарат способен существенно повысить эффективность вакцины против гетерогенных штаммов NTHi. Позитивные результаты экспериментов по изучению эффективности интраназальной вакцинации мышей открывают хорошие перспективы для использования OMVs и позволяют рассматривать препарат в качестве нового перспективного вакцин-кандидата [Sandro Roier et al., 2012].

Несмотря на то, что использование нескольких антигенов для получения иммуногенного профилактического препарата имеет весомые основания, наибольшую степень развития в настоящее время получило производство вакцин, конъюгированных с белком (липопротеином) D (PD). Результаты исследования 127 штаммов *H. influenzae*, среди которых были инкапсулированные штаммы серотипов a — f, позволили сделать вывод о том, что PD является видоспецифичным, так как был обнаружен во всех исследованных образцах [1]. Расположение на поверхности бактерий и существенное количество (2800 молекул на бактериальную клетку) делает этот белок привлекательным кандидатом для получения вакцины.

В результате анализа области генома, кодирующей PD, удалось определить, что последовательность гена имеет протяженность 1092 нуклеотидных основания и несет информацию для синтеза белковой молекулы, содержащей 346 аминокислот с расчетной молекулярной массой 41,821 дальтона [20]. О высокой консервативности нуклеотидной последовательности гена PD можно судить по результатам исследования 14 штаммов *H. influenzae* [14]. Идентичность нуклеотидной последовательности превышала 97%, идентичность аминокислотной последовательности была на таком же высоком уровне. Однако штаммы, выделенные от пациентов с хроническим бронхитом, характеризовались ограниченным дрейфом последовательности, кодирующей ген PD [12, 19].

Кроме NTHi, ведущим бактериальным патогеном, вызывающим ОСО, является *Streptococcus pneumoniae*. Эти два возбудителя также признаны основной причиной инфекции нижних дыхательных путей. Поэтому использование антигенов NTHi в составе вакцины против инфекций, вызванных пневмококком, представляется достаточно рациональным решением. Вакцины, в составе которых использовался только обычный капсульный полисахарид *S. pneumoniae*, применялись в течение многих десятилетий, но они создавали недостаточный иммунитет у детей. Созданная позже вакцина, содержащая полисахариды 7 серотипов *S. pneumoniae* (препарат Prevenar; Wyeth), конъюгированные с белком CRM197 (нетоксичный мутант дифтерийного токсина), обладает высоким уровнем иммуногенности у детей в отношении инвазивных пневмококковых заболеваний, а также демонстрирует умеренную эффективность против ОСО, вызванного серотипами, использованными для приготовления пневмококковой вакцины [5]. Недостаток этой вакцины заключался в том, что использованный для ее получения белок-носитель CRM197 применяется и для производства вакцины против Hib, и для получения менингококковой конъюгированной вакцины. Многократная вакцинация одним и тем же белком-носителем в данном случае является неоправданной и вызывает опасения, так как может оказать негативное влияние на иммуногенность других конъюгированных вакцин, которые вводятся одновременно с пневмококковой конъюгированной вакциной [6]. Для исключения возможных негативных явлений при вакцинации необходимо использовать другие белки-носители. Наиболее перспективным среди кандидатов на роль такого белка представлялся PD, так как был достаточно охарактеризован и отличался поверхностной локализацией, высокой степенью консервативности и патогенности. Доклинические результаты экспериментов с этим белком также подтверждали его перспективность [15, 28]. Учитывая вышесказанное, PD в неацилированной форме как белок-носитель с анти-

генным потенциалом был использован для производства новой 11-валентной конъюгированной пневмококковой вакцины. В результате удалось получить вакцину, обладающую двойным защитным действием: против *S. pneumoniae* и NTHi. Иммуногенность и безопасность новой 11-валентной пневмококковой вакцины с PD как носителем были испытаны в рандомизированном, контролируемом исследовании с участием 154 здоровых детей [27]. Вакцинация проводилась в возрасте 2, 4, 6 месяцев и в возрасте 12 — 15 месяцев. Концентрация антител к пневмококку после введения первых 3 доз варьировала от 1,26 до 4,92 мкг/мл, в зависимости от серотипа и группы детей. На основании этих данных был сделан вывод, что PD-конъюгированная пневмококковая вакцина иммуногенна и обеспечивает защиту детей на достаточно высоком уровне.

В следующем рандомизированном двойном слепом исследовании [31] была изучена возможность применения этой пневмококковой полисахаридной вакцины для предупреждения ОСО, вызванного как *S. pneumoniae*, так и NTHi. Анализ показал, что PD-конъюгированная вакцина значительно снижала (33,6%) общую заболеваемость ОСО. Эффективность вакцинации против ОСО, вызванного микроорганизмами тех серотипов, которые были использованы при изготовлении вакцины, составила 52,6 — 57,6% (для *S. pneumoniae*) и 35,3% (для NTHi). При этом увеличения заболеваемости ОСО, вызванной пневмококками не использованных для изготовления вакцины серотипов или других бактериальных патогенов, не наблюдалось.

Другая пневмококковая полисахаридная PD-конъюгированная вакцина (PHiD-CV; Synflorix) содержит капсульные полисахариды, полученные из бактерий десяти серотипов *S. pneumoniae*. Восемь из них конъюгированы с PD, лишенным липидного компонента, а два других конъюгированы либо со столбнячным, либо с дифтерийным анатоксином. Троекратная первичная вакцинация детей в возрасте до 6 месяцев PHiD-CV вызвала высокий иммунный ответ на все серотипы пневмококков, использованных для получения вакцины. Кроме того, при исследовании опсонофагоцитарной активности были обнаружены функциональные антитела против всех серотипов.

Четвертую вакцинацию PHiD-CV делали на втором году жизни детей. Она вызвала анамнестический ответ на все десять серотипов пневмококка. При одновременном назначении конъюгата серогруппы С менингококка или пентавалентной цельноклеточной коклюшной комбинированной вакцины, а также вакцины против полиомиелита, применяемых по двум различным графикам первичной вакцинации, результирующая иммуногенность PHiD-CV клинически значимо не изменялась.

11Pn-PD — прототип 11-валентной PHiD-CV вакцины продемонстрировал защитные свойства от эпизодов острого отита среднего уха, вызванного *S. pneumoniae* и NTHi у младенцев в возрасте до 27 месяцев. Число впервые возникших эпизодов острого отита, вызванных серотипами бактерий, которые использовались при получении вакцины, у привитых препаратом 11Pn-PD сократилось на 52,6% по сравнению с детьми, иммунизированными контрольной вакциной. Переносимость PHiD-CV, в целом, была сопоставима с реакцией на 7vCRM [10].

До настоящего времени задача создания высокоэффективной вакцины против инфекций, вызванных многочисленными гетерогенными штаммами NTHi, остается актуальной. Применение PD в качестве белка-носителя с

антигенным потенциалом для получения конъюгированных вакцин в определенной мере решило эту задачу и позволило частично предотвращать эпизоды ОСО у детей. Этот результат создает оптимистичный фон для продолжения исследований, в том числе, работ по изучению других антигенов NTHi.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Akkoyunlu M., Ruan M., Forsgren A. Distribution of protein D, an immunoglobulin D-binding protein, in Haemophilus strains. *Infect. Immun.* 1991, 59: 1231-1238.
2. Arbing M. A., Hanrahan J. W., Coulton J. W. Mutagenesis identifies amino acid residues in extracellular loops and within the barrel lumen that determine voltage gating of porin from Haemophilus influenzae type b. *Biochemistry.* 2001, 40: 14621-14628.
3. Barenkamp S.J., Jr., Munson R.S., Granoff D.M. Outer membrane protein and biotype analysis of pathogenic nontypable Haemophilus influenzae. *Infect. Immun.* 1982, 36: 535-540.
4. Bell J., Grass S., Jeanteur D. Diversity of the P2 protein among nontypeable Haemophilus influenzae isolates. *Infect. Immun.* 1994, 62: 2639-2643.
5. Black S., Shinefield H., Fireman B. et al. Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2000, 19: 187.
6. Burrage M., Robinson A., Borrow R. et al. Effect of vaccination with carrier protein on response to meningococcal C conjugate vaccines and value of different immunoassays as predictors of protection. *Infect. Immun.* 2002, 70: 4946-4954.
7. Cantisani M., Vitiello M., Falanga A. et al. Peptides complementary to the active loop of porin P2 from Haemophilus influenzae modulate its activity. *Int. J. Nanomedicine.* 2012, 7: 2361-2371.
8. Concino M.F., Goodgal S.H. DNA-binding vesicles released from the surface of a competence-deficient mutant of Haemophilus influenzae. *J. Bacteriol.* 1982, 152: 441-450.
9. Coulton J.W., Chin A.C., Vachon V. Recombinant porin of Haemophilus influenzae type b. *J. Infect. Dis.* 1992, 165 (Suppl.): 188-191.
10. Croxtall J.D., Keating G.M. Pneumococcal polysaccharide protein D-conjugate vaccine (Synflorix; PHiD-CV). *Paediatr. Drugs.* 2009, 11 (5): 349-357.
11. Druim B., Dankert J., Jansen H.M. et al. Genetic analysis of the diversity in outer membrane protein P2 of non-encapsulated Haemophilus influenzae. *Microb. Pathog.* 1993, 14: 451-462.
12. Duim B., Ruiters P., Bowler L.D. et al. Sequence variation in the hpd gene of nonencapsulated Haemophilus influenzae isolated from patients with chronic bronchitis. *Gene.* 1997, 191: 57-60.
13. Erwin A.L., Smith A.L. Nontypeable Haemophilus influenzae: understanding virulence and commensal behavior. *Trends Microbiol.* 2007, 15: 355-362.
14. Fleischmann R.D., Adams M.D., White O. et al. Whole-genome random sequencing and assembly of Haemophilus influenzae Rd. *Science.* 1995, 269: 496-512.
15. Forsgren A., Riesbeck K., Janson H. Protein D of Haemophilus influenzae: a protective nontypeable H. influenzae antigen and a carrier for pneumococcal conjugate vaccines. *Clin. Infect. Dis.* 2008, 46 (5): 726-731.
16. Gu X.X., Rudy S.F., Chu C. et al. Phase I study of a lipooligosaccharide-based conjugate vaccine against nontypeable Haemophilus influenzae. *Vaccine.* 2003, 21 (Issues 17-18): 2107-2114.
17. Hallström T., Blom A.M., Zipfel P.F. et al. Nontypeable Haemophilus influenzae protein E binds vitronectin and is important for serum resistance. *J. Immunol.* 2009, 183 (4): 2593-2601.
18. Hallström T., Singh B., Resman F. et al. Haemophilus influenzae protein E binds to the extracellular matrix by concurrently interacting with laminin and vitronectin. *J. Infect. Dis.* 2011, 204 (7): 1065-1074.
19. Harrison A., Dyer D.W., Gillaspay A. et al. Genomic sequence of an otitis media isolate of nontypeable Haemophilus influenzae: comparative study with H. influenzae serotype d, strain KW20. *J. Bacteriol.* 2005, 187: 4627-4636.
20. Janson H., Hedén L.O., Grubb A. et al. Protein D, an immunoglobulin D-binding protein of Haemophilus influenzae: cloning, nucleotide sequence, and expression in Escherichia coli. *Infect. Immun.* 1991, 59: 119-125.

21. Kim S.H., Kim K.S., Lee S.R. et al. Structural modifications of outer membrane vesicles to refine them as vaccine delivery vehicles. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009, 1788: 2150-2159.
22. Kulp A., Kuehn M.J. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu. Rev. Microbiol.* 2010, 64: 163-184.
23. Lysenko E.S., Ratner A.J., Nelson A.L. et al. The role of innate immune responses in the outcome of interspecies competition for colonization of mucosal surfaces. *PLoS Pathog.* 2005, 1 (1): e1.
24. Morris S.K., Moss W.J., Halsey N. Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine use and effectiveness. *Lancet. Infect. Dis.* 2008, 8: 435-443.
25. Murphy T. F., Dudas K. C., Mylotte J. M. et al. A subtyping system for nontypable Haemophilus influenzae based on outer-membrane proteins. *J. Infect. Dis.* 1983, 147: 838-846.
26. Murphy T.F. Vaccines for nontypeable Haemophilus influenzae: the Future is now. *Clin. Vaccine Immunol.* 2015, 22 (5): 459-466.
27. Nurkka A., Joensuu J., Henckaerts I. et al. Immunogenicity and safety of the eleven valent pneumococcal polysaccharide-protein D conjugate vaccine in infants. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2004, 23: 1008-1014.
28. Pichichero M.E., Kaur R., Casey J.R. et al. Antibody response to Haemophilus influenzae outer membrane protein D, P6, and OMP26 after nasopharyngeal colonization and acute otitis media in children. *Vaccine.* 2010, 28 (44): 7184-7192.
29. Poolman J.T., Bakaletz L., Cripps A. et al. Developing a nontypeable Haemophilus influenzae (NTHi) vaccine. *Vaccine.* 2000, 19 (Suppl 1): 108-115.
30. Post D.M., Zhang D., Eastvold J.S. et al. Biochemical and functional characterization of membrane blebs purified from Neisseria meningitidis serogroup B. *J Biol. Chem.* 2005, 280: 38383-38394.
31. Prymula R., Peeters P., Chrobok V. et al. Pneumococcal capsular polysaccharides conjugated to protein D for prevention of acute otitis media caused by both Streptococcus pneumoniae and non-typable Haemophilus influenzae: a randomised double-blind efficacy study. *Lancet.* 2006, 367: 740-748.
32. Ronander E., Brant M., Eriksson E. et al. Nontypeable Haemophilus influenzae adhesin protein E: characterization and biological activity. *J. Infect. Dis.* 2009, 199: 522-531.
33. Saint N., Lou K. L., Widmer C. et al. Structural and functional characterization of OmpF porin mutants selected for larger pore size. II. Functional characterization. *J. Biol. Chem.* 1996, 271: 20676-20680.
34. Sexton K., Lennon D., Oster P. et al. The New Zealand meningococcal vaccine strategy: a tailor-made vaccine to combat a devastating epidemic. *N. Z. Med. J.* 2004, 117: 1015.
35. Singh B., Jalalvand F., Mörgelin M. et al. Haemophilus influenzae protein E recognizes the C-terminal domain of vitronectin and modulates the membrane attack complex. *Mol. Microbiol.* 2011, 81 (1): 80-98.
36. Singh B., Brant M. et al. Protein E of Haemophilus influenzae is a ubiquitous highly conserved adhesin. *J. Infect. Dis.* 2010, 201 (3): 414-419.
37. Sharpe S.W., Kuehn M.J., Mason K.M. Elicitation of epithelial cell-derived immune effectors by outer membrane vesicles of nontypeable Haemophilus influenzae. *Infect. Immun.* 2011, 79: 4361-4369.
38. Sun J., Chen J., Cheng Z. et al. Biological activities of antibodies elicited by lipooligosaccharide based-conjugate vaccines of nontypeable Haemophilus influenzae in an otitis media model. *Vaccine.* 2000, 18 (Issue 13): 1264-1272.
39. Wu T., Chen J., Murphy T.F. et al. Investigation of nontypeable Haemophilus influenzae outer membrane protein P6 as a new carrier for lipooligosaccharide conjugate vaccines. *Vaccine.* 2005, 23 (Issue 44): 5177-5185.
40. Yi K., Murphy T. F. Importance of an immunodominant surface-exposed loop on outer membrane protein P2 of nontypeable Haemophilus influenzae. *Infect. Immun.* 1997, 65: 150-155.

*Поступила 17.11.16*

Контактная информация: Овечко Николай Николаевич, к.б.н.,  
105064, Москва, М. Казенный пер., 5а, р.т. (495)917-07-41

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ САЛЬМОНЕЛЛ С ОРГАНИЗМОМ ХОЗЯИНА

Первый московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова

Заболевания, вызванные бактериями вида *Salmonella enterica*, остаются актуальной проблемой здравоохранения. Вид *Salmonella enterica* подразделяется на тифоидные серовары, которые вызывают системную инфекцию, и нетифоидные серовары, которые чаще всего протекают в форме гастроэнтерита с развитием воспалительной диареи. Оба типа сальмонелл являются факультативными внутриклеточными паразитами, способными инвазировать и размножаться как в профессиональных, так и в непрофессиональных фагоцитах, таких как М-клетка и энтероциты. Инвазия клеток и размножение в них связано с функционированием генов сальмонеллезных островов патогенности, которые определяют синтез третьего типа секреторных систем (ТЗСС). В отличие от сероваров сальмонелл тифоидной группы, нетифоидные серовары вызывают развитие воспалительной диареи, в развитии которой принимают участие как эффекторные молекулы ТЗСС, так и компоненты врожденного иммунитета. Рассматриваются новые подходы к лечению заболеваний, вызванных сальмонеллами через блокирование ТЗСС.

Журн. микробиол., 2017, № 4, С. 91—100

Ключевые слова: *Salmonella enterica*, острова патогенности, ТЗСС, воспалительная диарея

М.Н.Boichenko, V.V.Zverev, E.V.Volchkova

## INTERACTION OF SALMONELLA WITH HOST ORGANISM

Sechenov First Moscow State Medical University, Russia

Diseases caused by *Salmonella enterica* species bacteria remain a healthcare challenge. *Salmonella enterica* species is divided into typhoid serovars that cause systemic infection and non-typhoid serovars that most frequently have a course of gastroenteritis with a development of inflammatory diarrhea. Both types of salmonella are opportunistic intracellular parasites able to invade and reproduce in both professional and non-professional phagocytes, e.g. M-cells and enterocytes. Invasion of cells and reproduction in them relates to functioning of salmonella pathogenicity island genes that determined synthesis of the third type of secretory system (T3SS). Contrary to the salmonella typhoid group serovars, non-typhoid serovars cause a development of inflammatory diarrhea, and effector molecules of T3SS as well as innate immunity components take part in it.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 4, P. 91—100

Key words: *Salmonella enterica*, pathogenicity islands, T3SS, inflammatory diarrhea

Род *Salmonella* состоит из двух видов: *Salmonella bongori* и *Salmonella enterica*, которые включают более 2600 сероваров. Возбудители заболеваний у человека и теплокровных животных входят в род *S. enterica*, сальмонеллы, входящие в род *S. bongori*, связаны с холоднокровными животными. Серовары рода *S. enterica*, вызывающие заболевание у человека, подразделяют на тифоидные сальмонеллы (ТС) и нетифоидные сальмонеллы (НТС) [5, 9] на основании различий в их специфичности к хозяину и характеру вызываемых в организме хозяина клинических симптомов [13].

Серовары Typhi, Paratyphi A, B, C и Sendai адаптированы к человеку, используют его как естественный резервуар. Они являются возбудителями

брюшного тифа и паратифов, которые протекают как системные инфекции. Нетифоидные серовары вида *S. enterica* поражают как человека, так и теплокровных животных и птиц [5, 9, 13].

Ежегодно в мире фиксируется 27 миллионов случаев заболеваний брюшным тифом [5, 9], из которых 217 000 заканчиваются смертельным исходом [13]. Распространение заболевания характерно для развивающихся стран с неразвитой системой водоснабжения и плохими санитарно-бытовыми условиями [5, 9]. В последние годы отмечается подъем заболеваемости паратифом А в странах Юго-Восточной Азии с формированием в этом регионе эндемического очага [9, 13]. Следует отметить, что среди конвалесцентов брюшного тифа 10% продолжают выделять возбудитель в течение 3 месяцев после клинического выздоровления [13]. Одна четверть лиц, инфицированных *Salmonella* серовара Typhi, становится бессимптомными носителями. Сайтом носительства в большинстве случаев становится желчный пузырь. Особую опасность при этом представляют желчные камни, на которых сальмонеллы формируют биопленку [21].

Заболевания, вызываемые НТС, распространены повсеместно. Ежегодно фиксируется 93,8 миллионов случаев, из них 15 500 со смертельным исходом, которые в основном характерны для развивающихся стран [13, 21]. Заболевания, вызываемые НТС, обычно протекают в форме гастроэнтерита. Системная инфекция встречается в 5% случаев [13]. Наиболее частыми возбудителями системной инфекции являются серовары *S. enterica* Typhimurium, Choleraesuis, Dublin. Группу риска составляют иммунодефицитные лица и дети младшего возраста [13].

Несмотря на то, что применение антибиотиков не рекомендуется для лечения заболеваний, вызываемых НТС, так как это приводит к пролонгированному их выделению из организма, наблюдается тенденция к возрастанию антибиотикорезистентности сальмонелл [9, 13], особенно к фторхинолонам, цефалоспорином 3 поколения, карбопинемам [26, 47], которые применяются для лечения заболеваний, вызванных сероварами ТС.

С учетом социально политической обстановки в мире, которая характеризуется миграционными потоками людей в Европу из стран, в которых распространены тифо-паратифозные инфекции, так и миграционными процессами из стран Центральной Азии в Россию, заболевания тифом и паратифами становятся актуальными как для европейских стран, так и для России. Учитывая рост распространения резистентности к антибиотикам среди сальмонелл, необходимо разрабатывать новые методы лечения, а для этого необходимо детальное понимание молекулярного патогенеза заболеваний, вызываемых как ТС, так и НТС.

Патогенез заболеваний, вызываемых сальмонеллами, зависит от координированного функционирования различных факторов патогенности, которые кодируются так называемыми сальмонеллезными островками патогенности (СОП) [14], экспрессия которых находится под контролем двухкомпонентных регуляторных систем [9].

У сероваров *S. enterica* описано 23 островка патогенности. Среди них имеются общие как для сероваров тифоидной группы сальмонелл, так и для сероваров нетифоидной группы сальмонелл [38], в частности 5 островков патогенности с 1 по 5. *Salmonella enterica* серовара Typhi обладает 4 специфическими СОП: 7, 15, 17, 18 [9], а *S. enterica* серовара Typhimurium обладает специфическим СОП-14 [38].

Способность воспринимать внешние стимулы и осуществлять регуляцию экспрессии генов зависит от двух компонентных регуляторных систем, которых у сальмонелл имеется несколько. Среди них следует отметить Pho/PhoQ систему, которая отвечает на  $Mg^{2+}$  голодание и низкие значения pH [30]; OmpR/EnvZ систему, отвечающую на изменение осмомолярности [14]; ttrRS систему, способствующую утилизации тетраэтилена [17], о которых будет сказано позже.

Рассматривая патогенез заболеваний, вызванных сальмонеллами, следует отметить, что бактерии вида *S. enterica* являются факультативными внутриклеточными паразитами, способными инвазировать широкий круг хозяев, вызывая острую или хроническую инфекцию в результате способности инвазировать как профессиональные фагоциты, так и непрофессиональные фагоциты, такие как энтероциты и М-клетки, и реплицироваться и персистировать в фагоцитирующих клетках, таких как макрофаги и дендритные клетки [31].

Как ТС, так и НТС после проникновения в организм человека рег ос первоначально инвазируют интестинальный эпителий [17]. Сальмонеллы проходят через интестинальный барьер несколькими путями: через эпителиальные клетки [24]; через М-клетки [24], которые помогают осуществлять транспорт сальмонелл транцитозом в субэпителиальное пространство к подлежащим лимфоидным образованиям, таким как Пейеровы бляшки и дендритные клетки lamina propria; через непосредственный захват дендритными клетками.

Проникновение сальмонелл в непрофессиональные фагоциты осуществляется при помощи третьего типа секреторной системы (ТЗСС). ТЗСС располагается в клеточной стенке бактерии и представляет шприцеобразную структуру, через которую происходит секреция эффекторных молекул, вырабатываемых бактерией, непосредственно в клетку хозяина. Вид *S. enterica* обладает двумя типами ТЗСС: ТЗСС-1 и ТЗСС-2, которые кодируются СОП-1 и СОП-2 соответственно [14].

СОП-1 играет ведущую роль в развитии заболеваний, вызванных как тифоидными, так и нетифоидными сероварами сальмонелл [16], так как несет гены для ТЗСС-1, эффекторные белки которой необходимы для осуществления инвазии непрофессиональных фагоцитов и активации воспалительной реакции [12]. Эффекторные белки ТЗСС-1: SipA, SipC, SopB, SopD, SopE, SopE-2 индуцируют реорганизацию цитоплазматической мембраны и подлежащего цитоскелета клетки, вызывая образование макропиносомы [11].

Профессиональные фагоциты, макрофаги и дендритные клетки способны узнавать микроб при помощи рецепторов, расположенных на их клеточной поверхности, и осуществлять ТЗСС-независимый захват сальмонелл. Макрофаги могут захватывать сальмонеллы и при помощи ТЗСС-1, но в результате такого поглощения микроба наступает быстрая апоптотическая смерть макрофага — пироптоз [11].

Сальмонеллы могут также пересекать эпителиальный барьер кишечной стенки пассивным транспортом через дендритные клетки, которые вытягивают псевдоподии между локальными эпителиальными клетками. Инфицированные *S. enterica* дендритные клетки мигрируют к мезентериальным лимфатическим узлам, способствуя при этом развитию системной инфекции [35]. Этот феномен был доказан на мутантах *S. enterica* серовара Typhimurium,

дефектным по СОП-1, которые оказались способными вызвать системную инфекцию [25].

После интернализации в различные клетки хозяина наступает внутриклеточная фаза патогенеза сальмонеллезной инфекции, в процессе которой сальмонеллы сохраняются внутри клетки в содержащей сальмонеллы вакуоли (ССВ) [Stevens M.P. et al., 2016]. Способность сальмонелл сохраняться и реплицироваться внутри макрофага, избегая слияния с НАДФ Н<sup>+</sup>-оксидазным комплексом, является существенным для развития системной инфекции. В формировании ССВ принимают участие эффекторный белок ТЗСС-1, SopB [22], вызывающий активацию актина, а также продукты генов СОП-2. В результате секреции эффекторных белков ТЗСС-2 из ССВ в цитоплазму клетки-хозяина сальмонеллы, используя эти белки, направляют биогенез ССВ таким образом, чтобы вакуоль отделилась от эндосомальной системы клетки, избегая тем самым слияния фагосомы с лизосомой [40]. Показано, что на начальных этапах нахождения сальмонелл в макрофаге ССВ богата ранними маркерами (EEJHRabs) и трансферриновым рецептором [39]. Впоследствии эти маркеры заменяются на поздние, включая Н<sup>+</sup> АТФазу и лизосомальный мембранный липопротеин LAMI [15].

Главным итогом развития ССВ является образование индуцированных сальмонеллой филаментов (Sif), которые представляют из себя длинные мембранные структуры, которые необходимы для расположения ССВ в перинуклеарном районе. Эти филаменты содержат поздние маркеры: LAMI, катепсин, Н<sup>+</sup> АТФазу [10]. Образование Sif по мнению Van Engelenburg S.B. и Palmer A.E. [44] играет ключевую роль в патогенезе сальмонеллезной инфекции, предположительно в результате увеличения размеров ССО, что способствует репликации сальмонелл в процессе системной инфекции.

В работе [8] показано, что при проникновении сальмонелл как в эпителиальные клетки, так и в макрофаги вокруг ССВ происходит собирание актиновых филаментов. В случае введения инфицированным *S. enterica* серовара Турhinurium мышам ингибиторов полимеризации актина происходило понижение репликации бактерий, что указывало на тот факт, что полимеризация актина важна для репликации сальмонелл внутри клетки.

Внутри макрофага ТЗСС-2 предупреждает трафик НАДФ Н<sup>+</sup>-оксидазы по направлению к ССВ, предупреждая развития респираторного взрыва [45].

Внутри дендритных клеток ССВ теряет поздний эндосомальный маркер LAMI [41]. По мнению Jantsch J. et al. [23] функционирование СОП-2 и Pho/PhoQ системы не имеет существенного значения для сохранения и репликации в них сальмонелл, так как для сохранения сальмонелл в дендритных клетках требуется О-антиген.

Другие исследования [33] говорят о том, что избегание слияния ССВ с фагосомой при нахождении сальмонелл в макрофагах не обязательно, так как сальмонеллы продолжают сохраняться в макрофаге и после слияния ССВ с лизосомой, потому что экспрессия СОП-2 позволяет микробу существовать в лизосомальном окружении, ингибируя продвижение активных форм кислорода и синтазы оксид азота [39].

Если на начальных этапах патогенеза тифоидные и нетифоидные серовары сальмонелл действуют идентично, то на последующих этапах сальмонеллы тифоидной группы по сравнению с сальмонеллами нетифоидной группы не

вызывают развития сильного воспаления на начальном этапе инфекционного процесса [20].

Как было отмечено выше, НТС вызывают развитие гастроэнтерита, сопровождающегося воспалительной диареей. В развитии воспалительной реакции, вызываемой сероварами нетифоидной группы сальмонелл, принимают участие ассоциированные с микробом факторы, стимулирующие врожденный иммунитет, и факторы патогенности, влияющие на метаболизм клетки-хозяина [21]. Первоначально предполагалось, что функционирование СОП-1 связано только с осуществлением процесса инвазии микроба в клетки-хозяина, недавно были описаны дополнительные функции этого островка патогенности [19, 37]. Экспрессия СОП-1 и, как следствие, секреция белка SipA вызывают индукцию врожденного иммунитета хозяина, в результате чего происходит развитие воспалительной реакции и приток нейтрофилов через интестинальный эпителиальный барьер. Экспрессия СОП-1, сопровождающаяся секрецией белков ТЗСС, приводит к синтезу NF- $\kappa$ B транскрипционного фактора и, как следствие этого, проникновение сальмонелл в эпителиальную клетку сопровождается базолатеральным выделением из клетки интерлейкина-8. SopE, SopE2, SopB помимо совместного участия в процессе инвазии в клетку активируют Rho-ГТФазу, которая, в свою очередь, включает сигнальную трансдукцию, направленную на активацию NF- $\kappa$ B зависимого воспалительного каскада [46].

SipA в соединении с ИЛ-8 и РЕЕС (pathogen elicited epithelial chemoattract) требуется для осуществления рекрута нейтрофилов, так как продукция РЕЕС может индуцироваться SipA. Секретируемый в результате экспрессии СОП-1 SipB связывает каспазо-1 (ИЛ-1 $\beta$  конвертирующий) фермент в цитозоле клетки, вызывая созревание провоспалительных цитокинов ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-18 в активные пептиды. SipB является также ответственным за пироптоз, быструю форму запрограммированной клеточной смерти, которая связана с антимикробным ответом в течение воспаления [19], который рассматривается как механизм защиты хозяина, предупреждая дальнейшее выделение медиаторов. В последние годы было также показано, что сальмонеллы секретируют SrfA эффекторный белок, который принимает участие в активации NF- $\kappa$ B сигнального пути. В экспериментах *in vivo* было показано, что у мышей, инфицированных srfA-дефицитными штаммами мутанта *S. enterica* серовара Typhimurium была уменьшена воспалительная реакция [28].

Экспрессия СОП-2, которая регулируется регуляторной системой OmpR/EnvZ, не связана с развитием воспаления, а необходима для осуществления внутриклеточной персистенции сальмонелл, давая им возможность, как было отмечено ранее [7], избегать фагосомального окисления.

Говоря о механизме развития воспаления в результате стимулирования сальмонеллами врожденного иммунитета, следует отметить, что инвазированные сальмонеллы узнаются макрофагами и дендритными клетками через специальные рецепторы, называемые PRR (patterns recognition receptors), которые узнают молекулярные группировки (шаблоны) на поверхности бактериальной клетки, обозначаемые как PAMP (pathogen associated molecular pattern). К PRR относятся TLR (Toll-like receptor). Взаимодействие TLR с PAMP приводит к осуществлению притока нейтрофилов и продукции провоспалительных цитокинов (ИЛ-16, ИЛ-1 $\beta$ , ФНО, гамма-ИНФ) [27]. Сальмонеллы

экспрессируют множество PAMP: ТЗСС, ЛПС, флагеллы, которые узнаются TLR.

В результате острого кишечного воспаления, индуцированного нетифоидными сероварами *S. enterica*, происходит генерация терминальных электронных акцепторов, нитрата и тетрагидрата, в воспаленной кишечной петле. Эти вещества могут использовать сальмонеллы нетифоидной группы, тем самым приобретая способность оказываться вне конкуренции кишечной микробиоте, которая не способна утилизировать эти электронные акцепторы [42]. Это способствует распространению сальмонелл в кишечнике. Синтез тетрагидрата редуцтазы, которая генерирует образование тиосульфата, связан с функционированием СОП-2, регулируясь регуляторной системой *ttrRS* [18]. Сальмонеллы тифоидной группы по сравнению с сальмонеллами нетифоидной группы теряют эту способность [38].

Тифоидные серовары *S. enterica* по сравнению с нетифоидными сероварами не вызывают выраженного интестинального воспаления, сопровождающегося инфильтрацией нейтрофилов в просвет кишечника [32]. Тифоидные серовары *S. enterica* после прохождения эпителиального кишечного барьера достигают подлежащей лимфоидной ткани и размножаются внутри мононуклеарных фагоцитов. Инфекция быстро становится системной с распространением микроба от мезентериальных лимфатических узлов к лимфоидным образованиям печени, легких, костного мозга, селезенки. Из печени возбудитель попадает по желчным протокам в желчный пузырь, вызывая вторичное инфицирование тонкого кишечника через секрецию желчи [13].

По мнению House D. et al. [20] отсутствие интестинального воспаления и миграции нейтрофилов в просвет кишечника благоприятствуют инвазии серовара *S. typhi* в более глубокие ткани. Серовар *S. typhi* индуцирует ограниченный воспалительный ответ, потому что не способен стимулировать развитие воспаления через активацию TLR5. В системе *in vitro* было показано, что инфицированная сероваром *S. typhi* культура эпителиальных клеток T84 продуцировала низкий уровень хемоаттрактанта нейтрофилов ИЛ-8, по сравнению с эффектом, вызываемым сероваром *S. typhimurium* [13]. Из этого следует, что *S. typhi* продуцирует факторы патогенности, которые способны преодолеть действие факторов врожденного иммунитета в слизистой тонкого кишечника, не вызывая нейтрофильной инфильтрации и развития воспалительной реакции. Предполагается, что Vi-антиген делает *S. typhi* резистентной к фагоцитозу, в результате маскировки Vi-антигеном доступа к PRR, вызывая тем самым меньшую продукцию ИЛ-8 [48]. Vi-антиген кодируется у *S. typhi* СОП-7, специфичным для этого серовара. Но остается открытым вопрос механизма патогенеза заболеваний, вызываемых сероварами Paratyphi A, B, C и Sendai.

Здесь следует отметить, что после проникновения в клетку сальмонеллы начинают секретировать новый набор эффекторных молекул, действие которых направлено на восстановление гомеостаза инвазированной клетки, среди которых SptP, SspHI. SptP нивелирует активность SopE, SopE2, SopB. Совместно SptP, SspHI участвуют в уменьшении продукции ИЛ-8 [Sun A. et al., 2016]. Показано, что SspHI влияет на NF- $\kappa$ B зависимую генную экспрессию. На основании этих данных делается предположение, что супрессия провоспалительного ответа имеет критическое значение для внутриклеточ-

ного существования микроба в процессе патогенеза сальмонеллезной инфекции.

В настоящее время лечение гастроэнтеритов, вызванных нетифоидными сероварами сальмонелл, легкого и среднетяжелого течения, предусматривает проведение патогенетической (регидратационной и дезинтоксикационной) терапии. Этиотропная терапия при сальмонеллезе назначается по показаниям. Абсолютными показаниями к назначению этиотропной терапии являются генерализованные и осложненные формы сальмонеллеза (инфекционно-токсический шок). При наличии выраженного колитического синдрома гастроинтестинальной формы сальмонеллеза, особенно его затяжном течении, а также у иммунокомпromетированных пациентов, лиц с тяжелой сопутствующей соматической патологией используют антибактериальные препараты. Препаратами выбора являются фторхинолоны. При генерализованных формах возможно применение цефалоспоринов 3 поколения (цефтриаксон по 12 граммов в сутки внутривенно, внутримышечно). Кроме этого, антимикробные препараты могут использоваться в целях санации хронических бактерионосителей, однако их эффективность низка. Учитывая, что в клинической картине сальмонеллеза синдромы интоксикации и диареи занимают ведущее место [3], в результате целого комплекса исследований было предложено использование нестероидных противовоспалительных средств (НПВС), в частности индометацина, для купирования основных клинических симптомов заболевания. В основе противовоспалительного действия индометацина при сальмонеллезе лежат представления о механизме действия НПВС, который проявляется в угнетении фермента циклооксигеназы (ЦОГ), ответственной за синтез простагландинов, простациклинов и тромбоксанов, играющих основную роль в развитии воспалительного процесса. Ведущий механизм действия НПВС — это блокирование (ингибирование) фермента циклооксигеназы, отвечающего за выработку данных веществ в организме, что, в свою очередь, приводит к снижению температуры тела и уменьшению воспаления. К сожалению, НПВП не действуют непосредственно на возбудитель, но в комплексе с антимикробными препаратами могут не только сокращать течение заболевания, но и предупреждать осложнения.

По мнению Li J. et al. [29] факторы патогенности являются подходящими мишенями для разработки новых антибактериальных агентов. Предполагается, что к ингибиторам синтеза факторов патогенности будет менее развиваться бактериальная резистентность, тем самым давая им преимущество перед традиционными антимикробными препаратами.

Действие различных лекарственных препаратов на течение инфекционных процессов в последнее время стало интенсивно изучаться. В частности, было показано, что катехоламины, норэпинефрин и эпинефрин стимулировали рост серовара *S.typhimurium*, увеличивали подвижность этого микроба, а также стимулировали экспрессию гена шига-подобного токсина у энтерогеморрагической *E.coli* O157:H7. Была также показана роль катехоламинов в развитии сальмонеллезной инфекции [Stevens M.P., 2016]. Следует отметить, что ранее нами в экспериментах *in vivo* было показано, что введение мышам адреналина, который повышал уровень ц-АМФ в перитонеальных и селезеночных макрофагах, приводило к потенцированию инфекции, вызванной *Salmonella* серовара Dublin. Введение же препарата обзидана, который понижал уровень ц-АМФ в перитонеальных и селезеночных макрофагах, тормозило размноже-

ние *Salmonella* серовара Dublin в селезенке мышей [1]. Также было показано, что НВс-антиген вируса гепатита В ингибировал как размножение *Salmonella* серовара Enteritidis в культуре перитонеальных макрофагов мышей, так и ограничивал персистенцию микроба в организме мышей независимо от вирулентности штамма. Однако точная мишень действия НВс-антигена определена не была. Предполагалось, что НВс-антиген возможно ингибировал экспрессию СПО-2 [2].

Из приведенных в обзоре данных видно, что главным фактором патогенности, который обеспечивает начальные этапы патогенеза сальмонеллезной инфекции, вызванной как тифоидными, так и нетифоидными сероварами сальмонелл, является ТЗСС-1, эффекторный белок которой необходимы для осуществления инвазии слизистой стенки кишечника и активации воспалительной реакции. Поэтому перспективным является подбор препаратов, которые действуют на ТЗСС, кодируемую СПО-1. Ряд работ, проведенных в этом направлении, показал, что цитоспорон В и его аналоги блокировали секрецию связанных с СОП-1 белков, ингибируя при этом инвазию клеток Hela [25]. В работе [43] было показано, что препараты традиционной китайской медицины ослабляли ключевой фактор патогенности у серовара *S.typhimurium*, не влияя на бактериальный рост. Байкалеин — специфический флавоноид из *Scutellaria baicalensis* действовал на ТЗСС, кодируемую СОП-1, ингибируя при этом бактериальную инвазию эпителиальной клетки. Структурно связанные флавоноиды, такие как quercetin, также инактивировали СПО-1 связанную ТЗСС.

Детальное исследование патогенеза инфекций, вызванных сероварами *S. enterica* [34], привлекает внимание не только для разработки новых антимикробных препаратов, но и для использования сальмонелл в новых инновационных подходах лечения опухолей. В работе [6] суммированы результаты исследований, которые показали возможность аккумуляции сальмонелл в опухолях, что сопровождалось замедлением роста опухоли. Атенуированные штаммы сальмонелл уменьшали развитие опухолей или непосредственно, или через экспрессию терапевтических препаратов [4]. Сальмонеллы могут расти как в аэробных, так и в анаэробных условиях, т.е. способны колонизировать как метастазы, так и крупные опухоли. Сальмонеллы, как было показано выше, индуцируют через активацию врожденного иммунитета продукцию цитокинов, таких как гамма-интерферон, интерферон-индуцибельных хемокинов, способствующих рекруту естественных киллеров и Т-лимфоцитов к опухоли. Все это делает их перспективными агентами при разработках инновационной противоопухолевой терапии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бойченко М.Н., Левашев В.С. Исследование роли ц-АМФ в развитии сальмонеллезной инфекции в эксперименте. БЭБиМ, 1987, 2: 190-192.
2. Бойченко М.Н., Донин М.В., Зверев В.В. Влияние экспрессии НВс-антигена на размножение рекомбинантных штаммов сальмонелл в системах *in vivo* и *in vitro*. Вестник РАМН. 2010, 11: 53-55.
3. Пак С.Г., Белая О.Ф., Малов В.А., Волчкова Е.В. и др. Опыт и перспективы изучения синдрома интоксикации в инфекционной патологии. Журнал инфектологии. 2009, 1 (1): 9-17.
4. Agrach N., Zhao M., Porwollik S. et al. Salmonella promotes preferentially activated inside tumors. Cancer Res. 2008, 68: 4827-4832.
5. Buckle G.C., Walker C.L., Black R.E. Typhoid fever and paratyphoid fever: systemic review to

- estimate global morbidity and mortality for 2010. *J. Glob. Health.* 2012;2:010401 10.7189/jogh.02.010401.
6. Chang W-W., Lee Ch-H. Salmonella as innovate therapeutic antitumor agent. *Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15: 13546-13554.
  7. Coburn B., Li Y., Owen D. et al. Salmonella enterica serovar Typhimurium pathogenicity island 2 is necessary for complete virulence in a mouse model of infections enterocolitis. *Infect. Immun.* 2005, 73 (6): 3219-3227.
  8. Deiwick J., Thomas N., Sezgin E. et al. Enviromental regulation of Salmonella pathogenicity island 2 gene expression. *Mol. Microbiol.* 1999, 31: 1759-1773.
  9. De Jong H.K., Parry C.M., van der Poll T., Wiersinga W.J. Host-hathogen interaction in invasive salmonellosis. *PLoS Pathog.* 2012, 8: 1002933.10.1371/journal.ppat.1002933
  10. Ellermeier C.D., Ellermeier J.R., Slauch J.M. HilD, HilC and RtsA constitute a feed forward loop that controls expression of the SPII type three secretion system regulator hilA in Salmonella enteric serovar Typhimurium. *Mol. Microbiol.* 2005, 57 (3): 691-705.
  11. Fink S.L., Cooksun B.T. Pyroptosis and host cell death responses during Salmonella infection. *Cell. Microbiol.* 2007, 9: 2562-2570.
  12. Galan J.E. Salmonella interaction with host cells: type III secretion at work. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2001, 17: 53-86.
  13. Gal-MorCh., Boyle E.C., Grassal A. Same species different disease: how and why typhoidal and non-typhoidal Salmonella enterica serovars differ. *Front. Microbiology.* 2014, 5: 391-398.
  14. Garsai P., Gnanadhas D.P., Chakravorty D. Salmonella enterica serovar Typhimurium and Typhi as model organisms. *Virulence.* 2012, 3 (40): 377-388.
  15. Gorvel J.P., Meresse S. Maturation steps of the Salmonella-containing vacuole. *Microbes Infect.* 2001, 3 (14-15): 1299-1303.
  16. Hansen-Wester I., Hensel M. Salmonella pathogenicity island encoding type III secretory system. *Microbes Infect.* 2001, 3: 549-559.
  17. Haraga A., Ohlson M.B., Miller S.I. Salmonella interplay with host cells. *Nat. Rev. Microbiol.* 2008, 6: 53-66.
  18. Hensel M., Hinsley A.P., Nikolaus T. et al. The genetic basis of tetrathionate respiration in Salmonella typhimurium. *Mol. Microbiol.* 1999, 32: 275-287.
  19. Hernandez L.D., Pyrarert M., Flavell R.A., Galan J.A. Salmonella protein causes macrophage cell death by inducing auto phagy. *J. Cell. Biol.* 2003, 163 (5): 1123-1131.
  20. House D., Wain J., HoV.A. et al. Serology of typhoid fever in an area of endemicity and its relevance to diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39: 1002-1007.
  21. Hurley D., Mc Cusher M., Funning S. et al. Salmonella-host interaction —modulation of the host innate immune system. *Front. Immunol.* 2014, 5: 481-488.
  22. Ibarra J.A., Steele-Mortimer O. Salmonella-the ultimate insider. *Salmonella virulence factors that modulate intracellular survival. Cell. Microbiol.* 2009, 11:1579-1586.
  23. Jantsch J., Cheminay C., Charkravorty D. et al. Intracellular activities of Salmonella enterica in murine dendritic cells. *Cell. Microbiol.* 2003, 5: 933-945.
  24. Kaiser P., Diard M., Stecher B., Hardn W.D. The streptomycin-mouse model for Salmonella diarrhea: function analysis of microbiota, pathogens virulence factors, and the host's mucosal immune response. *Immunol. Rev.* 2012, 245: 56-83.
  25. Kato A., Groisman E.A. et al. Medical Institute the PhoQ/PhoP regulatory network of Salmonella enterica. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2008, 631: 7-21.
  26. Krueger A.L., Green S.A., Barzilay E.J. et al. Clinical outcomes of nalidixic acid, ceftriaxone, and multidrug-resistant nontyphoidal Salmonella infection compared with pansusceptible infections in Food Net sites, 2006-2008. *Foodborne Pathog. Dis.* 2014, 11: 335-341.
  27. Kupz A., Guarda G., Gerbhardt T. NLRC4 inflammasome in dendritic cells regulate noncognate effector function by memory CD8b T cells. *Nat. Immunol.* 2012,162: 162-169.
  28. Lei L., WangW., Xia C. et al. Salmonella virulence factors SsrAB regulated factor modulates inflammatory responses by enhancing the activation of NF- $\kappa$ B signaling pathway. *J. Immunol.* 2016, 15; 196 (2): 792-802.
  29. Li J., Lv C., Sun W. et al. Cytosporone B, an inhibitor of type III secretion system Of Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2013, 55: 2191-2198.
  30. Lucas R.L., Lostroh C.P., DiRusso C.C. et al. Multiple factors independently regulate hilA and invasion gene expression in Salmonella enterica serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* 2000, 182: 1872-1882.

31. Malik-Kale P., Jolly C.E., Lathrop S. et al. Salmonella at home in the host cell. *Front. Microbiol.* 2011, 2: 125.
32. Nguyen Q.C., Everest P., Tran T.K. A clinical microbiological, and pathological study of intestinal perforation associated with typhoid fever. *Clin. Infect. Dis.* 2004, 39: 61-67.
33. Oh Y.K., Alpuche-Aranda C., Bertiaume E. et al. Rapid and complete fusion of macrophage lysosomes with phagosomes containing Salmonella typhimurium. *Infect. Immun.* 1996, 64: 3877-3883.
34. Pham O.H., Mc Sorley S.J. Protective host immune response to Salmonella infection. *Future Microbiol.* 2015, 10: 101-110.
35. Resgino M., Urbano M., Valzasina B. et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Natn. Immunol.* 2001, 2 (4): 361-371.
36. Ryan R.M., Green J., Lewis C.E. Use of bacteria in anti-cancer therapies. *Bioessays.* 2006, 28: 84-94.
37. Rychlik I., Kakasova D., Sebkova A. Virulence potential of five major pathogenicity islands (SP-1) to SPI-5 of Salmonella enterica serovar Enteritidis for chickens. *BMC Microbiol.* 2009, 9: 268-270.
38. Sabbagh S.C., Forest C.G., Lepage C. et al. So similar yet different: unconvincing distinctive features in the genomes of Salmonella enterica serovar Typhimurium and Typhi. *FEMS Microbiol. Lett.* 2010, 305: 1-13.
39. Smith A.C., Curulis J.T., Casanova J.A. et al. Interaction of Salmonella-containing vacuoles with the endocytic recycling system. *J. Biol. Chem.* 2005, 280: 24634-24641.
40. Steele-Mortimer O. Salmonella-containing vacuole: moving with times. *Curr. Opin. Microbiol.* 2008, 11: 38-45.
41. Swart A.L., Hensel M. Interaction of Salmonella enterica with dendritic cells. *Virulence.* 2012 15; 3 (70): 660-667.
42. Thiennimir P., Winter S. et al. Intestinal inflammation allows Salmonella to use ethanolamine to compete with microbiota. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2011, 108: 17480-17485.
43. Tsou L.K., Lara-Tejero M., Figura R.J. et al. Antibacterial flavonoids from medicinal plants covalently type III protein secretion substrates. *Am. Chem. Soc.* 2016, 138: 2209-2218.
44. Van Engelenburg S.B., Palmer A.E. Quantification of real-time Salmonella effector type III secretion kinetics reveals differential secretion rates for SopE2 and SptP. *Chem. Biol.* 2008, 15 (6): 619-628.
45. Vazquez-Torres A., Xu Y., Jones-Carson J. et al. Salmonella pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase. *Science.* 2000, 287: 1655-1658.
46. Wall D.M., Nadeau W.J., Pazos M.A. et al. Identification of the Salmonella enterica serotype Typhimurium SipA domain responsible for inducing neutrophil recruitment across the intestinal epithelium. *Cell. Microbiol.* 2007, 9 (9): 2299-2313.
47. WHO. Antimicrobial resistance: Global report on Surveillance. Geneva: World Health Organization, 2014.
48. Wilson R.P., Raffatellu M., Chessa D. et al. The Vi capsule prevents Toll-receptor 4 recognition of Salmonella. *Cell. Microbiol.* 2008, 10: 876-890.

*Поступила 10.02.17*

Контактная информация: Бойченко М.Н.,  
119991, Москва. ул. Трубецкая, 8, стр. 2, р.т. (499)248-05-53

## **ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ В КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ ВНЕБОЛЬНИЧНЫХ ПНЕВМОНИЙ**

<sup>1</sup>НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, <sup>2</sup>Первый московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова, Москва

Внебольничная пневмония (ВП) была и остается одной из актуальных проблем здравоохранения в связи с сохраняющейся высокой заболеваемостью и смертностью. При анализе литературных данных выявляются схожие тенденции в характере иммунного ответа пациентов с ВП, а именно формирование иммунного ответа по гуморальному пути (Th2) с подавлением клеточного ответа (Th1), при этом недостаточность клеточного и гуморального механизмов иммунитета и дисбаланс цитокинового звена определяют тяжесть течения данного заболевания. Включение в традиционную терапию иммуномодулирующих препаратов позволяет усилить ответ на уже проводимое лечение. Одним из отечественных иммуномодуляторов является препарат азоксимера бромид (полиоксиданий), назначение которого помогает сократить продолжительность и тяжесть заболевания, а также снизить частоту развития затяжных форм заболевания. Также в последние годы среди иммуномодулирующих препаратов особый интерес вызывают иммуномодуляторы бактериального происхождения, на основе которых конструируются антибактериальные терапевтические вакцины. Среди отечественных препаратов указанной группы выделяется поликомпонентная вакцина Иммуновак ВП-4. За прошедшие годы клинико-иммунологический эффект действия Иммуновак ВП-4 исследован при разных патологиях и методах введения у взрослых и детей. Выявленные особенности действия Иммуновак ВП-4 подтверждают первичность нарушений иммунной системы, на фоне чего развивается та или иная патология, что является основанием для включения в базисную терапию заболеваний иммуномодулирующих препаратов.

Журн. микробиол., 2017, № 4, С. 101—111

**Ключевые слова:** внебольничная пневмония, полиоксиданий, антибактериальные терапевтические вакцины, Иммуновак ВП-4, иммуномодуляторы, цитокины, адаптивный иммунитет, врожденный иммунитет, патоген-ассоциированные микробные структуры

*Е.С.Коровкина<sup>1</sup>, М.П.Костинов<sup>1,2</sup>, С.В.Кажарова<sup>1</sup>*

## **POSSIBILITIES OF USE OF IMMUNE MODULATORS IN COMPLEX THERAPY OF COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIAS**

<sup>1</sup>Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, <sup>2</sup>Sechenov First Moscow State Medical University, Russia

Community-acquired pneumonia (CAP) has been one of the most pressing issues of healthcare due to high morbidity and mortality that are stable. Analysis of literature shows similar trends in the character of immune response of patients with CAP, precisely — formation of immune response via humoral route (Th2) with suppression of cell immune response (Th1), whereas lack of cellular and humoral mechanisms of immunity and dysbalanced cytokine portion determine severity of the infection course. Inclusion of immune modulators into traditional therapy allows to enhance the response to the therapy already being administered. One of the national immune modulators is azoximer bromide (polyoxidonium), its administration allows to reduce the length and severity of the disease, as well as reduce the frequency of development of prolonged forms. Also, immune modulators of bacterial origin have received special interest as of late, and antibacterial therapeutic vaccines are being constructed based on them. Immunovac VP-4 polycomponent vaccine is distinguishable among the national preparations. Clinical-immunological effect of the vaccine has been studied in recent years on different pathologies and methods of administration in adults and

children. Features of Immunovac VP-4 effect confirm the primary character of alterations in the immune system, that is the background of a certain pathology and is the reason for inclusion of immune modulating preparations into basic therapy of the diseases.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 4, P. 101—111

Key words: community-acquired pneumonia, polyoxidonium, antibacterial therapeutic vaccines, Immunovac VP-4, immune modulators, cytokines, adaptive immunity, innate immunity, pathogen-associated microbial structures

Внебольничная пневмония (ВП) была и остается одной из актуальных проблем здравоохранения в связи с сохраняющейся высокой заболеваемостью и смертностью. В последние годы обращает на себя внимание возрастание количества больных с тяжелым и осложненным течением внебольничной пневмонии [9, 42]. Одной из главных причин тяжелого течения пневмонии является недооценка тяжести состояния пациента при поступлении в стационар, обусловленная скудной клинико-лабораторной и рентгенологической картиной в начальный период развития заболевания. В 14 — 40% случаев воспалительные заболевания легких на ранних этапах остаются нераспознанными и лишь у 14% больных ВП правильный диагноз устанавливается в первые трое суток заболевания, и назначается терапия, соответствующая клинической картине. От всех случаев заболевания пневмонией затяжные ее формы составляют от 12 до 40% [29]. Факторами риска неблагоприятного и затяжного течения ВП являются возраст пациентов, наличие сопутствующих заболеваний, обширность поражения легочной ткани, этиологическая характеристика возбудителя и различные нарушения в работе иммунной системы, особенно в случае имеющих генетически обусловленных дефектов [30]. К числу наиболее актуальных типичных бактериальных возбудителей пневмоний относятся *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*. Кроме того, при внебольничных пневмониях возможно выявление коинфекции более чем 2 возбудителями, которая может быть вызвана как ассоциацией различных бактериальных возбудителей, так и их сочетанием с респираторными вирусами, что приводит к более тяжелому течению и худшему прогнозу [18, 36, 41]. Необходимо отметить, что частота встречаемости различных возбудителей тяжелой ВП может существенно варьировать в зависимости от географической локализации, времени года и состояния иммунной системы пациентов.

Глобализация приводит к возникновению и распространению новых инфекций, которые не отвечают на традиционную терапию, в частности, это касается участия в развитии заболевания представителей условно патогенной микрофлоры. Кроме того, в настоящее время активно изучается природа формирования резистентности к антибактериальным препаратам у бактериальных патогенов, поскольку этот процесс неоднозначен и оказывает разное влияние на исход воспалительного процесса при ВП [29].

Современные принципы терапии внебольничной пневмонии предполагают комплексный подход. В соответствии с научными рекомендациями, основным методом лечения ВП является антибактериальная терапия, улучшающая прогноз, снижающая летальность и уменьшающая длительность стационарного лечения [31, 38]. Несмотря на это, наблюдаются значительные

трудности в лечении затяжных форм ВП, которые в значительной части случаев развиваются на фоне сниженной иммунологической реактивности организма, а при отсутствии адекватного лечения имеют тенденцию к утяжелению и хронизации. Вместе с тем, характер нарушений в системе иммунного ответа на отдельных этапах воспалительного процесса остается недостаточно изученным и трактуется неоднозначно. Развитие пневмонии происходит на фоне нарушения Т- и В-клеточного звеньев иммунитета, изменения продукции цитокинов, нарушения активности фагоцитирующих клеток и т.д. Эти нарушения способствуют усилению воспалительного процесса в легких, тем самым снижая эффективность проводимой терапии [20]. Несмотря на многолетний опыт изучения иммунологических аспектов патогенеза пневмоний, на сегодняшний день не существует достаточного числа доказательных исследований, посвященных оценке эффективности и безопасности проводимых методов иммуотропной терапии. В этой связи, является актуальным дальнейшее изучение этиопатогенетических аспектов заболевания и выявление различных дефектов иммунной системы, которые и приводят к тяжелому и осложненному течению внебольничной пневмонии.

#### **Иммунологические особенности больных с внебольничными пневмониями.**

Развитие иммунного ответа на инфекционный агент включает комплексное взаимодействие клеток и молекул врожденной и адаптивной иммунных систем. Первичная локализация инфекционного процесса определяется путем иммунизации. В подавляющем большинстве случаев инфекционный агент попадает в организм через слизистые оболочки желудочно-кишечного тракта, дыхательной и мочеполовой систем, в связи с чем, ранние иммунологические события связаны с иммунной системой слизистых оболочек. Дальнейшие инфекционные процессы ограничиваются органами, куда поступил патоген. В тех случаях, когда инфекционный агент находится во внеклеточном пространстве и не ограничен специфическим клеточными взаимоотношениями, он приобретает способность к распространению.

Известно, что основными функциями врожденного иммунитета являются идентификация чужеродных структур и их уничтожение при помощи фагоцитоза или эндогенно синтезируемых антибактериальных пептидов. Если это не приводит к элиминации патогена, то врожденные механизмы защиты подготавливают чужеродные клетки к взаимодействию с Т-лимфоцитами для последующего развития адаптивного иммунного ответа. Стоит вспомнить, что важнейшей особенностью инфекционных агентов (бактерий и вирусов) является их способность к размножению. Значительное число возбудителей делятся, находясь во внеклеточном пространстве, другие возбудители, к которым относятся микоплазмы, микобактерии и др., нуждаются для размножения в пребывании внутри клетки хозяина. Локализация инфекционных агентов внутри или вне клетки является ключевым фактором для определения типа иммунного ответа организма. При внеклеточной локализации микроорганизма эффекторные механизмы иммунной системы взаимодействуют непосредственно с микроорганизмом, в результате чего, как правило, развивается Th2-зависимый иммунный ответ. В случае локализации микроорганизма внутри клетки развивается преимущественно Th1-зависимый клеточный иммунный ответ, приводящий к гибели клетки вместе с инфекционным агентом [32].

Основной функцией врожденных механизмов защиты является распозна-

вание сходных фрагментов молекул, присутствующих у различных патогенов. Ключевыми эффекторами врожденного иммунитета являются дендритные клетки и естественные киллеры (НК). В настоящее время дендритные клетки рассматривают как связующее звено между врожденным и адаптивным иммунитетом. Реализация их функций осуществляется за счет захвата, процессинга антигенов и представления процессированных антигенных пептидов в контексте молекул главного комплекса гистосовместимости Т-лимфоцитам. При этом в зависимости от природы антигена, его количества и других факторов поляризация иммунного ответа может быть направлена по Th1- или Th2-пути [5].

Как уже было сказано, в этиопатогенезе ВП важная роль отводится ассоциированной вирусно-бактериальной инфекции. Более того, в ряде работ было показано, что для затяжного и нетипичного течения ВП характерна ассоциация бактериальных возбудителей с вирусами семейства *Herpesviridae* и/или с микоплазмами и хламидиями [16, 34]. Элиминация этих микроорганизмов обеспечивается скоординированной работой клеток и рецепторов врожденного и адаптивного иммунитета. Основную роль в развитии и течении заболеваний дыхательной системы играют нарушения местного звена иммунной системы, защищающего респираторный тракт от воздействия неблагоприятных факторов внешней среды и обеспечивающего санацию бронхолегочной ткани. Органы иммунной системы распределены в организме таким образом, что наибольшее количество иммунокомпетентных клеток располагается в местах, контактирующих с внешней средой и являющихся анатомическими входными воротами для инфекции. Совокупность лимфоидной ткани, расположенной в слизистых оболочках, обозначается термином MALT (mucosal-associated lymphoid tissue). MALT представляет собой субэпителиальные скопления лимфоидной ткани, не ограниченные капсулой. Среди них наибольшее значение имеет бронхо-ассоциированная лимфоидная ткань (БАЛТ), являющаяся первым звеном защиты от проникновения патогенов. В норме иммунные механизмы бронхоальвеолярного дерева представлены как неспецифическими факторами защиты, так и специфическим звеном иммунной системы. К гуморальному звену местной защиты относятся иммуноглобулины классов G, A, M. Еще одним фактором неспецифической защиты является система комплемента. Особое значение отводится C3-компоненту комплемента, при нарушении активности которого наблюдаются частые инфекционные осложнения. Также к неспецифическим факторам защиты относятся лизоцим, лактоферрин, фибронектин, интерферон, ингибиторы протеаз. Клеточное звено местной защиты включает альвеолярные макрофаги, нейтрофильные и эозинофильные гранулоциты. Специфическое звено иммунной системы представлено Т ( $\gamma$  и  $\delta$ ) и В-лимфоцитами [17].

При анализе литературных данных выявляются схожие тенденции в характере иммунного ответа пациентов с ВП. По данным Мавзютовой Г.А. и др. в характере иммунного ответа больных с ВП отмечаются особенности реактивности, определяющие степень тяжести заболевания. В начале и разгаре пневмонии выявляется относительная лимфопения, более выраженная при тяжелом течении болезни, что свидетельствует о недостаточном реагировании клеток лимфоцитарного звена [20]. Так, у пациентов с легким и среднетяжелым течением отмечено увеличение числа зрелых Т-лимфоцитов (CD3+), цитотоксических (CD8+) и натуральных киллерных клеток (CD56+). Напротив,

тяжелое течение ВП сопровождается снижением числа зрелых Т-лимфоцитов (CD3+), Т-хелперов (CD4+), индекса CD4/CD8 при одновременном снижении уровня В-лимфоцитов (CD19+) на фоне повышения числа натуральных киллерных клеток (CD56+). Подобные изменения в группе пациентов с тяжелой формой ВП являются характерными для системных воспалительных процессов, но в то же время, могут свидетельствовать о неадекватности иммунного ответа [21, 35, 40]. Наибольший интерес представляют результаты проведенных исследований системы сывороточных цитокинов. Согласно данным той же группы авторов, у больных с легким и очаговым течением заболевания отмечалась равноценная активация оппозиционных пулов цитокинов в начале заболевания (IL-2, 4, 6, 8, TNF $\alpha$ ) с повышением IL-2, 4 и снижением содержания IL-6, 8 и TNF $\alpha$  в динамике. Напротив, тяжелое течение и долевое поражение легочной ткани сопровождалось дисбалансом цитокинового звена в виде увеличения содержания IL-6, IL-8, TNF $\alpha$  и снижения IL-2, IL-4 (в сравнении с показателями больных с легким течением). Учитывая важнейшую регуляторную роль лимфокинов IL-2, IL-4 (синтезируемых соответственно Th1, Th2 лимфоцитами), можно предположить недостаточную межклеточную активацию специфических факторов клеточного звена иммунитета у больных с тяжелым течением, приводящую к усугублению инфекционного процесса. Ведущим цитокином, регулирующим функции фагоцитов, является IL-8, который выступает в роли хемотактического фактора, способствующего активации нейтрофилов. По данным Мавзютовой Г.А. и др., содержание IL-8 в сыворотке крови прямо зависит от объема поражения легочной ткани. У пациентов с адекватным ответом на проводимую терапию определялось повышение содержания IL-8, что характерно для системных воспалительных процессов, в то время, как в группе пациентов с затяжной пневмонией определялись пониженные значения IL-8. Показатели основных классов иммуноглобулинов в начальном периоде ВП также характеризовались более низкими значениями, что позволяет предположить наличие иммунокомплексного и аутоиммунного компонентов в патогенезе осложненного течения пневмоний [1, 20, 21]. Недостаточность клеточного и гуморального механизмов иммунитета и дисбаланс цитокинового звена у больных внебольничной пневмонией определяет тяжесть течения данного заболевания. Это обосновывает необходимость дальнейшей разработки патогенетической, в том числе, и иммунокорректирующей терапии при тяжелом течении заболевания [23].

**Иммуномодуляторы.** Иммунопрофилактика при воспалительных заболеваниях бронхолегочной системы имеет два стратегических направления. Во-первых, вакцинация против респираторных инфекций, что является важным компонентом профилактики обострений и вторичных осложнений у больных с данной патологией. С этой целью применяют вакцины против пневмококковой инфекции, гриппа, гемофильной инфекции типа b [25, 27].

На сегодняшний день в арсенале практикующего врача имеется достаточное количество иммуностропных препаратов, каждый из которых обладает собственным иммуномодулирующим действием на различные звенья иммунной системы. При грамотном назначении иммуномодуляторы позволяют значительно повысить эффективность терапии, особенно при недостаточном ответе на проводимое лечение. Отдельно следует обратить внимание на то, что иммуномодуляторы не оказывают непосредственного воздействия на инфек-

ционный фактор. У препаратов группы иммуномодуляторов есть четко определенные показания к применению, которые необходимо соблюдать. К ним относятся: повышение эффективности этиотропной противомикробной терапии и предупреждение развития инфекционных осложнений у лиц из групп риска; увеличение длительности ремиссии и снижения частоты обострений при хронических рецидивирующих инфекционно-воспалительных заболеваниях [10, 14]. Согласно литературным данным лишь незначительное число препаратов указанной группы прошли необходимые лабораторные и клинические исследования, подтверждающие их эффективность и безопасность. При анализе литературных источников становится понятным, что сведения об эффективности иммуномодуляторов являются крайне противоречивыми.

Одним из отечественных иммуномодуляторов является оригинальная молекула азоксимера бромид (полиоксидоний). Азоксимер бромид относится к высокомолекулярным химически чистым иммуномодуляторам, чья активность обусловлена его прямым воздействием на фагоцитирующие клетки, NK-клетки, за счет чего препарат способен опосредованно стимулировать антителообразование. Антиоксидантные свойства азоксимера бромида связаны с его способностью к перехвату в водной среде активных форм кислорода, супероксидного аниона, перекиси водорода, гидроксильного радикала, к уменьшению концентрации каталитически активного двухвалентного железа, ингибированию перекисного окисления липидов, к подавлению спонтанной и индуцированной хемилюминесценции. Мембранопротекторные свойства препарата защищают клетки от повреждающего воздействия ряда токсических веществ. В настоящее время накоплен большой клинический опыт применения полиоксидония в комплексной терапии ряда тяжелых хронических инфекционно-воспалительных процессов (внебольничных пневмоний, туберкулеза, хронического лимфолейкоза, гепатитов, псориаза) [2, 23]. Во всех случаях установлен высокий клинический эффект, проявляющийся в снижении числа и тяжести рецидивов, уменьшении объема принимаемых лекарственных средств, уменьшении времени пребывания на стационарном лечении. Таким образом, использование полиоксидония в острый период болезни должно проводиться одновременно с назначением антибактериальной терапии, в то время, как на реабилитационном этапе возможно его использование в качестве монотерапии.

Хотя на практике имеет место применение и других иммуномодуляторов, в доступной литературе нам не удалось найти данных по клиническому использованию препаратов данной группы при ВП. На сегодняшний день не существует четких показаний и рекомендаций к применению, в частности, азоксимера бромида при тяжелых и затяжных формах ВП, а также использование его в качестве профилактического средства в группе больных после перенесенной внебольничной пневмонии. Сказанное определяет необходимость дальнейшего изучения иммунопатологических изменений, развивающихся при ВП различной степени тяжести, а также определение места химически чистых иммуномодуляторов, к которым относится полиоксидоний, в терапии и иммунореабилитации данного заболевания.

**Антибактериальные терапевтические вакцины.** Как уже было сказано выше, роль условно патогенной микрофлоры в патологии человека постоянно возрастает. Это определяется и существенным ростом числа заболеваний, при

которых ее значимость уже была показана (внутрибольничные инфекции и пр.), а также с установлением в настоящее время ее роли в развитии патологии, ассоциированной с инфекцией (аллергические заболевания, ряд онкологических заболеваний и др.) [6, 8]. Полиэтиологичность заболеваний, вызванных представителями условно патогенной микрофлоры, значительно затрудняет возможность создания средств специфической вакцинации против отдельных возбудителей — пневмококковой инфекции, гемофильной инфекции типа b, гриппа. Также в большинстве случаев отсутствует возможность немедленной идентификации этиологического фактора, в частности, проведения дифференциальной диагностики между бактериальным и вирусным поражением верхних дыхательных путей. Все это обосновывает необходимость внесения корректив в традиционные схемы терапии, что привело к разработке новых средств вакцинотерапии [24, 26].

Для объяснения механизмов действия врожденного иммунитета сформулирована стратегия распознавания микроорганизмов на основе наличия у них общих патоген-ассоциированных молекулярных структур (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) при участии рецепторов клеток эффекторов врожденного иммунитета [4, 5]. Наиболее изученными PAMPs являются липополисахариды бактериальной стенки, липопротеины, гликолипиды, флагеллин, липотейхоевые кислоты, маннаны, зимозан грибов, ДНК и РНК бактерий и вирусов [39], [Sun J. et al., 2016], а также молекулярные структуры растений, экстракты домашней пыли, никель и различные эндогенные соединения, высвобождающиеся при повреждении клеток (так называемые молекулярные паттерны, связанные с повреждением — damage associated molecular patterns, DAMPs — белки теплового шока, фибронектин, дефензины, фибриноген и другие вещества) [15]. Распознавание PAMPs осуществляется с помощью патоген-распознающих рецепторов (pattern recognition receptors, PRRs). У человека среди представителей PRRs выделяют Toll-подобные рецепторы (TLRs), NOD-подобные рецепторы (NOD — like receptors, NLRs), RIG — I-подобные рецепторы (retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like receptors) и C-тип лектиновые рецепторы (CLRs) [37].

Поскольку PAMPs бактерий, вирусов и грибов являются мощными активаторами врожденного иммунного ответа, очевидно, что на их основе возможно создание высокоэффективных иммунотропных лекарственных препаратов. По направленности препараты этого ряда могут быть двух типов: агонисты TLRs — иммуностимулирующие препараты для лечения различных видов иммунодефицитов и антагонисты TLRs — иммуносупрессанты для терапии хронических иммуновоспалительных заболеваний. В настоящее время работы по созданию таких препаратов активно ведутся за рубежом. Например, минимальные биологически активные фрагменты, выделенные из бактериальной ДНК — CpG олигонуклеотиды (агонисты TLR9) или из ЛПС — монофосфорил-липид А (агонист TLR4) уже используются в качестве адьювантов, включаемых в состав вакцин с целью усиления их иммуногенных свойств. Синтетические агонисты TLR7/8 (квимоды) имеют длительную историю применения в качестве противовирусных лекарственных препаратов. Новая генерация синтетических агонистов TLR7/TLR8 (R-848 и 3M-002) демонстрирует мощные иммуностимулирующие свойства: инициируют продукцию цитокинов типа Th1 (ФНО $\alpha$ , IL-12) на достаточно высоком уровне [22].

В последние годы среди иммуномодулирующих препаратов особый интерес вызывают иммуномодуляторы бактериального происхождения, на основе которых конструируются так называемые терапевтические вакцины, обладающие наряду с неспецифическим действием способностью стимулировать антигенспецифический ответ [33]. Одним из таких препаратов является поликомпонентная вакцина отечественного производства Иммуовак ВП-4. Этот препарат является активатором системы врожденного иммунитета за счет наличия в своем составе патоген-ассоциированных молекулярных структур (PAMPs), являющихся основными лигандами для Толл-подобных рецепторов, расположенных на клетках-эффекторах врожденного иммунитета [4, 7].

За прошедшие годы клинико-иммунологический эффект действия Иммуовак ВП-4 исследован при разных методах введения у взрослых и детей. Иммуотерапию проводили при аллергических заболеваниях (бронхиальная астма, атопический дерматит, латексная аллергия), при гнойно-воспалительных заболеваниях органов дыхания (хронический бронхит, абсцесс легких, внебольничной пневмонии), герпесвирусной инфекции, пиодермиях и др., что позволяло модифицировать течение заболевания с тяжелых форм в более легкие [3, 11 — 13, 19, 28]. Полученные в клинике данные подтверждаются экспериментальными исследованиями, в которых на молекулярно-клеточном уровне выявлен механизм действия иммуномодуляторов микробного происхождения. В частности, было показано, что вакцина является мощным индуктором созревания дендритных клеток, что проявляется экспрессией маркера терминальной дифференцировки (CD83), костимуляторных молекул (CD40, CD80, CD86), молекул антигенного представления (МНС I и МНС II), синтезом цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12, TNF $\alpha$ ) и усилением способности дендритных клеток предъявлять антигены (бактериальные, опухолевые) Т-лимфоцитам. В этих же исследованиях *in vivo* при однократной иммунизации мышей также установлено, что Иммуовак ВП-4 вызывает продукцию цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12 и IFN $\gamma$ ), усиливает пролиферативную и цитотоксическую активность НК-клеток [2, 5]. Такой механизм действия обеспечивает высокую протективную активность Иммуовак ВП-4 в отношении различных этиологически значимых представителей условно патогенной микрофлоры. Активированные Иммуовак ВП-4 дендритные клетки синтезируют IL-12, который является ведущим цитокином, программирующим дифференцировку Т-лимфоцитов по Th1-пути. Важную роль в реализации защиты от различных патогенов играют и другие цитокины, уровень которых существенно повышался при иммунизации Иммуовак ВП-4. Выявленные особенности действия Иммуовак ВП-4 подтверждают первичность нарушений иммунной системы в этиопатогенезе заболеваний, вызываемых условно патогенной микрофлорой, и значительную их роль при аллергопатологии [12, 13, 19]. Этим и объясняется положительный клинический эффект, достигаемый с помощью микробных антигенов. Выявленные закономерности не исключают возможности первичного нарушения функции иммунной системы вирусными или другими инфекциями, на фоне чего развивается та или иная патология.

Таким образом, данные, полученные в ходе проведенных исследований, свидетельствуют о необходимости использования иммуотерапии при заболеваниях, вызываемых условно патогенной микрофлорой. Предпочтение при этом имеют природные или синтетические иммуномодуляторы микробного

происхождения с широким спектром действия на систему врожденного и адаптивного иммунитета.

ВП является многофакторным заболеванием. Естественное течение заболевания может зависеть как от патогенных свойств микроорганизмов (бактерий и вирусов), так и от изменений в характере иммунного реагирования. На сегодняшний день имеются эффективные пути специфической профилактики инвазивных пневмококковых инфекций (включая воспаление легких соответствующей этиологии) у взрослых и детей. Иммуномодулирующая терапия, назначенная по строго конкретным показаниям, позволит не только добиться контроля над симптомами заболевания, но и значительно сократить частоту и длительность обострений, увеличить период ремиссии и снизить потребность в антибактериальной терапии. Важнейшими медикаментозными средствами управления системой врожденного иммунитета, активность функционирования которой определяет вероятность инфицирования и течение заболевания, являются иммуномодуляторы микробного происхождения: антибактериальные терапевтические вакцины и их синтетические аналоги. Результаты экспериментальных исследований подтверждают концепцию, в основе которой лежит представление о способности бактериальных компонентов модулировать активность ответной реакции макроорганизма на воздействие различных патогенов. Следует обратить внимание на то, что препараты указанной группы не обладают самостоятельной антибактериальной и противовирусной активности, недопустимо их бесконтрольное и необдуманное назначение. Именно поэтому использование иммуномодулирующих препаратов в качестве дополнения к базисной терапии является необходимым и требует дальнейшего изучения с целью разработки оптимальных схем иммунотерапии и иммунореабилитации пациентов с воспалительными заболеваниями бронхолегочной системы, в частности, при внебольничных пневмониях.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Азнабаева Л.Ф., Никуличева В.И., Козырева Л.С. Иммунологические особенности у больных с тяжелой формой внебольничной пневмонии и их прогностическая значимость. *Современные наукоемкие технологии*. 2010, 2: 71-73.
2. Аллергология и иммунология. Национальное руководство. Хаитов Р.М., Ильина Н.И. (ред.). М., 2014.
3. Афиногенова В.П., Лукачев И.В., Костинов М.П. Иммуноterapia: механизм действия и клиническое применение иммунокорректирующих препаратов. *Лечащий врач*. 2010, 4: 9.
4. Ахматов Э.А., Уткина Н.П., Ильиных Е.А., Сорокина Е.А., Маракасова Е.С., Курбатова Е.А., Лебединская О.В., Ахматова Н.К. Влияние разных способов аппликации бактериальных лигандов на экспрессию цитокинов. *Журн. микробиол.* 2014, 1: 24-30.
5. Ахматова Н.К., Киселевский М.В. Врожденный иммунитет противоопухолевый и противоиnфекционный. М., Практическая медицина, 2008.
6. Данилов Л.А., Абабий И.И., Манюк М.К., Абабий П.И., Уцка И.Ю. Значение микробной флоры ротоглотки в развитии острых и хронических заболеваний верхних дыхательных путей. *Оториноларингология Восточная Европа*. 2014, 1 (14): 121-130.
7. Егорова Н.Б., Курбатова Е.А. Иммунотерапевтическая концепция использования микробных антигенов при атопии и патологии, ассоциированной с условно-патогенной микрофлорой (на примере поликомпонентной вакцины Иммуновак ВП-4). *Медицинская иммунология*. 2008, 1: 13-20.
8. Зверев В.В., Хаитов Р.М. (ред.). Вакцины и вакцинация. Национальное руководство. Краткое издание. М., ГЭОТАР-Медиа, 2014.

9. Иванова Е.В., Биличенко Т.Н., Чучалин А.Г. Заболеваемость и смертность населения трудоспособного возраста России по причине болезни органов дыхания в 2010-2012 г. Пульмонология. 2015, 3: 291-297.
10. Иммунобиологические препараты. Клинико-иммунобиологическая эффективность. Справочник. Под ред. Костинова М.П., Озерецковского Н.А. М., 2004.
11. Иммунокоррекция вакцинального процесса у лиц с нарушенным состоянием здоровья. Под ред. Костинова М.П. М., 2006.
12. Иммунокоррекция в педиатрии. Практическое руководство для врачей. Под ред. Костинова М.П. М., 1997.
13. Иммунокоррекция в педиатрии. Практическое руководство для врачей (издание 2-е, дополненное). Под редакцией Костинова М.П. М., 2001.
14. Иммуноterapia. Руководство для врачей. Под ред. Хаитова Р.М., Атауллаханова Р.И. М., ГЭОТАР-Медиа, 2011.
15. Катунина О.Р. Функции Toll-подобных рецепторов как компонента врожденного иммунитета и их участие в патогенезе дерматозов различной этиологии. Вестник дерматологии и венерологии. 2011, 2: 18-25.
16. Козырева Л.С., Никуличева В.И., Азнабаева Л.Ф., Веревкина Т.И. Спектр оппортунистических инфекций и их прогностическая значимость при внебольничной пневмонии. Вестник Башкирского государственного медицинского университета. 2013, 4: 213-219.
17. Коровкина Е.С., Кажарова С.В. Роль Toll-подобных рецепторов в патогенезе воспалительных заболеваний бронхолегочной системы. Инфекция и иммунитет. 2016, 6 (2): 109-116.
18. Костинов М.П., Чучалин А.Г., Коровкина Е.С. Инновационная вакцина против пневмококковой инфекции в профилактике обострений хронических заболеваний у взрослых. Здравоохранение Российской Федерации. 2015, 59 (5): 49-53.
19. Лизогуб Н.В., Осипова Г.Л., Оспельникова Т.П., Гервасиева В.Б. Влияние поликомпонентной вакцины Иммуновак ВП-4 на систему врожденного иммунитета у больных atopической бронхиальной астмой. Пульмонология. 2006, 4: 53-57.
20. Мавзютова Г.А., Фазлыева Р.М., Тюрина Е.Б., Хайруллина Р.М., Бикметова Н.Р. Особенности иммунных нарушений при внебольничных пневмониях. Медицинская иммунология. 2007, 9 (6): 605-612.
21. Маркелова Е.В., Гельцер Б.И., Корвяченкова И.В., Костюшко А.В. Состояние системы цитокинов при нозокомиальных пневмониях. Цитокины и воспаление. 2003, 2 (1): 14-19.
22. Маркушин С.Г. Особенности врожденного иммунитета при вирусных инфекциях. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2012, 1 (62): 72-81.
23. Мухамадиева Л.Р., Мавзютова Г.А., Фазлыева Р.М., Бикметова Н.Р. Клинико-иммунологическая эффективность иммунофана и полиоксидония в комплексной терапии внебольничной пневмонии. Медицинская иммунология. 2009, 1: 57-62.
24. Новое в клинике, диагностике и вакцинопрофилактике управляемых инфекций. Справочник. Под ред. Костинова М.П. М., Медицина, 1997.
25. Применение вакцин «Пневмо-23» и «Акт-хив» в комплексе лечебно-профилактических мероприятий при хронических воспалительных заболеваниях легких у детей. Пособие для врачей. Под ред. Костинова М.П. М., 2004.
26. Расширение комплекса лечебно-профилактических мероприятий при бронхиальной астме у детей с применением вакцин «Пневмо-23» и «Акт-хив». Пособие для врачей. Под ред. Костинова М.П. М., Медицина для всех, 2004.
27. Руководство по клинической иммунологии в респираторной медицине. Под ред. Костинова М.П., Чучалина А.Г. М., АТМО, 2016.
28. Татевосов В.Р., Шубин И.В., Костинов М.П., Чучалин А.Г. Оценка результатов вакцинации в комплексном лечении внебольничной пневмонии у лиц молодого возраста в организованных коллективах. Медицинский вестник МВД. 2013, 6 (67): 60-63.
29. Чучалин А.Г. Затяжная пневмония. Пульмонология. 2014, 3: 5-14.
30. Чучалин А.Г. Пневмония: актуальная проблема медицины XXI века. Пульмонология. 2015, 2: 133-142.

31. Чучалин А.Г., Синопальников А.И., Козлов Р.С., Авдеев С.Н., Тюрин И.Е., Руднов В.А., Рачина С.А., Фесенко О.В. Российское респираторное общество (РРО) Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ). Клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике тяжелой внебольничной пневмонии у взрослых. Пульмонология. 2014, 4: 13-48.
32. Ярилин А.А. Иммунология: учебник. М., ГЭОТАР-Медиа, 2010.
33. Braido F., Melioli G., Cazzola M. et al. AIACE Study Group. Sub-lingual administration of a polyvalent mechanical bacterial lysate (PMBL) in patients with moderate, severe, or very severe chronic obstructive pulmonary disease (COPD) according to the GOLD spirometric classification: A multicentre, double-blind, randomised, controlled, phase IV study (AIACE study: Advanced Immunological Approach in COPD Exacerbation). *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2015, 33: 75-80. doi: 10.1016/j.pupt.2015.03.006. Epub 2015 May 5.
34. Dumke R., Jacobs E. Antibody response to *Mycoplasma pneumoniae*: protection of host and influence on outbreaks? *Front Microbiol.* 2016, 26; 7: 39. doi: 10.3389/fmicb.2016.00039. eCollection 2016.
35. He Z., Zhao C., Dong Q. et al. Effects of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus infection on peripheral blood lymphocytes and their subsets. *Int. J. Infect. Dis.* 2005, 9 (6): 323-330. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2004.07.014>. Epub. 2005 Aug 10.
36. Ishiguro T., Takayanagi N., Yamaguchi Sh. et al. Etiology and factors contributing to the severity and mortality of community-acquired pneumonia. *Internal. Medicin.* 2013, 52 (3): 317-324. <http://dx.doi.org/10.2169/internalmedicine.52.8830>.
37. Kumar H., Kawai T., Akira S. Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochemical J.*, 2009; 420(1):1-16.
38. Lim W.S., Smith D.L., Wise M.P. et al. British Thoracic Society. British Thoracic Society community acquired pneumonia guideline and the NICE pneumonia guideline: how they fit together. *Thorax.* 2015, 70 (7): 698-700. doi: 10.1136/thoraxjnl-2015-206881. Epub. 2015 May 14.
39. Lundberg K., Rydnert F., Greiff L. et al. Human blood dendritic cell subsets exhibit discriminative pattern recognition receptor profiles. *Immunology*, 2014, 142 (2): 279-288.
40. Rendon A., Rendon-Ramirez E.J., Rosas-Tarailles. *Immunology, 20rr. Infect. Dis. Rep.* 2016, 18 (3): 10. doi: 10.1007/s11908-016-0516-y.
41. Rynda-Apple A., Robinson K.M., Alcorn J.F. Influenza and bacterial superinfection: illuminating the immunologic mechanisms of disease. *Infect. Immun.* 2015, 83 (10): 3764-70. doi: 10.1128/IAI.00298-15. Epub. 2015 Jul 27.
42. WHO Media Center 2014. The top 10 causes of death. URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>.

*Поступила 28.12.16*

Контактная информация: Коровкина Елена Сергеевна, к.м.н.,  
105064, Москва, М.Казенный пер., 5а, р.т. (495)917-49-00

## **ЛИЦЕНЗИРОВАННЫЕ СИБИРЕЯЗВЕННЫЕ ВАКЦИНЫ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА СТАДИИ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Высокая патогенность возбудителя сибирской язвы в сочетании с уникальной устойчивостью спорных форм к воздействию факторов внешней среды ставят его в разряд крайне опасных биологических агентов. Зарегистрированные и успешно применяемые сибиреязвенные вакцины внесли неоценимый вклад в улучшение эпидемиологической ситуации в мире. Тем не менее, пренебрежение к мерам специфической профилактики может привести к драматическому развитию событий и потребовать проведения масштабных мероприятий по ликвидации последствий. Усилия по разработке вакцин нового поколения направлены на увеличение безопасности, уменьшение кратности введения и совершенствованию технологии производства. В обзоре представлены основные сведения о лицензированных сибиреязвенных вакцинах, предназначенных для медицинского применения на территории Российской Федерации и за рубежом. Среди многочисленных экспериментальных разработок внимание уделено перспективным препаратам, производимым различными биофармацевтическими компаниями в соответствии со стандартами GMP и проходившим в 2016 г. различные фазы клинических исследований.

Журн. микробиол., 2017, № 4, С. 112—126

Ключевые слова: *Bacillus anthracis*, сибирская язва, сибиреязвенные вакцины, лицензированные вакцины, клинические исследования

*N.I.Mikshish, P.Yu.Popova, A.P.Semakova, V.V.Kutyrev*

## **LICENSED ANTHRAX VACCINES AND EXPERIMENTAL PREPARATIONS AT THE STAGE OF CLINICAL TRIALS**

Russian Research for Plague Control Institute «Microb», Saratov, Russia

High pathogenicity of anthrax agent combined with unique insensitivity of its spore forms to environmental stresses class it among extremely dangerous biological agents. Registered and effectively used anthrax vaccines made invaluable contribution to the improvement of epidemiological situation around the world. Nevertheless, neglect of non-specific prophylaxis may result in dramatic scenarios and require large-scale measures on rectification of the consequences. Efforts on the development of next-generation vaccines are aimed at safety build-up, decrease in frequency of administration, and enhancement of manufacturing technologies. The review contains the key information on licensed anthrax vaccines designed for medical use, both in the territory of the Russian Federation and abroad. Among multiple experimental developments emphasized have been preparations manufactured by various bio-pharmaceutical companies in compliance with GMP standards, at different phases of clinical trials in 2016.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 4, P. 112—126

Key words: *Bacillus anthracis*, anthrax, anthrax vaccine, licensed vaccine, clinical trials

Современный ареал сибирской язвы сельскохозяйственных и диких животных охватывает почти все континенты. Причиной заболевания людей традиционно является контакт с заболевшим животным в процессе ухода за больным животным, вынужденного убоя и разделки туши. Один из факторов риска — широкое распространение стационарно неблагополучных по сибир-

ской язве пунктов. Не исключена вероятность возникновения чрезвычайных ситуаций в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения при совершении биотеррористических актов [28], при ввозе в страну инфицированных спорами сибиреязвенного микроба продуктов или сырья. Ежегодно в Российской Федерации регистрируют от 1 до 20 случаев заболеваний людей сибирской язвой [14]. В 2016 г. в Ямало-Ненецком автономном округе возник очаг сибирской язвы, сформировавшийся на фоне крупной эпизоотии среди оленей. Особенности природно-климатических условий лета 2016 года в сочетании с тактическими просчетами в анализе риска развития эпизоотической ситуации привели к быстрому распространению инфекции (пало более 2500 оленей) и осложнению эпидемической обстановки. Для ликвидации последствий потребовались масштабные и дорогостоящие мероприятия [22]. В рамках проводимых мероприятий химиофилактикой были охвачены 946 человек, привиты против сибирской язвы более 13 тысяч человек.

Проведение противосибиреязвенной вакцинации декретированного контингента позволяет значительно снизить риск возникновения и распространения особо опасной инфекционной болезни. Специфическая профилактика сибирской язвы на территории Российской Федерации осуществляется в соответствии с Национальным календарем прививок по эпидемическим показаниям. Для этого используется живая вакцина на основе аттенуированного штамма *Bacillus anthracis* СТИ-1 [16]. Живую сибиреязвенную вакцину на основе штамма *B. anthracis* A16R применяют в Китае. В США и Великобритании лицензированы химические вакцины — AVA и AVP соответственно [30]. Плановая вакцинация живой или химическими вакцинами показана персоналу лабораторий, работающих с возбудителем сибирской язвы, а также специальному контингенту, риск инфицирования которого можно оценить. В стационарно-неблагополучных районах она проводится работникам ветеринарной службы и лицам групп риска, контактирующим с продуктами животноводства.

*Вакцина сибиреязвенная живая сухая СТИ-1.* Основу живой сибиреязвенной вакцины составляет штамм *B. anthracis* СТИ-1. Штамм был получен в 1940 г. Н.Н. Гинсбургом на научной базе Санитарно-технического института (ныне 48 Центрального НИИ МО). Выращивая на свернутой нормальной лошадиной сыворотке культуру вирулентного штамма *B. anthracis* «Красная Нива», выделенного в 1934 г. от лошади на Орловской биофабрике, Н.Н. Гинсбург селектировал вариант, не способный образовывать капсулу [10].

Капсула возбудителя сибирской язвы представляет собой монотонный линейный полимер  $\gamma$ -D-глутаминовой кислоты. В инфицированном организме она предохраняет патогенный микроорганизм от неспецифических и специфических защитных реакций, препятствует фагоцитозу. За образование капсулы отвечают структурные и регуляторные гены, входящие в состав плазмиды рХО2: *capB*, *capC*, *capA*, *capE*, *capD*, *der*, *acrA* и *acrB*. В вакцинном штамме *B. anthracis* СТИ-1 (рХО1<sup>+</sup>рХО2<sup>-</sup>) произошла спонтанная элиминация плазмиды рХО2, его геном представлен хромосомой и плазмидой рХО1. Плазмида рХО1 включает детерминанты синтеза компонентов экзотоксина: отечного фактора (ген *суа*), летального фактора (ген *lef*) и протективного антигена (ген *pag*). Протективный антиген является основным иммуногеном сибиреязвенного микроба. В силу генетических особенностей штамм *B. an-*

thracis СТИ-1 не может вызывать инфекционный процесс в восприимчивом организме, но сохраняет иммуногенные свойства. Проведенное в последние годы полногеномное секвенирование штамма *B. anthracis* СТИ-1 подтвердило его структурную организацию [44]. С филогенетической точки зрения штамм относится к подгруппе А, MLVA кластеру А1, транс-евразийской SNP линии А. Вг.008/009.

В 1942 г. вакцину СТИ-1 начали применять для иммунизации животных. Еще через год была показана ее слабая реактогенность для населения. В 1944 г. вакцину СТИ-1 использовали при ликвидации вспышки особого опасного заболевания в войсках на территории Ирана и Румынии, начиная с 1951 г., Министерство здравоохранения рекомендует ее для иммунизации людей групп риска [10]. Лицензия на производство сибиреязвенной вакцины для скарификационного применения была получена в 1953 г., для подкожного введения — в 1959 г.

Крупномасштабные исследования препарата проводили на территории Молдавии (1951 — 1952 гг.) и Казахстана (1973 — 1975 гг.). На территории Казахской ССР были привиты около 150 тысяч человек. В первом случае эффективность живой вакцины СТИ-1 составила 75%, во втором — 84% [5]. По результатам испытаний было сделано заключение о высокой иммунологической эффективности и довольно низкой реактогенности вакцины *B. anthracis* СТИ-1.

В бывшем СССР производство вакцины осуществлялось в Тбилиском научно-исследовательском институте вакцин и сывороток. В 1992 г. организацию производства сибиреязвенных вакцин взяло на себя МО РФ. Трудности возникли в связи с обнаруженной гетерогенностью популяционного состава маточной культуры вакцинного штамма по иммуногенным и культурально-морфологическим свойствам. Клональный анализ с использованием ПЦР выявил мутационные изменения в гене *rag*, кодирующем синтез протективного антигена. Для повышения иммуногенности вакцинного штамма был применен метод пассажа штамма *B. anthracis* СТИ-1 на морских свинках с последующим высевам и отбором клонов, не содержащих структурных перестроек и способных эффективно экспрессировать ген *rag* [18, 19]. До двухтысячных годов ежегодно в учреждения системы Министерства здравоохранения и социального развития, а также Министерства обороны поступало от 30 000 до 50 000 комплектов вакцины сибиреязвенной живой.

В настоящее время вакцина представляет собой споры штамма *B. anthracis* СТИ-1, лиофилизированные в 10% водном растворе сахарозы. Производится в 48 Центральном НИИ МО РФ. Технология изготовления вакцины включает глубинное культивирование микроорганизма в жидкой питательной среде [21]. Выпускается в виде лиофилизата, из которого готовится суспензия для подкожного введения и накожного скарификационного нанесения. Регламентировано первичное двукратное введение вакцины в дозе 50 млн спор (подкожное введение) с интервалом 20 — 30 суток и последующие ежегодные ревакцинации. Доза вакцины для скарификационного применения составляет 500 млн спор в 0,05 мл. Внеплановую вакцинацию проводят подкожным способом.

Ранее вакциной СТИ-1 иммунизировали однократно. Однако проведенные исследования показали, что после однократного подкожного применения вакцины адаптивный иммунитет выявляется через месяц только у 50 — 60%

вакцинированных людей и сохраняется до 3 месяцев у 28 — 32%, а до 5 месяцев — только у 15% привитых. Исследование косвенных иммунологических тестов через 3 месяца после двукратной иммунизации живой споровой вакциной выявило от 75 до 80% лиц с высоким уровнем иммунитета, через 6 месяцев — от 55 до 60%, а через год — от 43 до 48%. Статистические данные середины семидесятых годов прошлого века свидетельствуют, что среди всех заболевших сибирской язвой от 6,4 до 27,7% составляли люди, привитые живой вакциной СТИ-1 [10].

Специфическую профилактику сибирской язвы проводят с четырнадцатилетнего возраста. Допустимые реакции на введение вакцины — гиперемия, небольшая болезненность, инфильтрат диаметром до 50 мм в месте инъекции. Общая реакция возникает редко в первые сутки после прививки и проявляется незначительным повышением температуры, недомоганием и головной болью. Иногда может наблюдаться повышение температуры тела до 38,5 °С и небольшое увеличение регионарных лимфатических узлов. Считается, что живая сибиреязвенная вакцина при регламентированной кратности введения создает напряженный иммунитет продолжительностью до 1 года.

Опубликованных данных о рандомизированных исследованиях живой сибиреязвенной вакцины немного. В клинических исследованиях вакцины при двукратной схеме общие реакции средней и слабой степени тяжести наблюдались в 1,5% случаев. Тяжелых поствакцинальных осложнений и утраты трудоспособности зарегистрировано не было. У некоторых добровольцев повышение температуры тела возникало через 9 — 12 часов после вакцинации, достигало максимума через 24 часа и полностью исчезало к 48 часам. Местные реакции проявлялись в виде слабых отеков, гиперемии и умеренной болезненности в месте введения вакцины. Клиническое обследование привитых людей не выявило стрессового и алергизирующего воздействия препарата на организм. За длительный период применения живой сибиреязвенной вакцины не было сообщений о возникновении тяжелых побочных эффектов [9, 48]. Следует отметить, что систематической отчетности о здоровье лиц, подлежащих вакцинации живой сибиреязвенной вакциной, в доступных источниках не приводится.

В работах, посвященных изучению влиянию препарата на иммунореактивность организма человека, установлено, что в ответ на введение живой сибиреязвенной вакцины у привитых (в исследовании участвовали около 60 добровольцев) происходит иммунологическая перестройка, которая проявляется в достоверном повышении уровня содержания в крови Т-клеток иммунологической памяти (CD45+CD4+CD62L-, CD45+CD4+CD62L-CD45RACD45RO+). Данный факт является подтверждением активного участия Th1-лимфоцитов в развитии иммунного ответа на вакцинальный процесс. В тесте *in vitro*, когда лимфоциты крови вакцинированных лиц стимулировали протективным антигеном, а затем определяли методом проточной цитофлуориметрии значения коэффициента стимуляции, были получены результаты, свидетельствующие об эффективности вакцинации [2,3].

В похожем исследовании на 14 сутки после вакцинации прослеживалась тенденция к снижению уровня лимфоцитов, экспрессирующих CD3, CD4, CD8, но при этом достоверно повышалось содержание естественных киллеров CD16, уровня В-лимфоцитов и IgG по сравнению с контрольными значениями у невакцинированных [13].

*Вакцина сибиреязвенная комбинированная сухая для подкожного применения.* Вакцина разработана специалистами Центра военно-технических проблем биологической защиты МО РФ, впоследствии НИИ микробиологии МО РФ (в настоящее время 48 Центрального НИИ МО РФ). Получено несколько патентов РФ и сертификат на производство вакцины [7, 8, 11, 15].

Комбинированная вакцина состоит из спор вакцинного штамма *V. anthracis* СТИ-1 и адсорбированного на геле гидроокиси алюминия культурального фильтрата штамма *V. anthracis* 55 (рХО1<sup>+</sup>рХО2<sup>-</sup>), содержащего протективный антиген. Препарат выпускается в жидкой форме и в виде лиофилизата, из которого готовится суспензия для подкожного введения. Рекомендовано однократное введение. Одна человеко-доза комбинированной вакцины содержит в 0,5 см<sup>3</sup> 40 — 60 млн спор штамма *V. anthracis* СТИ-1, 30 — 40 ИД<sub>50</sub> для мышей протективного антигена, не более 2,5 мг окиси алюминия. Индекс иммунитета для морских свинок — не менее 25 000 [11].

Формирование напряженного иммунитета при регламентируемом однократном применении комбинированной вакцины наступает уже к 7 — 10 суткам и сохраняется 6 месяцев, через 9 — 12 месяцев определяется примерно у 50 — 70% привитых. В то время, как при однократном применении живой вакцины высокий уровень специфической резистентности выявляется лишь к 21 суткам у 55 — 65% вакцинированных, сохраняется до 6 месяцев у 15 — 20% и до 9 — 12 месяцев — лишь у 5 — 10% привитых. Доклинические испытания комбинированного препарата не выявили существенных отличий по безвредности и реактогенности в сравнении с живой вакциной. В ряде случаев уровень защиты экспериментальных животных превышал эффект от применения каждого из ее компонентов в отдельности [11, 12].

Клинические исследования показали, что первичная однократная подкожная иммунизация людей комбинированной вакциной обеспечивала формирование напряженного иммунитета более чем у 80% привитых с сохранением высокого уровня в течение 8 месяцев. Примерно у 5% вакцинированных от числа лиц с активной продукцией антител эти титры сохранялись в течение 1,5 лет. Возраст донора, группа крови и резус-фактор не влияли на активность гуморального ответа. При исследовании через 8 месяцев после вакцинации сухой комбинированной вакциной активную продукцию антител к ПА (1:800 по результатам ИФА) выявляли у 40% доноров, слабый иммунный ответ (1:100) регистрировали у 15% лиц. В случаях вакцинации живой сибиреязвенной вакциной наблюдали совсем иную динамику — титр антител 1:800 не был определен ни у одного из доноров, у 20 % он составил 1:400, а у 80% — 1:100 и менее [20].

Технологии производства живой и комбинированной вакцин сопряжены с необходимостью использования спорообразующего аттенуированного штамма *V. anthracis*, при этом не исключен риск контаминации оборудования и помещений бактериальными спорами, чрезвычайно устойчивыми к действию факторов внешней среды. Проблематично применение живой вакцины для экстренной профилактики на фоне антибиотикотерапии. Создание вакцинных штаммов, устойчивых к антимикробным препаратам [1, 17], не в состоянии охватить изменяющийся спектр используемых средств химиофилактики.

*Химическая вакцина АVP.* В Великобритании выпускается вакцина АVP (*anthrax vaccine precipitated*). Производство лицензировано в 1979 г. Протективный антиген получают из культурального фильтрата авирулентно-

го бескапсульного штамма *V. anthracis* Sterne 34F<sub>2</sub> (pXO1<sup>+</sup>pXO2<sup>-</sup>). В качестве адъюванта используют фосфат алюминия. В вакцинном препарате среди прочих примесей содержится относительно высокий процент летального фактора — более 30%, а также белки S-слоя Sap и EA1. Все перечисленные протеины по результатам функционального скрининга генома с использованием биоинформационного и протеомного анализов относятся к дополнительным иммуногенным факторам [34]. Следовательно, при иммунизации людей вакциной AVP специфическая резистентность определяется совокупным действием протективного антигена, летального фактора и белков S-слоя [24]. Лицензированная вакцина AVP вводится внутримышечно, график иммунизации включает 4 инъекции. Интервал между первыми тремя прививками составляет 3 недели, а между последними двумя — 6 месяцев. Ревакцинация осуществляется ежегодно.

Неоднократно проводились рандомизированные клинические исследования AVP. Сообщалось, что у 24% вакцинированных AVP людей возникают легкие системные побочные эффекты, например, гриппоподобные симптомы — мышечные и головные боли, утомляемость. Реже отмечают увеличение лимфоузлов, небольшое повышение температуры, сыпь, зуд или другие аллергические реакции. При исследовании 129 пациентов военно-полевого госпиталя 47% вакцинированных AVP пожаловались на боль в месте инъекции, 18% — на ограничение подвижности руки. Возможно появление сыпи и небольшого отека на месте введения, которые могут сохраняться в течение нескольких дней, а затем проходят без назначения симптоматического лечения [25].

*Химическая вакцина AVA (BioThrax®)*. Лицензия на производство американской химической вакцины получена в 1970 г. отделом биопрепаратов Национального института здоровья Департамента здравоохранения (Мичиган). Впоследствии производственная линия и интеллектуальная собственность были переданы частной биофармацевтической компании Emergent BioSolutions (Gaithersburg, Мэриленд), до 2004 г. называвшейся BioPort Corporation (Лансинг, Мичиган). В настоящее время вакцина выпускается под названием AVA (anthrax vaccine adsorbed) или BioThrax® (усовершенствованный вариант вакцины AVA). Получают путем адсорбции на гидроокиси алюминия культурального фильтрата штамма *V. anthracis* V770-NR1-R (pXO1<sup>+</sup>pXO2<sup>-</sup>), являющегося протеазонегативным производным вакцинного штамма *V. anthracis* Sterne 34F<sub>2</sub>. Основной активный компонент — протективный антиген. Консерванты — бензотония хлорид и формальдегид [49].

Первичный комплекс иммунизации химической вакциной AVA с 1970 по 2008 гг. включал 6 подкожных инъекций в следующие сроки: 0, 2 и 4 недели, а также 6, 12 и 18 месяцев от первой инъекции. В клинических исследованиях, проводимых в период с 1996 по 1999 гг. Медицинским НИИ инфекционных болезней армии США (USAMRI), у 14% добровольцев в течение 30 минут после подкожной инъекции отмечали эритему, головную боль и/или повышение температуры. В 4% случаев в более отдаленные сроки наблюдали общие реакции, включающие недомогание, головную боль, миалгию, повышение температуры, затруднение дыхания, тошноту или рвоту. Локальные реакции: покраснение, инфильтрацию, болезненность в месте введения, зуд и отек, регистрировали чаще у женщин. Все описанные явления достаточно быстро купировались без назначения симптоматического лечения [46].

После драматических событий 2001 года существенно активизировались усилия, направленные на повышение эффективности и уменьшения кратности введения AVA. В интенсивном режиме проводились масштабные испытания. Данные Центров по контролю и профилактике заболеваний США о безопасности вакцины и побочных действиях систематически пополнялись за счет рандомизированных клинических исследований и данных Системы отчетности неблагоприятных реакций на вакцины (VAERS), в том числе по рассмотрению личных дел 500 000 американских военнослужащих [29]. Проведенный в USAMRIID анализ состояния здоровья 1583 работников, получающих профилактические прививки американской химической вакцины (из них 273 человека получили 10 и более доз, 46 человек — 20 и более доз) показал, что женщины и люди старше 40 лет чаще реагируют на прививки появлением местных и общих реакций. Возникновение локальных симптомов наиболее вероятно после получения 3,6% доз, а системных проявлений — 1% доз вакцины AVA [9].

С целью снижения риска развития локальных побочных эффектов Центр оценки и исследования биологических продуктов (CBER) в 2008 году одобрил изменение пути введения вакцины AVA на внутримышечный. Подкожный путь введения рекомендовано использовать по медицинским показаниям, например, у лиц с нарушениями свертываемости крови. Внесено изменение и в график иммунизации, количество инъекций сокращено до пяти: 0 и 1 месяц, бустерные — 6, 12 и 18 месяцев от первой инъекции, с последующим интервалом в 1 год. С целью экстренной профилактики вакцину вводят 3 раза в течение 4 недель на фоне приема регламентированных антибиотиков. Усовершенствованный вариант вакцины AVA, получивший название BioThrax<sup>®</sup>, с измененным графиком вакцинации и способом введения прошел все фазы доклинических, клинических исследований [42] и процедуру лицензирования. Эффективность и безопасность вакцины AVA (BioThrax<sup>®</sup>) подтверждена документами Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA).

Наиболее часто встречающиеся побочные эффекты при использовании лицензированной вакцины BioThrax<sup>®</sup>: болезненность, эритема менее 5 см в диаметре, зуд, отек, гематома и образование подкожных узлов на месте введения. Реже регистрируют системные побочные эффекты — мышечные боли или временное ограничение движения руки, подмышечные лимфаденопатии, головные боли, повышение утомляемости (от 0,3 до 11,9% вакцинированных). В некоторых случаях отмечают эритему более 12 см в диаметре — 5%, отеки в области предплечья — 1%. Все описанные явления достаточно быстро купируются без назначения симптоматического лечения. В целом после изменения графика иммунизации и пути введения препарата частота развития побочных эффектов снизилась [26]. Возникновение серьезных аллергических реакций в виде анафилактического шока — 0,76 эпизодов на 100 000 доз. По официальным данным CDC нет доказательств того, что сибиреязвенная химическая вакцина AVA (BioThrax<sup>®</sup>) вызывает долгосрочные проблемы со здоровьем. Объем производства вакцины BioThrax<sup>®</sup> фармацевтической компанией Emergent BioSolutions составляет 7 — 9 млн доз в год, планируется увеличение выпуска до 20 — 25 млн доз в год и более. Срок годности вакцины увеличен до 3 лет.

Эта же компания довела до одобрения FDA (2015 г.) препарат Anthrasil<sup>™</sup>

— гомологичный иммуноглобулин для внутривенного введения для лечения легочной формы сибирской язвы в составе комплексной антибактериальной терапии. Препарат разработан канадской компанией Cangene Corporation при поддержке Управления перспективных биомедицинских исследований и разработок Министерства здравоохранения и социальных служб США (BARDA). Он изготавливается из плазмы крови добровольцев, привитых против сибирской язвы химической вакциной AVA, и предназначен для создания стратегических государственных запасов на случай возникновения экстраординарной ситуации. В России разрабатывался подобный препарат из плазмы крови лиц, вакцинированных отечественной живой вакциной [4, 6]. События 2016 г. в Ямало-Ненецком автономном округе актуализировали вопрос о необходимости зарегистрированного гомологичного иммуноглобулина для экстренной профилактики и лечения тяжелых форм сибирской язвы.

*Экспериментальная вакцина NuThrax™.* Препарат AV-7909, впоследствии получивший название NuThrax™, представляет собой химическую сибирезвенную вакцину AVA (BioThrax®) с добавлением CpG 7909. Цитозин-гуанин олигодезоксинуклеотиды (CpG-ODN) взаимодействуют со структурами врожденного иммунитета — толл-подобными рецепторами 9 типа, тем самым существенно повышая уровень иммунного ответа [27]. Применение CpG-ODN одобрено Глобальным консультативным комитетом по безопасности вакцин ВОЗ. Адьювант CpG 7909 (другое название VaxImmune™), производимый Coley Pharmaceutical Group (с апреля 2015 г. — Merck & Co.), позиционируется как перспективный продукт для использования в вакцинных программах.

Ранние исследования AV-7909 проводились Национальным институтом здоровья (NIH) Национального института аллергических и инфекционных болезней (NIAID) при поддержке BARDA. Они включали разработку технологии производства, доклинические испытания, I и II фазы клинических исследований. В 2011 году опубликовано сообщение о I фазе клинических исследований препарата AV-7909 [47]. В 2014 г. успешно завершена II фаза клинических исследований препарата AV-7909 [39]. На основании данных отчета, размещенного на официальном сайте клинических исследований, иммунологически-значимых побочных эффектов не наблюдалось ни в одном из случаев. В ряде случаев пациенты отмечали небольшую усталость (14,7%), невыраженные мышечные (17,6%) и головные боли (8,8%), несильную болезненность в месте введения (17,6%), некоторое ограничение подвижности руки (26,4%), покраснение на месте введения (2,9%).

После получения положительных результатов II фазы клинических исследований Министерство здравоохранения и социальных служб США (HHS) поручило фармацевтической компании Emergent BioSolutions дальнейшую разработку и испытания вакцинного препарата AV-7909, получившего название NuThrax™. Более чем 8 лет экспериментальных работ увенчались переходом на новый уровень. В конце 2014 г. заключен контракт с Emergent BioSolutions на 31 млн долларов и 30 месяцев при финансовой и технической поддержке BARDA. Планировалось стабилизировать вакцину, получив ее лиофилизированную форму. В последующем между BARDA и Emergent BioSolutions был заключен пятилетний контракт на 198,7 млн долларов, финансирующий мероприятия, необходимые для лицензирования вакцины FDA. В условия контракта входят проведение III фазы клинического исследования с целью определения эффективности кандидатной вакцины NuThrax™, II фазы

клинического исследования с целью оценки безопасности вакцины, ее эффективности на фоне антибиотикотерапии, а также организация опционов на закупку вакцины для решения стратегических национальных задач [37].

Препарат NuThrax™ позиционируется как средство плановой и экстренной специфической профилактики сибирской язвы. Введение адьюванта CpG 7909 в рецептуру вакцины AVA (BioThrax®) позволяет существенно улучшить ее иммунологические характеристики, уменьшить количество вводимого антигена и сократить график вакцинации. На сегодняшний день исследования кандидатной вакцины NuThrax™ показывают, что две дозы препарата, вводимые с интервалом в 14 суток, оказываются достаточными, чтобы стимулировать полноценный иммунный ответ. При этом ни в одном из случаев не отмечено побочных реакций средней и тяжелой степени выраженности, в том числе аутоиммунной этиологии [38]. Если все испытания закончатся успешно, то по заявлению руководителя BARDA в скором времени ожидается получение нового препарата для экстренной специфической профилактики сибирской язвы, позволяющего достичь более высокого уровня готовности при более низкой стоимости.

*Экспериментальные рекомбинантные вакцины.* Антигенный состав перечисленных выше химических вакцин, получаемых из аттенуированных штаммов-продуцентов, трудно определяем, содержание протективного антигена в них варьирует от лота к лоту [33]. Нестандартизованный состав и наличие примесей отражается на эффективности и безопасности подобных препаратов. По определению ВОЗ современные вакцины должны: содержать только полностью охарактеризованные вещества с установленным механизмом действия; эффективно защищать от заражения любым вирулентным штаммом соответствующего микроорганизма; не вызывать токсического воздействия или различных степеней тяжести побочных действий на макроорганизм. К достижению этого идеала стремятся рекомбинантные вакцины. Разработка препаратов на основе иммуногенных антигенов, синтезируемых рекомбинантными продуцентами, в значительной мере решает проблему остаточной вирулентности и реактогенности.

Наибольший прогресс в продвижении рекомбинантных вакцин достигнут в США. Правительство США после 2011 г. определяет сибирскую язву как угрозу национальной безопасности, это объясняет объем финансирования и приоритетность разработки вакцин нового поколения, удовлетворяющих спрос на формирование запаса для стратегических целей (определяемый правительством уровень — 75 млн доз), повышение стабильности и снижение дозы вводимого препарата.

Рекомбинантные вакцины содержат минимальное количество очищенных протективных антигенов, необходимое для достижения эффективной иммунологической защиты. С одной стороны, это снижает антигенную нагрузку на макроорганизм, с другой, позволяет увеличить количество получаемых доз, что, в конечном итоге, может привести к значительной экономии затрат в расчете на одну человеко-дозу.

Аттенуированные и природные штаммы *V. anthracis* в силу генетических особенностей имеют ограничения в достижении высокого уровня синтеза протективного антигена. Это связано с особенностями регуляции кодирующего гена *pagA*. В штаммах возбудителя сибирской язвы данный ген находится под контролем глобального регулятора транскрипции *AtxA*.

Физиологическими регуляторами экспрессии гена *atxA* является температура 37°C, окислительно-восстановительный потенциал и фаза роста микроорганизма [32]. Как следствие, в условиях *in vitro* штаммы *B. anthracis* продуцируют протективный антиген и другие компоненты токсина только в атмосфере повышенного содержания CO<sub>2</sub> и на средах, содержащих бикарбонат. Ген *atxA* расположен на плазмиде *pXO1*, здесь же локализован ген *pagR*, кодирующий синтез негативного регулятора *pag*-оперона. Его транскрипция находится под контролем CO<sub>2</sub>-независимого P2-промотора. Инактивация гена *pagR* приводит к повышению экспрессии гена *pagA* в 2 — 3 раза [43]. Почти полный аналог этого гена был совсем недавно обнаружен на плазмиде *pXO2* [41]. Предположительно он осуществляет негативную регуляцию *pagR*. Отсутствие репликона *pXO2* и соответственно гена *pagR<sub>pXO2</sub>* в используемых в качестве продуцентов штаммах *B. anthracis* СТИ-1, *B. anthracis* 55 и *B. anthracis* Sterne 34F<sub>2</sub> отчасти может объяснить более низкий уровень продукции ими целевого белка по сравнению с диплоидными производными. В регуляции сибирезвенного токсина участвуют и хромосомные детерминанты, в частности, ген *abrV*. Фактор *AbrV* возбудителя сибирской язвы осуществляет негативную регуляцию гена *pag*, контролируя его транскрипцию в соответствии со стадией роста бактерии. В конце экспоненциальной фазы роста, когда уровень *AbrV* начинает снижаться, синтез протективного антигена, напротив, интенсифицируется. За позитивную регуляцию *atxA*-регулона в постэкспоненциальную фазу роста микроорганизма отвечает ген *sigmaH* [36]. В рекомбинантных штаммах транскрипция клонированного гена *pagA* находится под сильным CO<sub>2</sub>-независимым промотором векторной плазмиды. Новые технологии позволяют существенно повысить производительность и рентабельность производства вакцин.

В 2013 — 2016 гг. на различных фазах клинических испытаний находилось 4 кандидатные рекомбинантные вакцины для специфической профилактики сибирской язвы, успешно прошедшие все фазы доклинических испытаний [23].

*PreviThrax™ (ранее rPA102)* — в настоящее время разработка осуществляется в фармацевтической компании Emergent BioSolutions. Экспериментальная вакцина для экстренной профилактики сибирской язвы содержит очищенный рекомбинантный протективный антиген (рПА), выделенный из генно-инженерного штамма *B. anthracis*, доклинические и начальные фазы клинических исследований прошли успешно [3, 40]. Тем не менее, в 2006 г. был приостановлен контракт с фирмой VaxGen Inc. на 877 млн долларов на разработку вакцины *rPA102* ввиду проблем со стабильностью препарата, изготавливаемого в жидкой форме. В 2008 г. права на производство вакцины были переданы частной фармацевтической компании Emergent BioSolutions, взявшей на себя решить возникшие трудности и довести экспериментальную вакцину под новым названием *PreviThrax™* до клинических испытаний и одобрения национальным регулирующим органом США — FDA. В 2013 г. Emergent BioSolutions сообщала о прохождении препаратом *PreviThrax™*, содержащим очищенный рПА, II фазы клинических испытаний. В 2016 г. в описании *PreviThrax™* добавлены данные об адьюванте — CpG 7909, новая формула экспериментальной вакцины проходит I фазу клинических исследований [23].

В РосНИПЧИ «Микроб» разработан прототип рекомбинантной вакцины,

содержащий рПА и белок S-слоя EA1. В рецептуру прототипа вакцины включен современный адъювант CpG 2006 (нуклеотидная последовательность идентична CpG 7909), синтезированный на автоматическом олигосинтезаторе. Разработана технологическая схема получения лекарственной лиофилизированной формы прототипа вакцины. На основании комплексного исследования на соответствие требованиям к иммунобиологическим лекарственным препаратам (по иммунологической эффективности, безопасности и физико-химическим свойствам) показана его перспективность для последующих доклинических исследований. Наиболее близким аналогом прототипа вакцины является PreviThrax™.

*SparVax™* — в настоящее время разработка осуществляется в компании PharmAthene (Annapolis, Мэриленд, США). Лиофилизированный препарат содержит рПА, выделенный из генно-инженерного штамма *Escherichia coli*. Первоначально была разработана жидкая форма SparVax®, содержащая сорбированный на альгидрогеле рПА. Сообщалось об успешном завершении II фазы клинических испытаний в 2007 г. Исследование с участием свыше 770 добровольцев показало в целом хорошую переносимость и высокую иммуногенную активность. Тем не менее, ввиду проблем со стабильностью препарата, в 2014 г. был подписан контракт PharmAthene с NIAID на создание лиофилизированной формы экспериментальной вакцины на основе собственной технологической платформы компании. Стабилизированный препарат сохраняет активность в условиях хранения при комнатной температуре. Во II квартале 2016 г. планировалось проведение доклинических испытаний, в случае получения положительных результатов и одобрения FDA в 2017 г. — начало клинических исследований [24].

*Px563L* — в настоящее время разработка осуществляется в компании Pfenex (Сан-Диего, Калифорния, США). Экспериментальная вакцина Px563L содержит мутантный рекомбинантный протективный антиген с адъювантом (не конкретизируется). После успешного завершения доклинических испытаний Px563L в 2015 г. Министерство здравоохранения и социальных служб США заключило с Pfenex контракт на 15,9 млн долларов и 30 месяцев при финансовой и технической поддержке BARDA на проведение клинических испытаний на небольшом количестве здоровых добровольцев [31]. Впоследствии договор был продлен за счет дополнительного финансирования на 5 последующих лет в размере 143,5 млн долларов для определения иммунологической эффективности кандидатной вакцины и определения минимального количества доз, необходимых для достижения желаемого иммунного ответа. В доклинических и клинических исследованиях вакцина продемонстрирована эффективность после получения двух доз, вводимых с интервалом в 28 суток. Экспериментальная вакцина Px563L более стабильна, проще и рентабельнее в массовом производстве, чем лицензированная вакцина BioThrax®. Высокая производительность процесса получения вакцины обусловлена использованием оригинальной технологической платформы — Pfenex Expression Technology®. Рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое исследование I фазы продемонстрировало иммунологическую эффективность и хорошую переносимость препарата. После введения двух доз Px563L в 100% случаев выявлено достижение необходимого уровня титров токсин-нейтрализующих антител, в то время как у лиц, трехкратно иммунизированных лицензированной вакциной BioThrax®, только в 57,9 % случаев был зарегистри-

стрирован тот же уровень показателя. Из побочных явлений отмечали невыраженные реакции в месте введения, ни у одного добровольца не было боли в месте инъекции, отека, ограничения подвижности руки [45].

*Anthrax vaccine (oral)* — совместная разработка NIAID, отделение микробиологии и инфекционных болезней (DMID) и фармацевтической компании PaxVax (Сан-Диего, Калифорния, США). Представляет собой аттенуированный аденовирус 4 серотипа — Ad4, синтезирующий рПА. Препарат предназначен для перорального введения без адъюванта [23]. С 2013 г. проходит I фазу клинических испытаний. Похожий препарат для однократного интраназального введения на основе нереплицирующегося аденовируса 5 серотипа находится на стадии доклинических испытаний. Вирусные векторы являются универсальной платформой для включения протективных антигенов патогенных микроорганизмов. Такие векторные системы детально охарактеризованы в доклинических и клинических исследованиях, что ускоряет принятие решений о проведении доклинических и клинических исследований. Важно, что вакцины на основе аттенуированных вирусов имитируют инфекцию, экспрессируя протективные антигены *in situ*, облегчая тем самым индукцию Т-клеточного ответа, в том числе продукцию цитотоксических Т-лимфоцитов.

Таким образом, специфическая профилактика сибирской язвы является важным звеном в обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия населения. Лицензированные и успешно применяемые сегодня сибиреязвенные вакцины наряду с достоинствами не лишены недостатков. Химические вакцины AVA и AVP индуцируют выработку антител в высоких титрах и в ранние сроки, но для поддержания напряженного иммунитета требуют неоднократного введения. Технологии их производства основаны на использовании аттенуированных штаммов *B. anthracis*, имеющих в силу естественных причин ограничения в достижении высокого уровня продукции протективного антигена. Живая сибиреязвенная вакцина СТИ-1 обеспечивает более длительный иммунитет при условии двукратного использования, но она не безупречна в плане безопасности для макроорганизма, затруднительно ее использование на фоне приема антибиотиков. Процесс изготовления живой вакцины осложнен способностью вакцинного штамма к образованию спор. Усилия по разработке вакцин нового поколения направлены на увеличение безопасности, уменьшение кратности введения и совершенствование технологии производства. Наиболее востребованные пути реализации — объединение достоинств химической и живой вакцины в комплексном препарате; введение в рецептуру зарегистрированной химической вакцины адъюванта, взаимодействующего со структурами врожденного иммунитета; использование высокопроизводительных и безопасных генно-инженерных продуцентов. Комбинированную вакцину в отличие от живой можно включать в схему экстренной профилактики наряду с антибиотиками. Применение современных адъювантов в составе вакцин решает задачу оптимального представления антигенов иммунной системе, способствует формированию выраженного иммунного ответа с развитием гуморальных и клеточных иммунных реакций. Рекомбинантные технологии успешно решают проблему остаточной вирулентности и реактогенности создаваемых иммунобиологических препаратов, они более производительны и позволяют создавать универсальные технологические платформы для производства различных вакцин.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Аксенова Л.Ю., Буравцева Н.П., Коготкова О.И., Еременко Е.К., Цыганкова О.И. Свойства живой сибиреязвенной антибиотикоустойчивой вакцины СТИ-ПР в процессе длительного хранения. Журн. микробиол. 2007, 1: 34-36.
2. Богачева Н.В., Дармов И.В., Кучеренко А.С., Крючков А.В., Вахнов Е.Ю. Оценка иммунореактивности лиц, вакцинированных чумной, сибиреязвенной, бруцеллезной, туляремийной живыми сухими вакцинами и противоботулиническим трианатоксином, в зависимости от уровня иммунологической нагрузки. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2013, 6 (73): 79-84.
3. Богачева Н.В., Крючков А.В., Дармов И.В., Воробьев К.А., Печенкин Д.В., Елагин Г.Д., Колесников Д.П. Экспериментальная оценка методом проточной цитофлюориметрии уровня клеточной иммунологической памяти у лиц, вакцинированных против чумы и сибирской язвы. Клиническая лабораторная диагностика. 2013, 11: 48-53.
4. Боровской Д.В., Шевцов А.Н., Дармов И.В., Луб М.Ю., Зайцева Г.А., Дробкова А.В., Долматов В.Ю. Новый иммуноглобулин для лечения сибирской язвы. Журн. микробиол. 2009, 3: 56-60.
5. Бургасов П.Н., Черкасский Б.Л., Кноп А.Г., Утегенов К.Д. Эпидемиологическая эффективность сибиреязвенной вакцины СТИ. Журн. микробиол. 1976, 9: 27-35.
6. Долматов В.Ю., Дробкова А.В., Лютов А.Г., Мальцева О.В., Шевцов А.Н., Боровской Д.В., Елагин Г.Д., Карпова М.В., Вершинина О.А., Блинова Е.А., Шарыгин С.Л. Возможность получения противосибиреязвенного иммуноглобулина для внутривенного введения. Проблемы особо опасных инфекций. 2008, 2 (96): 39-42.
7. Кожухов В.В., Пименов Е.В., Дармов И.В., Маслов А.В., Сероглазов В.В., Амосов М.Ю., Комоско Г.В. Способ комплексной профилактики сибирской язвы. Патент № 2216349 РФ, опубл. 01.03.2002 г.
8. Кожухов В.В., Пименов Е.В., Сероглазов В.В., Юднико В.А., Меновщиков В.А. Способ получения сухой комбинированной сибиреязвенной вакцины. Патент № 2181294 РФ, опубл. 20.04.2002 г.
9. Кутырев В.В., Микшис Н.И. Сибиреязвенные вакцины. Вакцины и вакцинация: национальное руководство. Под ред. В. В. Зверева, Б. Ф. Семенова, Р. М. Хайтова. М., ГЭОТАР-Медиа, 2011.
10. Онищенко Г.Г., Васильев Н.Т., Литусов Н.В., Харечко А.Т., Васильев П.Г., Садовой Н.В., Кожухов В.В. Сибирская язва: Актуальные аспекты микробиологии, эпидемиологии, клиники, диагностики, лечения и профилактики. М., ВУНМЦЗ МЗ РФ, 1999.
11. Онищенко Г.Г., Кожухов В.В. (ред.) Сибирская язва: актуальные проблемы разработки и внедрения медицинских средств защиты. М., Медицина, 2010.
12. Пименов Е.В., Дармов И.В., Васильев Н.Т., Кожухов В.В., Бондарев В.П., Кутырев В.В. Состояние вопроса и перспективы разработки вакцин против сибирской язвы. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2002, 5: 42-46.
13. Ракитина Е.Л., Логвиненко О.В., Головинская Т.М., Рязанова А.Г., Буравцева Н.П., Русанова Д.В. Влияние сибиреязвенной вакцины на некоторые показатели иммунитета у людей. Intern. J. Immunorehabilitation. 2010. 12; 2: 129.
14. Рязанова А.Г., Аксенова Л.Ю., Буравцева Н.П., Головинская Т.М., Еременко Е.И., Цыганкова О.И., Варфоломеева Н.Г., Куличенко А.Н. Сибирская язва: Эпидемиологическая и эпизоотологическая ситуация в 2015 г., прогноз на 2016 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2015, 2: 24-27.
15. Садовой Н.В., Кравец И.Д., Селиваненко Г.М., Харечко Г.С., Садовая Е.А., Васильев П.Г., Литусов Н.В., Елагин Г.Д., Супотницкий М.В. Вакцина сибиреязвенная комбинированная. Патент № 2115433 РФ, опубл. 20.07.1998 г.
16. Саяпина Л.В., Бондарев В.П., Олефир Ю.В. Современное состояние вакцинопрофилактики особо опасных инфекций. Проблемы особо опасных инфекций. 2016, 2: 107-110.
17. Сероглазов В.В., Кожухов В.В., Амосов М.Ю., Строчков Ю.И. Сибиреязвенный вак-

- цинный штамм СТИ-ПР-4 с расширенным спектром антибиотикорезистентности. Патент № 2173342, опублик. 19.01.2000 г.
18. Сероглазов В.В., Кожухов В.В., Строчков Ю.И., Амосов М.Ю. Способ поддержания сибиреязвенного вакцинного штамма СТИ-1. Патент № 2142009 РФ, опублик. 27.11.1999 г.
  19. Супотницкий М.В., Борисевич И.В., Климов В.И., Шевцов А.Н., Луб М.Ю., Туманов А.С. Роль российских и советских ученых в разработке сибиреязвенных вакцин. Биопрепараты. Профилактика. Диагностика. Лечение. 2015, 2 (54): 46-52.
  20. Шевцов А.Н., Дармов И.В., Зайцева Г.А., Боровский Д.В., Меновщиков В.А., Кунов В.К. Исследование иммунитета и аллергии после вакцинации сухой комбинированной вакциной. Журн. микробиол. 2007, 5: 51-53.
  21. Шевцов А.Н., Фокина В.В., Дармов И.В., Седельников И.Н. Глубинный способ получения посевных культур вакцинного производственного штамма сибиреязвенного микроба. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2010, 6; 3: 30-34.
  22. Шестакова И.В. Сибирская язва ошибок не прощает: оценка информации после вспышки на Ямале летом 2016 года. Журнал инфектологии. 2016, 8 (3): 5-27.
  23. 2016 Vaccines in Development. <http://www.phrma.org/sites/default/files/pdf/medicines-in-development-drug-list-vaccines.pdf>.
  24. Anthrax vaccine. <http://www.pharmathene.com/anthrax-vaccines>.
  25. Baillie L., Hebdon R., Flick-Smith H., Williamson D. Characterisation of the immune response to the UK human anthrax vaccine. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2003, 36 (1-2): 83-86.
  26. Bienek D., Loomis L., Biagin R. The anthrax vaccine. Human Vaccines. 2009, 5 (3): 184-189.
  27. Bode C., Zhao G., Steinhagen F., Kinjo T. CpG DNA as a vaccine adjuvant. Expert Rev. Vaccines. 2011, 10 (4): 499-511.
  28. Brachman P. Bioterrorism: an update with a focus on anthrax. Am. J. Epidemiol. 2002, 155: 981-987.
  29. Catherino W., Levi A., Kao T. et al. The anthrax vaccine does not affect semen parameters, embryo quality, or pregnancy outcome in couples with a vaccinated male military service member. Fertil. Steril. 2005, 83 (2): 480-483.
  30. Chitlaru T., Altboum Z., Reuveny S., Shafferman A. Progress and novel strategies in vaccine development and treatment of anthrax. Immunological Reviews. 2011, 239: 221-236.
  31. Development of new anthrax vaccine underway with HHS support. <http://www.hhs.gov/about/news/2015/08/17/development-of-new-anthrax-vaccine-underway-with-hhs-support.html>.
  32. Fouet A. AtxA, a Bacillus anthracis global virulence regulator. Res. Microbiol. 2010, 161 (9): 735-742.
  33. Friedlander A., Little S. Advances in the development of next-generation anthrax vaccines. Vaccine. 2009, 27: 28-32.
  34. Gat O., Grosfeld H., Ariel N. Search for Bacillus anthracis potential vaccine candidates by a functional genomic-serologic screen. Infect. Immun. 2006, 74 (7): 3987-4001.
  35. Gorse G., Keitel W., Keyserling H. et al. Immunogenicity and tolerance of ascending doses of a recombinant protective antigen (rPA102) anthrax vaccine: A randomized, double-blinded, controlled, multicenter trial. Vaccine. 2006, 24: 5950-5959.
  36. Hadjifrangiskou M., Chen Y., Koehler T. The alternative sigma factor sigmaH is required for toxin gene expression by Bacillus anthracis. J. Bacteriol. 2007, 189 (5): 1874-1883.
  37. HHS supports next-generation anthrax vaccine into advanced development. <http://www.hhs.gov/about/news/2016/09/30/hhs-supports-next-generation-anthrax-vaccine-advanced-development.html>.
  38. Hopkins R., Kalsi G., Montalvo-Lugo V. et al. Randomized, double-blind, active-controlled study evaluating the safety and immunogenicity of three vaccination schedules and two dose levels of AV7909 vaccine for anthrax post-exposure prophylaxis in healthy adults. Vaccine. 2016, 34 (18): 2096-2105.

39. Hopkins R., Daczkowska N., Kaptura P. et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled, safety and immunogenicity study of 4 formulations of anthrax vaccine adsorbed plus CPG 7909 (AV7909) in healthy adult volunteers. *Vaccine*. 2013, 31: 3051-3058.
40. Keitel W. Recombinant protective antigen 102 (rPA102): profile of a second-generation anthrax vaccine. *Exp. Rev. Vaccines*. 2006, 5 (4): 417-430.
41. Liang X., Zhang E., Zhang H. et al. Involvement of the pagR gene of pXO2 in anthrax pathogenesis. *Sci. Rep.* 2016, 6: 28827.
42. Marano N., Plikaytis B., Martin S. et al. Anthrax Vaccine Research Program Working Group.. Effects of a reduced dose schedule and intramuscular administration of anthrax vaccine adsorbed on immunogenicity and safety at 7 months: a randomized trial. *JAMA*. 2008, 300 (13): 1532-1543.
43. Mignot T., Mock M., Fouet A. A plasmid-encoded regulator couples the synthesis of toxins and surface structures in *Bacillus anthracis*. *Mol. Microbiol.* 2003, 47 (4): P. 917-927.
44. Okinaka R., Challacombe J., Drees K. et al. Genome sequence of *Bacillus anthracis* ST1, a Sterne-like Georgian/Soviet vaccine strain. *Genome Announc.* 2014, 2 (5): e00853-14.
45. Pfenex Announces Positive Anthrax Vaccine Study Results. <http://www.prnewswire.com/news-releases/pfenex-announces-positive-anthrax-vaccine-study-results-300310158.html>.
46. Pittman P., Gibbs P., Cannon T., Friedlander A. Anthrax vaccine: short-term safety experience in humans. *Vaccine*. 2002, 20: 972-978.
47. Rynkiewicz D., Rathkopf M., Sim A. et al. Marked enhancement of the immune response to BioThrax® (Anthrax Vaccine Adsorbed) by the TLR9 agonist CpG 7909 in healthy volunteers. *Vaccine*. 2011, 29: 6313-6320.
48. Shlyakhov E., Rubinstein E. Human live anthrax vaccine in the former USSR. *Vaccine*. 1994, 12: 727-730.
49. Turnbull P. Anthrax vaccines. In: Artenstein A. (ed.). *Vaccines: a biography*. Springer-Verlag. 2010, p. 57-71.
50. Watkinson A., Soliakov A., Ganesan A. et al. Increasing the potency of an alhydrogel-formulated anthrax vaccine by minimizing antigen-adjuvant interactions. *J. Clin. Vaccine Immunol.* 2013, 20 (11): 1659-1668.

*Поступила 25.02.17*

Контактная информация: Микшиш Наталья Ивановна, д.м.н.,  
410005, Саратов, ул. Университетская, 46, р.т. (845-2) 26-21-31

---

## СОДЕРЖАНИЕ (CONTENTS)

### ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ (ORIGINAL ARTICLES)

- Балахонов С.В., Куликалова Е.С., Мазена А.В., Сынгеева А.К., Остяк А.С., Михайлов Е.П., Ешелкин И.И., Шестаков В.А.* Ретроспективный анализ биологических свойств коллекционных штаммов *Francisella tularensis*, выделенных на юге Сибири (1950 — 2015 гг.) ..... 3
- Balakhonov, S.V., Kulikalova, E.S., Mazena, A.V., Syngeeva, A.K., Ostyak, A.S., Mikhailov, E.P., Eshelkin, I.I., Shestakov, V.A.* Retrospective analysis of biological properties of *Francisella tularensis* collection strains isolated in south Siberia (1950 — 2015)
- Ульшина Д.В., Ковалев Д.А., Пономаренко Д.Г., Русанова Д.В., Швецова Н.М., Таран Т.В., Кузнецова И.В., Жиров А.М., Хачатурова А.А., Борздова И.Ю., Куличенко А.Н.* Применение времяпролетной масс-спектрометрии для выявления возбудителя бруцеллеза в образцах крови в эксперименте ..... 9
- Ulshina, D.V., Kovalev, D.A., Ponomarenko, D.G., Rusanova, D.V., Shvetsova, N.M., Taran, T.V., Kuznetsova, I.V., Zhirov, A.M., Khachaturova, A.A., Borzdova, I.Yu., Kulichenko, A.N.* Application of time-of-flight mass-spectrometry for detection of causative agent of brucellosis in blood samples in experiment
- Тришина А.В., Березняк Е.А., Симонова И.Р., Веркина Л.М., Березняк А.Ю., Полеева М.В.* Биоразнообразие и антибиотикорезистентность условно патогенных энтеробактерий, выделенных из поверхностных водоемов Ростова-на-Дону ..... 17
- Trishina, A.V., Bereznyak, E.A., Simonova, I.R., Verkina, L.M., Bereznyak, A.Yu., Poleeva, M.V.* Biodiversity and antibiotics resistance of opportunistic pathogenic enterobacteria isolated from surface reservoirs of Rostov-on-Don
- Краснопрошина Л.И., Серова Т.А., Фошина Е.П., Бишева И.В., Сходова С.А.* Особенности иммунного ответа при различных схемах применения бактериальной терапевтической вакцины Иммуновак ВП-4 ..... 23
- Krasnoproshina, L.I., Serova, T.A., Foshina, E.P., Bisheva, I.V., Skhodova, S.A.* Features of immune response during various schemes of use of bacterial therapeutic vaccine Immunovac VP-4
- Загоскина Т.Ю., Чапоргина Е.А., Марков Е.Ю., Попова Ю.О., Долгова Т.М., Гаврилова О.В., Тайкова Т.С., Балахонов С.В.* Дот-иммуноанализ с использованием антител, меченных наночастицами коллоидного золота, для детекции ботулинического токсина в клиническом материале и пищевых продуктах ..... 31
- Zagoskina, T. Yu., Chaporgina, E.A., Markov, E. Yu., Popova, Yu.O., Dolgova, T.M., Gavrilo, O.V., Taiikova, T.S., Balakhonov, S.V.* Dot-immunoassay using gold nanoparticle marked colloid gold for the detection of botulinic toxin in clinical material and food products
- Леденева М.Л., Водопьянов А.С., Ткаченко Г.А., Водопьянов С.О., Савченко С.С., Шпак И.М.* Выявление INDEL-маркеров в геномах штаммов *Burkholderia pseudomallei* для внутривидового генотипирования ..... 35
- Ledeneva, M.L., Vodopianov, A.S., Tkachenko, G.A., Vodopianov, S.O., Savchenko, S.S., Shpak, I.M.* Detection of INDEL-markers in genomes of *Burkholderia pseudomallei* strains for intra-species genotyping
- Бочкарева С.С., Алешкин А.В., Ершова О.Н., Новикова Л.И., Афанасьев С.С., Киселева И.А., Зулкарнеев Э.Р., Рубальский Е.О., Борисова О.Ю., Караулов А.В.* Иммунологические аспекты фаготерапии инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, в отделении нейрореанимации ..... 42
- Bochkareva, S.S., Aleshkin, A.V., Ershova, O.N., Novikova, L.I., Afanasiev, S.S., Kiseleva, I.A., Zulkarneev, E.R., Rubalsky, E.O., Borisova, O. Yu., Karaulov, A.V.* Immunologic aspects of phage therapy of infections related to medical care in neuroreanimation
- Гуляев С.А., Потемкин И.А., Кичатова В.С., Карлсен А.А., Исаева О.В., Гуляева Т.В., Ваннус М.А., Гордейчук И.В., Кюрегян К.К., Михайлов М.И.* Моделирование вирусного гепатита Е на карликовых домашних свиньях ..... 48
- Gulyaev, S.A., Potemkin, I.A., Kichatova, V.S., Karlsen, A.A., Isaeva, O.V., Gulyaeva, T.V., Vannus, M.A., Gordeichuk, I.V., Kyuregyan, K.K., Mikhailov, M.I.* Modelling of hepatitis E in mini-pigs

<i>Макарова М.А., Сужаева Л.В., Кафтырева Л.А.</i> Дети раннего возраста с дисбиозом кишечника как носители энтероагрегативных <i>Escherichia coli</i> .....	54
<i>Makarova, M.A., Suzhaeva, L.V., Kaftyreva, L.A.</i> Young age children with intestine dysbiosis as carriers of enteroaggregative <i>Escherichia coli</i>	
<i>Семенов А.В., Останкова Ю.В., Чурина М.А., Никитина Н.А., Росоловский А.П., Гребенкина Е.В., Ткаченко Т.Н., Жандармова Т.А., Тотолян Арег А.</i> Молекулярно-биологические методы диагностики при расследовании случая передачи ВИЧ-инфекции.....	59
<i>Semenov, A.V., Ostankova, Yu.V., Churina, M.A., Nikitina, N.A., Rosolovsky, A.P., Grebenkina, E.V., Tkachenko, T.N., Zhandarmova, T.A., Totolyan, Areg A.</i> Molecular-biological methods of diagnostics for investigation of HIV infection transmission	
<i>Савинков П.А., Рыбалкина Т.Н., Каражас Н.В., Бошьян Р.Е., Калугина М.Ю., Корниенко М.Н., Русакова Е.В., Бурмистров Е.М., Солдатова И.А.</i> Выявление маркеров герпесвирусных инфекций и пневмоцистоза у детей, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями.....	67
<i>Savinkov, P.A., Rybalkina, T.N., Karazhas, N.V., Boshyan, R.E., Kalugina, M.Yu., Kornienko, M.N., Rusakova, E.V., Burmistrov, E.M., Soldatova, I.A.</i> Detection of markers of herpes virus infection and pneumocystosis in children from HIV-infected mothers	

#### ПРОБЛЕМНАЯ СТАТЬЯ (PROBLEM ARTICLE)

<i>Чернявская О.П., Брико Н.И.</i> Проблемы заключительного этапа программы ликвидации полиомиелита.....	75
<i>Chernyavskaya, O.P., Briko, N.I.</i> Problems of final phase poliomyelitis eradication programme	

#### ОБЗОРЫ (REVIEWS)

<i>Овечко Н.Н., Ястребова Н.Е.</i> Антигены поверхностных структур <i>Haemophilus influenzae</i> как перспективные кандидат-вакцины .....	82
<i>Ovchko, N.N., Yastrebova, N.E.</i> Antigens of surface structures of <i>Haemophilus influenzae</i> as perspective vaccine-candidates	
<i>Бойченко М.Н., Зверев В.В., Волчкова Е.В.</i> Взаимодействие сальмонелл с организмом хозяина.....	91
<i>Boichenko, M.N., Zverev, V.V., Volchkova, E.V.</i> Interaction of salmonella with host organism	
<i>Коровкина Е.С., Костинов М.П., Кажарова С.В.</i> Возможности использования иммуномодуляторов в комплексной терапии внебольничных пневмоний.....	101
<i>Korovkina, E.S., Kostinov, M.P., Kazharova, S.V.</i> Possibilities of use of immune modulators in complex therapy of community-acquired pneumonias	
<i>Микшис Н.И., Попова П.Ю., Семакова А.П., Кутырев В.В.</i> Лицензированные сибиреязвенные вакцины и экспериментальные препараты на стадии клинических исследований .....	112
<i>Mikshis, N.I., Popova, P.Yu., Semakova, A.P., Kutyrev, V.V.</i> Licensed anthrax vaccines and experimental preparations at the stage of clinical trials	

## ВНИМАНИЮ АВТОРОВ!

Редколлегия принимает на рассмотрение статьи по вопросам медицинской микробиологии и биотехнологии, эпидемиологии, вакцинологии, экологии микроорганизмов, иммунотерапии и иммунодиагностики инфекционных болезней человека, а также работы, освещающие закономерности иммунного ответа на возбудители, секретируемые ими продукты и их антигены.

При направлении статей в ЖМЭИ авторам следует соблюдать следующие правила:

1. Статья должна иметь направление от учреждения. Присылать по почте (п. 13) 2 экз. статьи через 2 интервала на компьютере с лазерным принтером шрифтом не меньше 12—14 кегля. Не будут приниматься «слепые» распечатки бумажного варианта статей. К бумажному варианту должен быть приложен лазерный компакт-диск в жесткой упаковке только с текстом статьи, литературой, табл., резюме, подрис. подписями, если есть рис. (рис. на отдельном диске). Размер статей не должен превышать у оригинальных 10—12 стр., обзоров 15 стр., кратких сообщений 8 стр., остальных 3—5 стр.

2. В выходных данных указывать инициалы и фамилии авторов (иностранных в иностранной транскрипции), название работы, учреждение, город. Статья должна быть подписана всеми авторами с указанием только для одного из авторов (для контактной информации) полных имени и отчества, места работы, ученого звания, ученой степени, служебного адреса (с индексом города) и служебного телефона; сотового телефона и e-mail (если есть) в конце статьи в набранном виде. Необходимы цифровые ссылки у фамилий авторов и у институтов, где они работают.

3. Оригинальная статья должна состоять из разделов: Введение, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение. К оригинальным статьям, обзорам и кратким сообщениям должно прилагаться резюме на русском и английском языках с указанием авторов, названия статьи, институтов (на отдельной странице, не более 1500 знаков каждое) и ключевые слова на русском и английском языках. Резюме должно иметь разделы: Цель, Материалы и методы, Результаты, Заключение. В резюме к обзорам разделы не нужны.

4. Количество рис. и таблиц в сумме не должно превышать 3. Принимаются только графики, схемы, микрофото, филогенетические деревья. Микрофото должны быть контрастными, 6x9 или 5x8, в 2 экз. В подписи указать окуляр, объектив и метод окраски или импрегнации. Графики и схемы должны быть четкими, не перегружены подписями. Иллюстрации принимаются только в черно-белом варианте. Размер филогенетического дерева не более 1/2 печатной страницы. Кроме бумажного варианта иллюстраций необходим файл иллюстративных программ (TIFF и др.) на отдельном диске. Таблицы не должны дублировать графики, иметь краткое название, быть компактными, с «шапками», точно отражающими содержание граф. Цифры в таблицах должны быть статистически обработаны и соответствовать таковым в тексте. Не принимаются табл. размером более 1 печатной стр. Перечисляемые праймеры не должны превышать 1/4 печатной стр.

5. Родовые и видовые названия микроорганизмов, инфраподвидовые категории, наименования семейств должны соответствовать принятым Международным таксономическим комитетом (9 изд. «Руководство по систематике бактерий Берги»). Первый раз название бактерий пишется полностью (*Shigella flexneri*), далее род одной прописной буквой, вид полностью со строчной (*S. flexneri*). Наименования семейств пишутся полностью.

6. В математических формулах размечать строчные и прописные, подстрочные и надстрочные буквы. Сокращения (за исключение общепринятых химических и математических величин) не допускаются. Использовать только единицы СИ.

7. Литература (в оригинальных статьях не более 15, проблемных и обзоров не более 50, кратких сообщениях не более 10) печатается на отдельном листе колонкой в алфавитном порядке (русские авторы, потом иностранные). В тексте дается ссылка на порядковый номер списка. В списке приводятся все отечественные авторы, иностранные — 3 автора et al., название статьи, название журнала или сборника, год, номер, страницы. Для книг, патентов и авторефератов диссертаций давать точное название. Ссылки на тезисы конференций, симпозиумов, пленумов, съездов и на неопубликованные работы не допускаются. Фамилии иностранных авторов в тексте статьи даются в иностранной транскрипции.

8. Направление в ЖМЭИ работ, посланных в другие редакции, не допускается. Статьи, оформленные не по правилам, редколлекцией не рассматриваются и авторам не возвращаются; посылается лишь сообщение редакции о неправильном оформлении.

9. Только при оформлении статей по вышеперечисленным правилам они рецензируются членами редколлегии и/или специалистами профильных научных учреждений. Статьи с положительными рецензиями принимаются в печать. Отклоненные по рецензии рукописи, непрофильные статьи и рекомендованные для доработки авторам не возвращаются, посылается только решение редколлегии и рецензия. Поступившие после переработки рукописи вновь рассматриваются на заседании редколлегии и при выполнении автором рекомендаций рецензента принимаются в печать. Датой поступления статьи считается дата ее принятия в печать.

10. Редакция оставляет за собой право редактировать статьи, сокращать или исправлять их, а также помещать в виде кратких сообщений: 8 стр. текста с резюме (п. 3) и литературой (п. 7) без рисунков и таблиц.

11. Плата с аспирантов за публикацию статей не взимается.

12. При выполнении экспериментальных работ авторы обязаны придерживаться «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». В статье необходимо указывать вид, количество использованных животных, методы обезболивания и умерщвления.

13. Статьи и запросы о прохождении статей направлять по адресу: 121059, Москва, ООО «С-инфо», а/я 88, редакция ЖМЭИ. За статьи, посланные иным путем, редакция ответственности не несет.